

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Ústav lékařské biologie a genetiky

**Kvantifikace genové exprese u Hep-2 a HL-60 buněk  
po indukci apoptózy**

**RNDr. Dita Královcová**

Disertační práce

školitel: Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D

Hradec Králové 2008

**CHARLES UNIVERSITY OF PRAGUE**  
Faculty of Medicine in Hradec Kralove  
Department of Medical Biology and Genetics

**Quantificaton of gene expression in Hep-2 and HL-60 cells  
after induction of apoptosis**

**RNDr. Dita Královcová**

Doctoral thesis

supervisor: Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D

Hradec Králové 2008

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury.

V Pardubicích 9.9. 2008

  
RNDr. Dita Královcová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D za vedení disertační práce. Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. RNDr. Miroslavu Červinkovi, CSc. za odborné konzultace a umožnění doktorského studia v oboru Lékařské biologie na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Mé díky patří i doc. PharmDr. Emilu Rudolfovi, Ph.D a kolektivu pracovníků Ústavu lékařské biologie a genetiky LF HK za přípravu buněk pro další analýzu. Poděkovat bych chtěla také mým kolegyním Mgr. Markétě Vydržalové, Ph.D, Mgr. Petře Lyskové a Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D za rady a povzbuzení během mého studia.

## Souhrn

Apoptóza, nebo také programovaná buněčná smrt, je jeden ze základních fyziologických procesů a jsou pro ni typické morfologické a biochemické změny odehrávající se uvnitř buněk. Ke změnám dochází i na úrovni genové exprese a to jak u genů podílejících se na indukci, tak i na průběhy apoptózy.

Cílem práce bylo indukovat apoptózu etoposidem u dvou modelových buněčných linií a kvantifikovat případné změny v expresi vybraných genů.

Etoposidem, inhibitorem topoizomerázy II, byly ovlivněné dvě stabilizované buněčné linie Hep-2 a HL-60 po dobu 0 hod, 6 hod a 12 hod. Případné změny v genové expresi genů TP53, BCL2, BAX a DFFB byly měřeny metodou kvantitativní real-time RT-PCR.

Po analýze genové exprese bylo zjištěno, že u Hep-2 buněk exprese genu TP53 signifikantně vzrostla po 6 hod ovlivnění ve srovnání s kontrolou, po 12 hod se exprese snížila, stále však byla statisticky významně vyšší než u kontrolní skupiny. U buněčné linie HL-60 nedochází k přepisu tohoto genu.

Kvantifikace exprese genu BCL2 u buněčné linie Hep-2 ukázala, že jak po 6 hod tak po 12 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese tohoto genu. Naopak exprese genu BAX zůstala beze změny. U HL-60 buněk došlo ke statisticky významnému poklesu exprese BCL2 po 6 hod ve srovnání s kontrolní skupinou, po 12 hod došlo ke zvýšení exprese ve srovnání jak se skupinou ovlivněnou 6 hod, tak s kontrolou. U genu BAX došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese po 6 hod ovlivnění, po 12 hod toto zvýšení bylo statisticky významné jen v porovnání s kontrolou.

Analýza exprese genu DFFB u Hep-2 buněk ukázala, že došlo k mírnému nárůstu exprese po 6 hod, ne však statisticky významnému. Po 12 hod exprese tohoto genu klesla v porovnání s kontrolou i se skupinou ovlivněnou 6 hod. U buněčné linie HL-60 nedošlo ke změně exprese tohoto genu.

Kvantitativní analýza genové exprese po ovlivnění etoposidem ukázala, že zejména exprese genů BCL2 a BAX se buněčných linií Hep-2 a HL-60 značně liší. Jedná se zřejmě o různé reakce těchto nádorových buněk na působení etoposidu.

## Summary

Apoptosis is a complex, strictly regulated physiological process which is characterized by several molecular and biochemical features such as upregulation of proapoptotic genes, activation of specific enzymes, cell contraction and rounding, formation of spikes and blebs, DNA fragmentation and cell fragmentation into apoptotic bodies.

The aim of this work was to investigate changes in expression of apoptosis related genes in cells of two cell lines after treatment with etoposide.

To find out about changes in genes expression of apoptosis-related genes, two stabilized cell lines Hep-2 and HL-60 were treated with etoposide, a topoisomerase II inhibitor, during 0 h, 6 h or 12 h. The changes in genes expression of TP53, BCL2, BAX and DFFB were measured by quantitative real-time RT-PCR.

In Hep-2 cells, the relative expression level of TP53 gene was significantly higher after 6 h of treatment than the untreated control. Expression of TP53 was significantly higher also after 12 h of treatment compared to control, but lower than the group of cells treated 6 h. HL-60 is the TP53-negative cell line.

In Hep-2 cells, the relative expression level of BCL2 gene was significantly higher after 6 h of treatment than the untreated control. The relative expression level of BCL2 was significantly higher also after 12 h of treatment and the expression level also significantly increased between 6 h and 12 h of treatment with etoposide. Whereas, the relative expression level of BAX did not significantly change neither after 6 h nor 12 h of treatment with etoposide.

In HL-60 cells, the relative expression level of BCL2 gene was significantly lower after 6 h of treatment than the untreated control, but the expression level was significantly higher after 12 h of treatment compared to untreated control. The significant distinction was also between 6 h and 12 h of treatment with etoposide. The relative expression level of BAX gene was significantly higher after 6 h and 12 h of treatment with etoposide compared to untreated control.

In Hep-2 cells the expression level of DFFB was significantly lower after 12 h of treatment compared to the group of cells treated 6 h. In HL-60 cells the expression level of DFFB did not change.

Quantitative analysis of these genes shows the different expression levels especially of BCL2 and BAX genes in Hep-2 and HL-60 cells. It can indicate the different response of Hep-2 and HL-60 cells to etoposide treatment.

## Seznam zkratek

- 5-FU - metabolit 5/prime/-deoxyfluorouridin
- AIF - apoptosis-inducing faktor
- APAF11 - apoptotic protease activating factor-1
- BAK - BCL2-antagonist/killer 1
- BAX - BCL2-associated X protein
- BCL2 - B-cell CLL/lymphoma 2
- bp – pár bází (base pair)
- BRIN-BD 11 – buněčná linie, beta buňky Langerhansových ostrůvků slinivky
- CAD - caspase-activated DNase
- Cdc2 - cell division cycle 2
- cDNA – komplementární DNA
- Cisplatina (CDDP) – Cis-diaminedichloroplatinum
- COLO 205 – buněčná linie, kolorektální karcinom
- CPAN - caspase-activated nuklease
- cyklin-Cdk – cyklin dependentní kináza (Cyklin dependente kinase)
- DFFB - DNA fragmentation factor
- DMEM – kultivační médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- DNA – kyselina deoxyribonukleová
- DNasa - deoxyribonukleáza
- dNTP - deoxyribonukleotidtrifosfát
- ds DNA – dvouřetězcová DNA (double strand)
- ECACC – Evropská Sbirka buněčných kultur (The European Collection of Cell Cultures)
- EDTA – ethylendiaminotetraoctová kyselina
- FADD - Fas-associated death domain
- FAS - TNF receptor superfamily
- FasL – Fas ligand
- FCS – fetální telecí sérum (fetal calf serum)
- Gadd45 - growth arrest and DNA damage-inducible protein 45
- HDB – hydroxydibenzoylmethan
- HL-60 - buněčná linie, humánní myeloidní leukémie
- HT-29 - buněčná linie, karcinom tlustého střeva

IAP - inhibitor of apoptosis protein  
IGF-BP3 - insulin-like growth factor-binding protein 3  
IMR90 – buněčná linie, humánní fetální plicní fibroblasty  
Jurkat - buněčná linie, akutní T buněčná leukémie  
LoVo – buněčná linie, humánní karcinom tlustého střeva  
LY2940002 - phosphoinositide-3-kinase inhibitor  
Mdm2 - mouse double minute  
MKN-45 – buněčná linie, humánní karcinom žaludku  
M-MuLV – virus myši leukosy (Moloney Murine Leukemia Virus)  
Molt-4 - buněčná linie, lymfoblastická leukémie  
mRNA – mediátorová RNA  
NALL-1- buněčná linie, akutní lymfoblastická leukémie  
NSCLC - nemalobuněčný bronchogenní karcinom  
PANC-1 – buněčná linie, karcinom slinivky břišní  
PBGD – porphobilinogen deaminase  
PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate buffered saline)  
PCR – polymerázová řetězová reakce  
PERP - TP53 apoptosis effector  
PTGF-beta - beta transforming growth factor  
Rb – retinoblastomový protein (Retinoblastoma)  
RNA – kyselina ribonukleová  
RPMI – kultivační médium (Roswell Park Memorial Institute)  
RT – reverzní transkripce  
RT-PCR – reverzní transkriptázová PCR  
SNP – jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphism)  
ss DNA - jednořetězcová DNA (single strand)  
SV40 - buněčná linie, transformované IMR90 buňky  
TNF – tumor necrosis factor  
TNFR - tumor necrosis factor receptor  
TP53 – tumor protein p53  
TRAIL - TNF-related apoptosis inducing ligand  
Tris – trihydroxymethylaminomethan



# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>13</b>
2.1. Buněčná smrt.....	13
2.1.1. Nekróza.....	13
2.1.2. Apoptóza.....	13
2.1.2.1. Morfologické a biochemické změny v apoptóze.....	14
2.1.2.2. Mechanismy indukce apoptózy.....	16
2.1.2.3. Důležité geny uplatňující se při regulaci apoptózy.....	17
2.1.3. Další typy programované buněčné smrti.....	23
2.2. Molekulární detekce genové exprese.....	24
2.2.1. Izolace RNA.....	24
2.2.2. Reverzní transkripce.....	24
2.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	25
2.2.4. Real-time PCR.....	25
2.2.4.1. Fluorescenční značení.....	26
2.2.4.2. Monitorování PCR v reálném čase.....	28
2.2.4.3. Analýza kvantitativních dat.....	29
2.3. Kvantifikace genové exprese v průběhu apoptózy.....	31
2.3.1. Kvantifikace genové exprese u buněčných linií.....	31
2.3.2. Kvantifikace exprese u tkání pacientů.....	34
2.4. Buněčné linie Hep-2 a HL-60.....	36
2.4.1. Buněčná linie Hep-2.....	36
2.4.2. Buněčná linie HL-60.....	37
2.5. Etoposid.....	39
<b>3. Materiál a metody.....</b>	<b>41</b>
3.1. Přístrojové vybavení.....	41
3.2. Chemikálie.....	41
3.3. Buněčné linie.....	42
3.4. Cytostatikum.....	43
3.5. Izolace RNA.....	43
3.6. Koncentrace RNA.....	44
3.7. Reverzní transkripce.....	45
3.8. Optimalizace real-time PCR.....	45
3.8.1. Výběr primerů a sond.....	45
3.8.2. Koncentrace MgCl <sub>2</sub> .....	46
3.8.3. Optimalizace koncentrace primerů a sond.....	46
3.8.4. Teplotní profil reakce.....	47
3.9. Real-time PCR.....	47
3.10. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	47
3.11. Elektroforéza.....	48
3.12. Analýza dat.....	48
3.13. Statistické vyhodnocení.....	49
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>50</b>
4.1. Optimalizace real-time RT-PCR pro jednotlivé geny.....	50
4.1.1. TP53.....	50
4.1.2. BCL2.....	53
4.1.3. BAX.....	56
4.1.4. DFFB.....	59

4.1.5. PBGD.....	62
4.2. Experimentální část.....	65
4.2.1. Ovlivnění buněčné linie Hep-2 etoposidem.....	65
4.2.1.1. Exprese genu TP53.....	65
4.2.1.2. Exprese genu BCL2.....	67
4.2.1.3. Exprese genu BAX.....	68
4.2.1.4. Exprese genu DFFB.....	70
4.2.1.5. Exprese genu PBGD.....	71
4.2.2. Ovlivnění buněčné linie HL-60 etoposidem.....	72
4.2.2.1. Exprese genu TP53.....	72
4.2.2.2. Exprese genu BCL2.....	73
4.2.2.3. Exprese genu BAX.....	74
4.2.2.4. Exprese genu DFFB.....	76
4.2.2.5. Exprese genu PBGD.....	77
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>78</b>
5.1. Indukce apoptózy.....	78
5.2. Kvantifikace exprese genu TP53.....	80
5.3. Kvantifikace exprese genů BCL2 a BAX.....	81
5.4. Kvantifikace exprese genu DFFB.....	83
<b>6. Závěr.....</b>	<b>86</b>
<b>7. Seznam literatury.....</b>	<b>87</b>

# 1. Úvod

Apoptóza, nebo také programovaná buněčná smrt, je dynamický proces, během kterého buňky umírají jako odpověď na různé druhy podnětů. Je nezbytná pro udržení integrity mnohobuněčných organismů i pro zdárný průběh embryogeneze. Apoptóza je kontrolovaný děj, pro který jsou charakteristické morfologické a biochemické změny odehrávající se uvnitř buněk. Mezi morfologické projevy patří kondenzace a fragmentace jádra, ztráta objemu cytoplazmy a tvorba tzv. apoptotických tělísek, která jsou pohlcena fagocytujícími buňkami. V rané fázi apoptózy je aktivována rodina enzymů zvaná kaspázy, které degradují další strukturní proteiny v buňce, nebo aktivují další enzymy jako např. DNázy.

K indukci apoptózy může dojít více způsoby, jedním z nich je indukce pomocí vnitřních signálů, tzv. mitochondriální cesta, která se uplatňuje například při poškození DNA. Zde hraje důležitou roli protein TP53, který schopen buď zastavit buněčný cyklus, nebo indukovat apoptózu. Při spouštění apoptózy hraje klíčovou roli také rodina BCL2 proteinů. Jejich vzájemný poměr a interakce rozhodují o tom jestli buňka do apoptózy vstoupí. Jedním z hlavních morfologických znaků apoptózy je pak fragmentace DNA, za kterou zodpovídají endonukleázy. Jedním z významných zástupců této skupiny, který způsobuje internukleozomální fragmentaci DNA je enzym DFFB.

Působením xenobiotik na buňky, případně nádorové buněčné linie, lze sledovat nejen jejich toxický účinek, ale i jejich schopnost indukovat apoptózu. Jednou z takových látek je i etoposid, který je jeden z nejčastěji používaných protinádorových léků. Jeho primárním cílem v buňkách je enzym topoizomeráza II. Důsledkem působení etoposidu na buňky je vytváření trvalých zlomů na řetězci DNA a zastavení buněčného cyklu v S nebo G2 fázi, případně indukce apoptózy.

Indukce apoptózy v buňkách, se kromě morfologických změn, projeví i změnou exprese genů podílejících se na apoptóze. Pro přesné vyjádření těchto změn v genové expresi se využívá metoda real-time RT-PCR.

## **Cíle práce**

Tématicky tato disertační práce navazuje na předchozí práce zpracovávané na Ústavu lékařské biologie a genetiky, kde byla testována schopnost etoposidu indukovat apoptózu u buněk různých nádorových buněčných linií. V těchto pracích (Červinka et al. 1999, Rudolf et al. 2000a, Červinka et al. 2004, Rudolf et Červinka 2005) byly sledovány hlavně morfologické projevy apoptózy.

Pro zjišťování změn v genové expresi buněk po ovlivnění etoposidem, byly předsedou oborové rady vybrány dvě modelové buněčné linie, Hep-2 a HL-60.

Cílem této práce tedy bylo indukovat apoptózu etoposidem u dvou stabilizovaných buněčných linií, Hep-2 a HL-60 a metodou real-time RT-PCR kvantifikovat expresi vybraných genů, které se podílejí na indukci, nebo průběhu apoptózy.

1. Optimalizovat podmínky real-time RT-PCR reakce pro geny TP53, BCL2, BAX, DFFB a referenční gen PBGD.
2. Kvantifikovat a porovnat případné změny exprese těchto genů u nádorových buněčných linií Hep-2 a HL-60 po indukci apoptózy etoposidem.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Buněčná smrt

Buněčná smrt společně s růstem a diferenciací patří mezi rozhodující části životního cyklu buněk. Dynamická rovnováha mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí je důležitá pro celkovou homeostázi organismu. Existují dva základní mechanismy buněčné smrti nekróza („náhodná“ buněčná smrt) a „programovaná“ buněčná smrt (Schwartzman et Cidlowski 1993). Mezi nejznámější typ programované buněčné smrti patří apoptóza. V posledních letech se také objevují články popisující různé typy buněčné smrti odlišující se od apoptózy. Protože však tyto procesy vyžadují přísun energie a aktivaci určitých genů, považují se pouze za jiné typy programované buněčné smrti než je apoptóza. Přehled různých forem buněčné smrti uvádí ve své práci např. Elmore (2007).

#### 2.1.1 Nekróza („náhodná“ buněčná smrt)

Nekróza je patologický proces, který nastane pokud je buňka fyzicky poškozena, nebo je vystavena působení chemických látek. Buňky v nekróze provázejí typické morfologické a biochemické změny. Mezi první příznaky patří bobtnání cytoplasmy a organel, zejména mitochondrií, avšak bez výrazných změn v jádře. Poškození membrán, nebo celkové energetické vyčerpání vedou k ukončení aktivity iontových pump. Kationty pak přecházejí přes membránu společně s tekutinou podle koncentračního spádu a způsobují bobtnání buňky. Zvýšená koncentrace volného  $Ca^{2+}$  v cytosolu aktivuje fosfolipázy, které degradují membránové fosfolipidy a způsobí tím rozrušení membrán (Chien et al. 1978, Schanne et al. 1979). To nakonec vede k rozpadu organel a celkové lýzi buňky. Buněčnou dezintegraci v pozdních stádiích nekrózy urychlí hydrolázy, uvolněné z rozrušených lyzozómů, lyzozomálními deoxyribonukleázami je štěpena i DNA na různě dlouhé fragmenty (Hawkins et al. 1972). Pro nekrózu je typické, že postihuje skupiny sousedících buněk a zánět se rozvíjí i v okolních tkáních v důsledku uvolnění buněčných zbytků.

#### 2.1.2 Apoptóza („programovaná“ buněčná smrt)

Termín apoptóza se poprvé objevil v roce 1972 a popisoval nový způsob buněčné smrti (Kerr et al. 1972). U apoptotických buněk se objevují typické morfologické změny, jako je kondenzace a fragmentace jádra, ztráta objemu cytoplazmy, a tvorba tzv. apoptotických tělísek, což jsou membránou obalené fragmenty buněk obsahující části jádra a cytoplazmu.

Apoptotická tělíska jsou následně pohlcena fagocytujícími buňkami, jako jsou makrofágy, a podléhají rychlé degradaci (Fadok et al. 1998). Díky tomu, že plazmatická membrána zůstává nepoškozená, nevyvolávají apoptotické buňky zánět (Levine 1999). První pozorování apoptózy ukázala, že je to základní fyziologický proces, který hraje důležitou roli v regulaci buněčné populace (Kerr et al. 1972). Apoptóza probíhá také v průběhu embryogeneze, kde jsou některé buňky naprogramovány zemřít, proto se také k popsaní tohoto děje používá termín „programovaná“ buněčná smrt (Krammer 1999).

Apoptóza může být rozdělena do tří stádií (Kroemer et al. 1997). V první fázi buňky přijmou apoptotický signál. V buňkách může stimulovat apoptózu množství různých signálů interních i externích. Mezi ně patří např. ligace povrchových buněčných receptorů, stažení základních růstových faktorů, nebo vystavení buněk různým chemickým látkám (Au et al. 1997). Také vystavení buněk ultrafialovému, nebo ionizujícímu záření, horku, nebo změnám osmolarity může indukovat apoptózu (Rehmtulla et al. 1997, Zundel 1998).

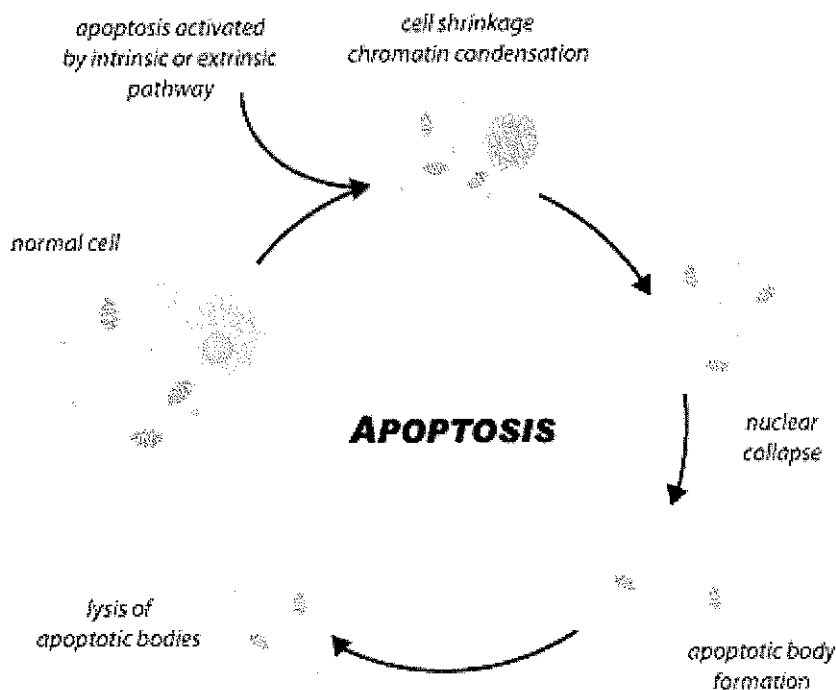
V další fázi buňky vyhodnocují rozmanité signály, které rozhodují o tom, zda buňka vstoupí, nebo nevstoupí do apoptózy. Tento proces obsahuje několik signálních drah, jako je aktivace serin/threonin a tyrosin kináz a fosfatáz, pozměněnou genovou expresi a aktivaci specializovaných proteáz, známé jako kaspázy. Konečné rozhodnutí podstoupit apoptózu závisí na několika dalších faktorech, jako je vzájemná hladina apoptotických a protiapoptotických faktorů, metabolický stav buňky, stejně tak i v jakém stádiu buněčného cyklu se buňka nachází (Montani et al. 1999). V poslední fázi apoptózy jsou aktivovány signální dráhy vedoucí k degradaci buňky a buňka následně získává typické morfologické znaky (Kroemer et al. 1997).

#### 2.1.2.1 Morfologické a biochemické změny v apoptóze

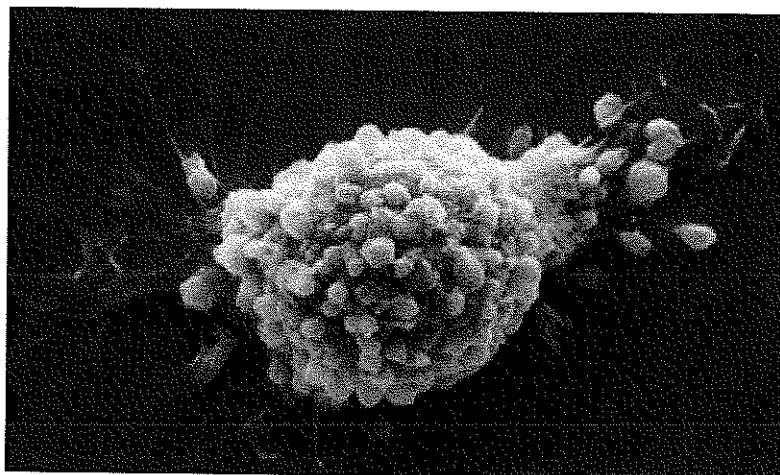
Biochemické a morfologické změny způsobené apoptózou se projevují v celé buňce od plazmatické membrány po jádro. Nápadná změna, projevující se ve struktuře plazmatické membrány je tvorba puchýřků, nebo malých membránou obalených částí cytoplazmy. Dalším nápadným jevem je kondenzace jaderného materiálu. Mezi další změny, které probíhají v cytoplazmě v průběhu apoptózy, patří ztráta objemu cytoplazmy a degradace cytoskeletárních proteinů (Cohen 1993). Ztráta objemu cytoplazmy vyplývá ze ztráty draslíkového gradientu, který je normálně udržovaný plazmatickou membránou. Toto zmenšování objemu buňky má pak za následek tvorbu puchýřků na povrchu plazmatické membrány (Dallaporta et al. 1999) (Obr. 2). Degradace cytoskeletárních proteinů vyplývá z aktivace kaspáz a jiných degradativních proteinů (Krammer 1999).

Další změny v buňce se týkají buněčných organel, mitochondrií a jádra. Mitochondrie mají za normálních okolností oválný tvar s vnitřní a vnější fosfolipidovou membránou. Vnitřní membrána ohraničuje centrální matrix, ve které je uložena mitochondriální DNA. Mezimembránový prostor, který je ohraničen vnitřní a vnější mitochondriální membránou obsahuje několik pro-apoptotických proteinů jako je respirační protein cytochrom c a AIF. V některých buňkách byly také detekovány kaspázy 2, 3 a 9 (Samali et al. 1999, Susin et al. 1999a,b). Během apoptózy dochází k bobtnání mitochondriální matrix, k prasknutí vnější mitochondriální membrány a uvolnění pro-apoptotických proteinů z mezimembránového prostoru (Kroemer et al. 1997).

Další výrazné změny lze pozorovat během apoptózy i v jádře. Jádro kondenzuje, chromatin se soustřeďuje po jadernou membránou a jádro začíná segmentovat na několik částí (Cohen 1993). Tyto fragmenty pak mohou být uvolněny z buňky jako součást apoptotických tělísek (Zamzami et Kroemer 1999) (Obr. 1). Redukce celkovém obsahu DNA v buňkách je tedy signálem o probíhající apoptóze. Na biochemické úrovni jsou tyto změny v jádře spojené s aktivací několika různých endonukleáz. Díky působení těchto degradativních enzymů vznikají krátké fragmenty DNA, v několikanásobcích 180 párů bází, což odráží základní nukleozomovou strukturu (Zamzami et Kroemer 1999).



Obr. 1 Průběh apoptózy  
[\(http://www.scq.ubc.ca/apoptosis/\)](http://www.scq.ubc.ca/apoptosis/)



Obr. 2 Tvorba typických puchýrků na povrchu plazmatické membrány  
(<http://biology.about.com/cs/cellbiology/a/aa031204a.htm>)

#### 2.1.2.2 Mechanismy indukce apoptózy

Regulace apoptózy je velmi složitý proces a existuje několik cest jak v buňce dochází k indukci buněčné smrti (Obr. 3).

##### 1. Apoptóza indukovaná vnějšími signály

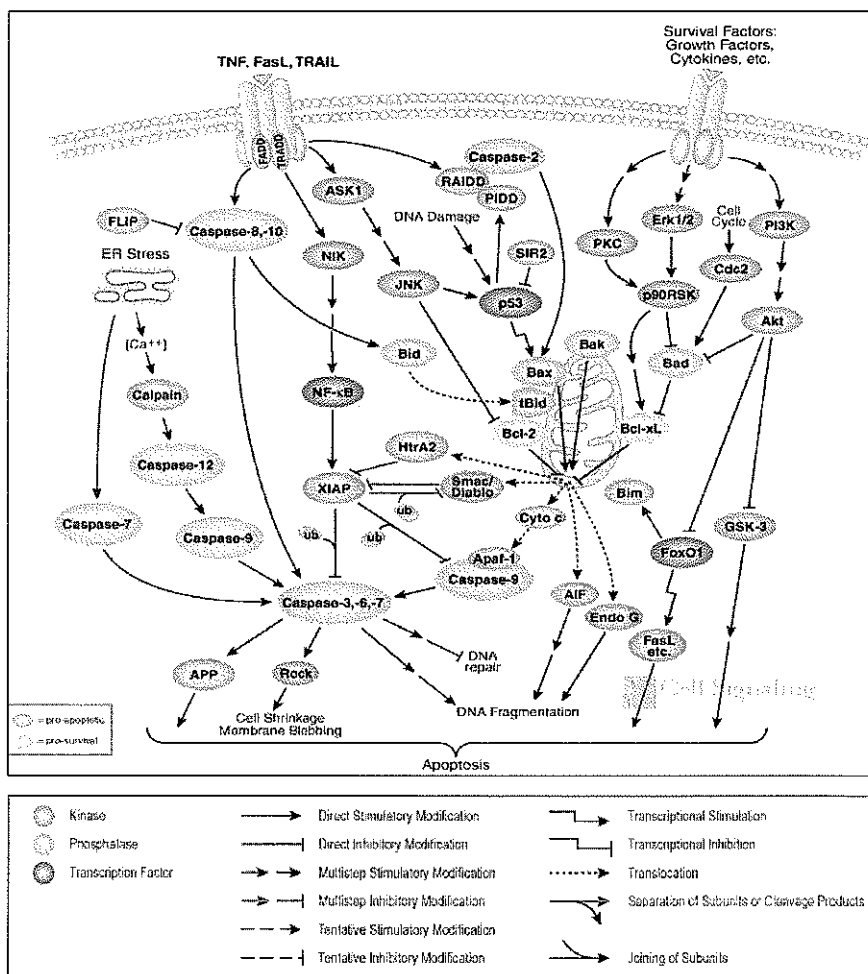
Tento způsob buněčné smrti je zprostředkovan přes receptory FAS(CD95) a TNF (nazývané také „receptory smrti“), což jsou integrální membránové proteiny s receptorovou doménou vně buňky. Na tyto receptory se vážou aktivátory FASL a TNF- $\alpha$ , které aktivují kaspázu 8 a tím spouští apoptózu v buňkách (Strasser et al. 2000).

##### 2. Apoptóza indukovaná vnitřními signály (mitochondriální cesta)

Tento způsob apoptózy je indukován při buněčném stresu, např. při poškození DNA a klíčovou roli zde hraje rodina BCL2 genů. V časných fázích tohoto typu apoptózy dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a k uvolnění cytochromu c a jiných proapoptotických proteinů (Newmeyer et Ferguson-Miller 2003). Uvolněním těchto proteinů jsou aktivovány kaspázy a spuštěna apoptóza.

V některých typech buněk se z mitochondrií uvolňuje AIF, který spouští apoptózu bez účasti kaspáz (Candé et al. 2002).





Obr. 3. Schéma apoptózy.

(<http://www.cellsignal.com/reference/pathway.html>)

### 2.1.2.3 Důležité geny uplatňující se při regulaci apoptózy

Apoptóza je regulována mnoha geny. V této kapitole jsou podrobněji popsány ty geny, jejichž exprese byla měřena v experimentální části práce.

#### ***TP53 (tumor protein p53)***

Gen TP53 patří do skupiny tumor supresorových genů a je často popisován jako „strážce genomu“. Jeho významnou funkcí je udržování integrity genomu, což je důležité např. při poškození DNA, po kterém může dojít k zastavení buněčného cyklu nebo k indukci apoptózy (Levine 1997). Ztráta funkce TP53 může vést k vyšší citlivosti buněk k nádorové

Jednou z nejdůležitějších biologických funkcí proteinu TP53 je regulace transkripce. Právě v doméně potřebné pro specifickou vazbu na DNA byla nalezena velká část mutací genu TP53 (Ko et Prives 1996). Objevení schopnosti regulace transkripce u proteinu TP53 mělo velký význam při zkoumání jeho funkcí a u stále více genů je známo, že obsahují vazebné místo pro TP53 a tím jsou schopny zprostředkovat účinek TP53 na buňky (Vogelstein et Kinzler 1992). Geny, které jsou transkripčně regulovány proteinem TP53, se dají rozdělit do několika skupin. První skupinu tvoří geny podílející se na regulaci buněčného cyklu, jako jsou p21 a 14-3-3 sigma (el-Deiry et al. 1993, Hermeking et al. 1997). Do další skupiny náleží geny podílející se na regulaci apoptózy, kam patří rodina BCL2 genů. Mezi pozitivně regulované geny z této genové rodiny patří BAX, BAK a NOXA, které jsou proapoptotické (Miyashita et Reed 1995, Oda et al. 2000, Pohl et al. 1999). Další skupinou jsou geny FAS patřící do rodiny genů TNFR. Tyto geny jsou důležité při regulaci apoptózy v imunitním systému a to, že patří mezi aktivační cíle proteinu TP53, může naznačovat úlohu TP53 i u apoptózy indukované přes receptory (Owen-Schaub et al. 1995). Další skupinou, jejíž transkripce je ovlivněna TP53, jsou geny podílející se na regulaci buněčné signalizace jako IGF-BP3, který pomáhají při spouštění apoptózy (Buckbinder et al. 1995). I když je TP53 znám hlavně jako aktivátor transkripce, ví se také o jeho funkci při represí transkripce. TP53 například potlačuje expresi antiapoptotického genu BCL2 z rodiny BCL2 genů (Miyashita et al. 1994b).

Jednou ze z dalších funkcí proteinu TP53 je zprostředkovat informaci o poškození DNA a zabránit akumulaci potenciálně onkogenních mutací (Lane 1992). Na tuto funkci TP53 existují dva mechanismy – zastavení buněčného cyklu a apoptóza (Levine 1997).

Schopnost proteinu TP53 indukovat zastavení buněčného cyklu v obou kontrolních bodech, jak v G1, tak v G2/M je spojena s jeho funkcí transkripčního regulátoru (Bunz et al. 1998). Při zastavení buněčného cyklu v G1 fázi je cílem regulace transkripce gen p21. Protein p21 se váže na množství cyklin-Cdk komplexů: cyklin D1-Cdk4, cyklin E-Cdk2, cyklin A-Cdk2, což vede k potlačení jejich kinázové aktivity. Dochází k akumulaci nefosforylovaného proteinu Rb, který zůstává asociovaný s transkripčními faktory jako např. s E2F. To má za následek, že nedochází k transkripci genů regulovaných E2F a buněčný cyklus zůstává v G1 fázi (Harper et al. 1995). Protein TP53 hraje roli i při regulaci transkripce dalších genů, které mají důležitou úlohu při zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G2/M. Pro vstup buňky do mitózy je nejdůležitější komplex cyklin B1-Cdc2, kde TP53 slouží jako regulátor transkripce cyklinu B1 (Innocente et al. 1999). K dalším z genů, které se podílejí na zastavení

buněčného cyklu v kontrolním bodě G2/M a jsou regulovány TP53, patří GADD45 a 14-3-3 sigma.

Další významnou funkcí proteinu TP53 je schopnost indukovat apoptózu. Mezi cílové geny při regulaci transkripce pro TP53 patří např. BAX. Protein BAX se při indukci apoptózy přemístí do mitochondrií, současně dochází k uvolnění cytochromu c a k aktivaci kaspázy 9, která pak spouští aktivaci kaspázové kaskády (Miyashita et Reed 1995). Dalšími z cílových genů pro protein TP53 jsou geny FAS/APO1 a KILLER/DR5. Tyto geny kódují transmembránové receptory, které zprostředkovávají aktivaci kaspáz 8 a 10, které dále aktivují další kaspázy (Owen-Schaub et al. 1995, Wu et al. 1997). K indukci apoptózy také může přispět potlačení exprese antiapoptotického genu BCL2 (Miyashita et al. 1994a).

Protein TP53 se účastní řady buněčných procesů a jeho aktivita je proto řízena mnoha mechanismy. Je to protein s krátkou životností a k prodloužení jeho životnosti a jeho akumulaci v buňkách může vést např. poškození DNA. Nejdůležitější regulátor stability proteinu TP53 je MDM2 (Momand et al. 2000). Protein MDM2 byl původně objeven jako inhibitor transkripční aktivity TP53 a nyní je známo, že se podílí na jeho rychlé degradaci. MDM2 se váže na N-konec aktivační domény TP53, a tím umožní jeho proteolýzu zprostředkovanou ubikvitinem, což přispívá k udržování nízké hladiny proteinu TP53 v buňkách (Haupt et al. 1997). MDM2 sám je pak pozitivně transkripčně regulován pomocí TP53 (Barak et al. 1993). Pokud je TP53 aktivován poškozením DNA, gen MDM2 je více přepisován, což zvyšuje degradaci TP53, a tvoří se tak negativní zpětná vazba při udržování správné hladiny proteinu TP53 v buňce.

### ***Rodina BCL2***

Proteiny BCL2 rodiny hrají v apoptóze důležitou regulační roli. Tato skupina proteinů zahrnuje členy, kteří inhibují apoptózu (BCL2, BCL-XL, MCL1) a apoptózu podporují (BAX, BAK, BAD, BID, BIK, BCL-XS). Bylo jisté, že se tyto proteiny skládají až ze čtyř BCL2 homologních (BH) domén. Členové anti-apoptotické skupiny mají všechny čtyři domény, zatímco pro-apoptotická skupina může být rozdělena do tří kategorií. Proteiny BAX a BAK obsahují domény BH1, BH2 a BH3, zatímco skupina proteinů BAD, BID, BIK mají pouze doménu BH3 (Chao et Korsmeyer 1998, Korsmeyer 1999). Protein BCL-XS tvoří vlastní skupinu, protože obsahuje domény BH3 a BH4 (Minn et al. 1998). Další charakteristikou BCL2 proteinů je jejich schopnost tvorby homo- i heterodimerů. Tvorbu heterodimerů mezi pro- a anti-apoptotickými členy těchto proteinů zajišťuje  $\alpha$ -helix BH3 domény a tím se ovlivňuje jejich další činnost (Minn et al. 1998).

BCL2 proteiny mají různé rozložení v cytoplazmě. Většina proteinů BCL2 a BCL-XL je asociována s membránami mitochondrií. Pro-apoptotické proteiny BAK, BAX, BID, BIK jsou ve své neaktivní fázi lokalizovány v cytoplazmě, po jejich aktivaci se přemísťují do mitochondrií a umožní tak uvolnění cytochromu c (Wolter et al. 1997, Shimizu et Tsujimoto 2000).

Na regulaci aktivity pro- a anti-apoptotických BCL2 proteinů existuje několik buněčných mechanismů.

Jedním z nich je schopnost členů BCL2 rodiny tvořit dimery. Například anti-apoptotické proteiny BCL2 a BCL-XL tvoří dimery s pro-apoptotickým proteinem BAX a neutralizují tím jeho aktivitu. Jako heterodimer je BAX neaktivní, ale jakmile může tvořit homodimery je schopen indukovat apoptózu (Gross et al. 1998).

Dalším mechanismem je změna poměru pro- a anti-apoptotických BCL2 proteinů. Změna exprese může inhibovat, nebo naopak podpořit apoptózu (Adams et Cory 1998). Například pokud je množství BCL2 vyšší, nebo stejné jako množství BAX, daná buňka je chráněna před apoptózou. Naopak pokud je množství BAX vyšší než BCL2 má buňka větší pravděpodobnost začít s apoptózou.

Třetí možností je, pokud jsou BCL2 proteiny fosforylovány. Například pro-apoptotický protein BAD. V nefosforylovaném stavu tvoří dimery s proteiny BCL2 a BCL-XL a neutralizuje tím jejich anti-apoptotickou aktivitu a tím umožňuje proteinu BAX, aby se sám dimerizoval (Yang et al. 1995). Pokud je však BAD fosforylován, je zablokovan proteinem 14-3-3 sigma a nemůže tak ovlivňovat a neutralizovat proteiny BCL2 a BCL-XL (Zha et al. 1996).

Funkce BCL2 proteinů může být změněna štěpením. Během apoptózy indukované přes receptor FAS bylo zjištěno, že kaspázy štěpí BCL-XL proteiny. Ty už pak dále neplní anti-apoptotickou funkci (Clem et al. 1998). Dalším ze skupiny BCL2 proteinů, který se aktivuje štěpením, je protein BID. Jeho nenaštěpená forma je neaktivní, po naštěpení kaspázou 8 indukuje BID uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Luo et al. 1998).

Také konformace BCL2 proteinů upravuje jejich aktivitu. Například protein BAX má ve své neaktivní fázi konformaci, ve které je rezistentní proti štěpení. Po aktivaci a translokaci do mitochondrií se N-konec tohoto proteinu stává přístupný ke štěpení proteázou, což svědčí o změně konformace. In vitro studie ukázaly, že konformační změny BAX jsou kontrolovány pomocí pH. V neutrálním pH je BAX rezistentní proti štěpení, v zásaditém pH se stává sensitivní. Aktivaci proteinu BAX tak předchází růst intracelulárního pH (Khaled et al. 1999).

## ***Kaspázy***

Kaspázy jsou specializované proteázy, které jsou nezbytné pro průběh apoptózy. Odlišují se od ostatních proteáz, protože pro katalýzu používají cystein a proteiny štěpí pouze za kyselinou asparagovou (Earnshaw et al. 1999). Kaspázy jsou syntetizovány jako jednoduché polypeptidové řetězce a jsou to neaktivní zymogeny. Během aktivace je polypeptidový řetězec rozštěpen na velkou a malou podjednotku, které spolu tvoří dimery. Pro plnou enzymovou aktivitu jsou nezbytné dvě velké a dvě malé podjednotky (Krammer 1999). Aktivace nastává dvěma různými mechanismy. Některé kaspázy se mohou štěpit po interakci s jinými proteiny. Například kaspáza 8 se aktivuje po asociaci s proteinem FADD, kaspáza 9 je aktivována po interakci s cytochromem c, ATP a proteinem APAF1. U druhého mechanismu jsou kaspázy štěpeny jinými kaspázami. Např. kaspázy 8 a 9 mohou štěpit a aktivovat kaspázu 3 (Boldin et al. 1996, Li et al. 1997).

V savčích tkáních bylo identifikováno přinejmenším 14 různých kaspáz, které byly rozděleny do tří kategorií. V první skupině jsou kaspázy 1, 4 a 5 uplatňující se v zánětlivých procesech (Salvesen et Dixit 1997). Druhá skupina obsahuje kaspázy 6, 8, 9 a 10. Tyto enzymy jsou považovány za signalizační kaspázy, protože mohou aktivovat jiné kaspázy a zahájit tím kaskádu (Garcia-Calvo et al. 1998). Do poslední skupiny patří kaspázy 2, 3 a 7. Tyto enzymy známé jako efektorové kaspázy, jsou štěpeny jinými kaspázami, a dále pak štěpí další buněčné komponenty. Aktivace těchto kaspáz zpravidla vede k nevratnému spuštění apoptózy (Nunez 1998).

Kaspázy jsou zodpovědné za štěpení mnoha buněčných komponent včetně jaderných proteinů, signalizačních proteinů a proteinů cytoskeletu. Štěpení těchto proteinů souvisí s dramatickými morfologickými změnami, které jsou viditelné v průběhu apoptózy. Kaspázy také štěpí enzym, který odpovídá za fragmentaci DNA a to DFF (Krammer 1999).

## ***DFF (DNA fragmentation factor)***

Jeden z biochemických znaků apoptózy je fragmentace genomické DNA. Nejdříve je chromatin štěpen na fragmenty DNA o délce 50–300 kb, které sledují strukturu chromatinových domén. Toto štěpení DNA na velké fragmenty je následováno internukleozomálním štěpením při kterém vznikají mono- a oligonukleozomové fragmenty, které se označují jako „DNA laddery“ (Arends et al. 1990, Filipski et al. 1990). Jedna z nejdůležitějších nukleáz způsobující internukleozomální fragmentaci je endonukleáza

nazývaná jako DFF (Liu et al. 1997), nebo CAD (Enari et al. 1998), nebo CPAN (Halenbeck et al 1998).

V neaktivní formě je protein DFF heterodimer složený ze dvou 40 a 45 kDa proteinových podjednotek nazývaných DFFB (DFF40) a DFFA (DFF45). DFFB je katalytická podjednotka, zatímco DFFA regulační podjednotka DFF. Lidský DFFB je bazický protein složený z 345 aminokyselin, zatímco DFFA je kyselý protein z 331 aminokyselin. DFFA má dvě rozpoznávací místa pro kaspázu 3, zbytky kyseliny asparagové 117 a 224. (Liu et al. 1997, Liu et al. 1998). DFFB i DFFA nesou na svém N-konci konzervativní doménu z 80 aminokyselin, která se uplatňuje při jejich vzájemné interakci (Lugovskoy et al. 1999). C-konec proteinu DFFB slouží jako jaderný lokalizátor a delece C-konce DFFB vede ke kompletní ztrátě enzymové aktivity (Inohara et al. 1999).

Protein DFFA navázaný na DFFB inhibuje jeho nukleázovou aktivitu. Po naštěpení DFFA kaspázou 3 je uvolněn aktivní enzym DFFB. DFFA může být štěpen i kaspázou 7, ne však kaspázou 6 a 8. DFFA hraje také dvojí roli jako inhibitor a chaperon DFFB. Expres DFFB bez současné koexpres DFFA vede k vytváření neaktivních agregátů DFFB. Z toho vyplývá, že DFFA je nutný i pro správné sdružování s DFFB během jejich syntézy (Liu et al. 1997, Liu et al. 1998).

Protein DFFB uvolněný z komplexu s DFFA tvoří homooligomery, které tvoří enzymaticky aktivní formu nukleázy. DFFB vyžaduje pro svoji činnost  $Mg^{2+}$  ionty a jako enzym má optimum v neutrálním pH. DFFB je endonukleáza specifická pro dsDNA, ne však pro ssDNA či RNA (Liu et al. 1999, Widlak et al. 2000). Aktivní DFFB pak štěpí chromatin mezi nukleozomy za vzniku mono- a oligonukleozomálních fragmentů.

Geny DFFB a DFFA jsou exprimovány ve většině tkání a buněčných linií. Po indukci apoptózy mají buňky vysokou expresi těchto genů a objevuje se fragmentace DNA (Mukae et al. 1998). Sakahira et al. (1999) uvádí, že u buněk exprimující mutovaný kaspáza-resistentní DFFA se neobjevily po indukci apoptózy ani oligonukleozomové laddery ani velké fragmenty DNA.

Degradace genomické DNA na nukleozomální fragmenty je jeden z nejlepších biochemických znaků apoptózy (Arends et al. 1990). Jedna z fyziologických funkcí apoptózy je odstranění poškozených buněk z organismů a je možné, že mechanismus fragmentace DNA během apoptózy byl vyvinut aby nedocházelo k přenosu poškozené DNA do jiných buněk, nebo k utlumení autoimunitní reakce. Bylo však také dokázáno, že buňky mohou projít apoptózou bez internukleozomálního štěpení (Oberhammer et al. 1993).

### 2.1.3 Další typy programované buněčné smrti

Typ buněčné smrti, který vykazuje morfologické znaky apoptózy i nekrózy byl nazván „aponekróza“ (Formigli et al. 2000). Buňky vykazují nekrotický fenotyp, vyžadují ale aktivaci některých genů a syntézu proteinů (Proskuryakov et al. 2003).

Sperandio et al. (2000) popsali formu programované buněčné smrti „paraptózu“, která je morfologicky i biochemicky odlišná od apoptózy. Tato buněčná smrt je řízena aktivitou kaspázy 9, nezávisle na proteinu Apaf-1. Tento typ buněčné smrti byl pozorován při rozvoji Huntingtonovy choroby a při amyotrofické laterální skleróze (Turmaine et al. 2000, Dal Canto et Gurney 1994).

Dalším typem programované buněčné smrti je neuronová buněčná smrt nezávislá na kaspázách. Oppenheim et al. (2001) popsali buněčnou smrt u vyvíjejících se savčích neuronů dokonce i po genetickém odstranění kaspáz. Volbracht et al. (2001) popisují apoptotické změny a pouze dočasnou inhibici apoptózy u neuronových buněk s inhibovanými kaspázami.

„Autofagocytóza“ je dalším typem programované buněčné smrti, podobný apoptóze. Tato buněčná smrt je charakterizována rozdělením cytoplasmy a organel do dvou- až multimembránových měchýřků. Tyto měchýřky jsou dopraveny do lyzozómů ve vlastní buňce a následně degradovány (Noda et al. 2002). Mechanismus a morfologie autofagocytózy je stejný i u tak rozdílných skupin organismů jako jsou rostliny, zvířata a houby a je závislý jak na kontinuální syntéze proteinů, tak i nepřetržité přítomnosti ATP.

## 2.2 Molekulární detekce genové exprese

Mnoho buněčných procesů, které se týkají růstů, diferenciaci a přežívání buňky se odráží ve změnách genové exprese. Změny v expresi genů a kvantifikace genové exprese proto byla vždy v zájmu výzkumu. Pro stanovení genové exprese mohou být využívány metody semikvantitativní jako jsou northern blotting, in situ hybridizace, cDNA arrays, reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR). V současné době je hojně využívána kvantitativní metoda tzv. real-time RT-PCR.

### 2.2.1 Izolace RNA

Pro všechny techniky používané k analýze genové exprese je rozhodující kvalita izolované RNA. Příprava neporušené buněčné RNA, nebo mRNA je prvním krokem k úspěšné genové kvantifikaci. Pro věrohodné diagnostické použití metody real-time RT-PCR je potřebná RNA o vysoké kvalitě a bez zbytků DNA. Většina izolátů však bývá kontaminována DNA a proteiny, proto je nutné ošetřit vzorky RNA komerčně dostupnou DNázou bez RNáz, která odstraní zbytky DNA. RNA a hlavně dlouhá mRNA, delší než 10 kb, velmi snadno degraduje činností RNáz a proto je nutná opatrnost při manipulaci s tkáněmi, při samotné izolaci RNA, nebo jejím skladování (Swift et al. 2000, Mannhalter et al. 2000).

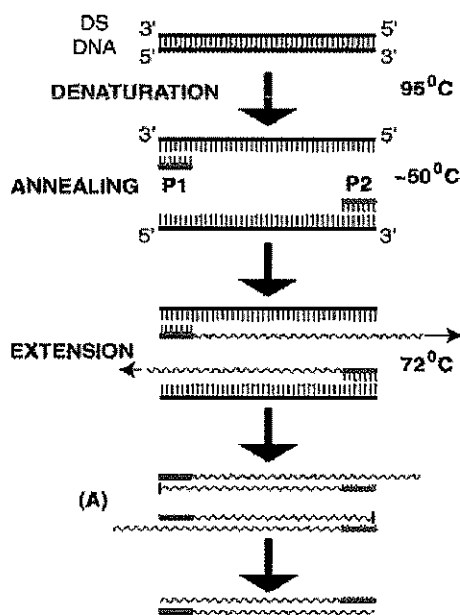
### 2.2.2 Reverzní transkripce

Druhým důležitým krokem při analýze genové exprese je vytvoření jednořetězcové komplementární DNA kopie (cDNA), podle RNA řetězce, reverzní transkripcí (RT). Dynamika, senzitivita a specifita této reakce je základním předpokladem pro úspěšnou real-time RT-PCR. Reverzní transkripce přitom bývá zdrojem největší variability v experimentech při real-time RT-PCR. Reakce musí být dobře optimalizovaná, zbytky solí, alkoholu, fenolu a jiných látek mohou inhibovat reakci a snižovat tak její efektivitu (Fuchs et al. 1999, Swabe et al. 2000). Dalším důležitým krokem je výběr primerů pro RT. Primery mohou být genově specifické, jejich použití eliminuje vznik nežádoucích transkriptů, pro každý gen se však musí dělat zvlášť reverzní transkripce (Raja et al. 2000). Druhově nespecifické primery mohou být náhodné hexamery, nebo poly-T oligonukleotidy, které se připojují na polyadenylový 3' (poly-A) konec mRNA. Takto vytvořená cDNA je využitelná pro kvantifikaci mnoha genů a výsledky kvantifikace genové exprese získané ze stejné RT jsou pak lépe srovnatelné (Freeman et al. 1999).



### 2.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) vyvinutá v 80. letech Kary Mullisem (Saiki et al. 1985), je metoda enzymatického zmnožení nukleových kyselin v cyklickém procesu, ve kterém vzniká velké množství identických kopií templátové DNA. Pro průběh reakce je nutná přítomnost DNA templátu, jednořetězcové i dvouřetězcové, dva oligonukleotidové primery, které ohraničují sekvenci DNA, která má být amplifikována, směs čtyř nukleotid trifosfátů, termostabilní polymeráza,  $Mg^{2+}$  ionty a reakční pufr. Průběh reakce spočívá v cyklickém opakování tří teplotních kroků (Obr. 4). První teplotní krok je denaturace, při které musí dojít k oddělení dvou řetězců DNA. Pro denuraci je nutná teplota  $95^{\circ}C$  a trvání denaturace závisí na délce templátu. Druhým teplotním krokem je annealing, jehož teplota závisí na teplotě tání primerů a měla by být několik stupňů nižší. Posledním krokem je extenze, která probíhá kolem  $72^{\circ}C$ , což je optimální teplota pro funkci Taq polymerázy (Kubista et al. 2006). Zdá se však, že tato teplota není úplně nezbytná, protože při některých aplikacích založených na práci s Taqman sondami probíhá extenze při  $60^{\circ}C$  (Holland et al. 1991).



Obr. 4 Průběh PCR reakce

(<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>)

### 2.2.4 Real-time PCR

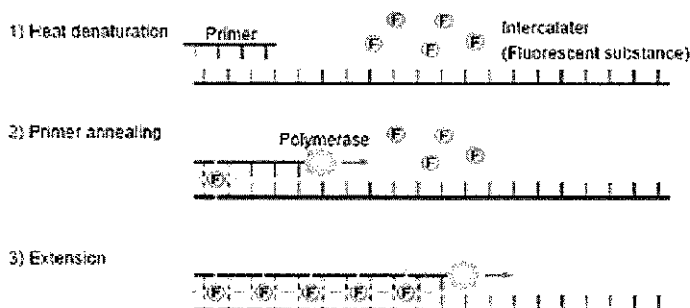
Tato nová metoda je modifikací Polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR je vhodná metoda pro pozdější manipulace s DNA jako je klonování, genetické inženýrství a sekvenování. Jako analytická metoda má však klasická PCR svá omezení. Po amplifikaci

DNA a analýze produktu je obtížné provést kvantifikaci, protože po PCR vzniká v podstatě stejné množství molekul, nezávisle na původním množství templátové DNA. Tento nedostatek byl vyřešen v roce 1992 zavedením real-time PCR (Higuchi et al. 1992). Při real-time PCR je množství vznikajících produktů v průběhu reakce přímo úměrné fluorescenčnímu záření vznikající pomocí fluorescence barev, nebo sond, přidaných do reakce. Množství vznikajících produktů je monitorováno a za předpokladu, že v každém amplifikačním cyklu se zdvojnásobí počet molekul, je možné dopočítat původní množství DNA molekul amplifikované sekvence ve vzorku (Kubista et al. 2006). Mezi typické aplikace real-time PCR patří detekce patogenů, analýza genové exprese, analýza SNP a detekce proteinů pomocí real-time immuno PCR. Při analýze genové exprese musí real-time PCR reakci předcházet reverzní transkripce, reakce se pak označuje real-time RT-PCR.

#### 2.2.4.1 Fluorescenční značení

##### ***Nespecifická barviva***

Pro fluorescenční značení se používají jak specifické sondy tak nespecifická barviva. Ve své původní práci použil Higuchi et al. (1992) běžné barvivo nukleových kyselin ethidium bromid, které vyzařuje fluorescenční záření po interkalaci do DNA řetězce. V současné době jsou z nespecifických barviv nejvíce populární interkalační barviva SYBER Green a BEBO (Zipper et al. 2004, Bengtsson et al. 2003). Tyto barviva nevydávají fluorescenční záření pokud jsou volně v roztoku, jen pokud se vmezeří do DNA řetězce (Obr. 5). Těto vlastnosti se využívá při real-time PCR. Jak se zvyšuje množství DNA ve vzorku v průběhu amplifikace, tak se zvyšuje i fluorescenční signál. Nevýhodou těchto nespecifických barviv je, že se vážou na jakoukoliv dvouřetězcovou DNA, proto je nutné zabránit vzniku nežádoucích formací, např. dimery primerů (Kubista et al. 2006).



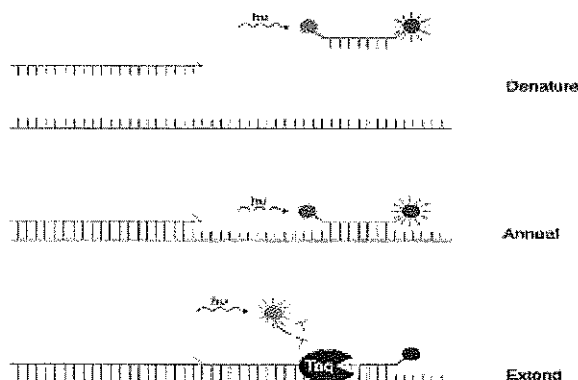
Obr. 5 Real-time PCR s fluorescenčním barvivem SYBER Green ([http://www.takarabiosa.com/html/PCR\\_RTPCR\\_INTRO.html](http://www.takarabiosa.com/html/PCR_RTPCR_INTRO.html))

### *Sekvenčně specifická barviva*

Jako sekvenčně specifická barviva se označují oligonukleotidy, značené buď dvěma nebo jednou fluorescenční barvou. Do první skupiny patří sondy jejichž barviva vytváří pár donor-akceptor, kde po excitaci donorového barviva je energie přenesena na akceptorovou molekulu. Mezi nejpoužívanější patří hydrolytické sondy, nazývané také Taqman sondy (Holland et al. 1991), Molecular Beacons (Tyagi et Kramer 1996), hybridizační sondy nazývané také FRET sondy (Caplin et al. 1999) a další. Do druhé skupiny patří např. LightUp sondy (Svanvik et al. 2000).

### *Taqman sondy*

Tyto sondy tvoří krátké oligonukleotidy s fluorescenční barvou připojenou na 5' konci, označovanou jako reporter a s molekulou zhasěče připojenou na 3' konci. Protože je sonda pouze 15-25 bp dlouhá, fluorescenční barva i zhasěč jsou blízko u sebe a proto je detekováno pouze nízké fluorescenční záření. V průběhu PCR Taq DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec a svojí exonuleázovou aktivitou degraduje sondu a uvolní tak fluorescenční barvu od zhasěče. Každý cyklus je pak zaznamenáno zvyšující se fluorescenční záření (Obr. 6).



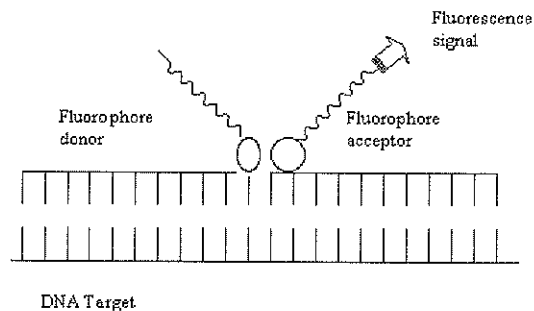
Obr. 6 Real-time PCR s Taqman sondou

([http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp\\_gp/cvn\\_gp\\_how.html](http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp_gp/cvn_gp_how.html))

### *FRET sonda*

FRET sondy pracují na principu přenosu energie z jedné fluorescenční barvy na druhou. Fluorescenční barvy jsou připojené na dvou sekvenčně specifických oligonukleotidech, molekula donoru je na 3' konci první sondy, molekula akceptoru na 5' konci druhé sondy. Sondy jsou navrženy tak, aby hybridizovaly velmi blízko sebe a mohlo tak dojít k přenosu energie mezi donorovou a akceptorovou molekulou, která pak emituje

signál o jiné vlnové délce. Fluorescenci je tedy možné detekovat pouze při hybridizaci obou sond (Obr. 7).

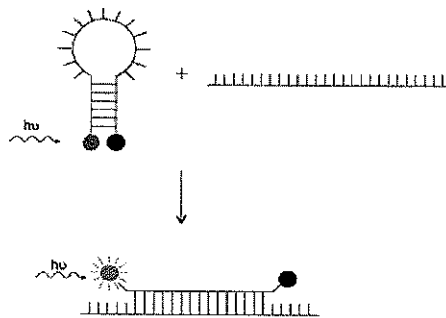


Obr. 7 Princip FRET sond

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/gaikovitch-elena-a-2003-07-14/HTML/chapter2.html>)

### *Molecular Beacon*

Tyto sondy mají vlásečkovou strukturu s fluorescenční barvou na jednom konci a zhasičem na druhém konci. Tuto strukturu sonda tvoří, pokud neproběhla její hybridizace na DNA a fluorescenční záření tak není emitováno. Jestliže sonda hybridizuje k templátové DNA, vlásečková struktura zmizí a dochází k fluorescenčnímu záření (Obr. 8).



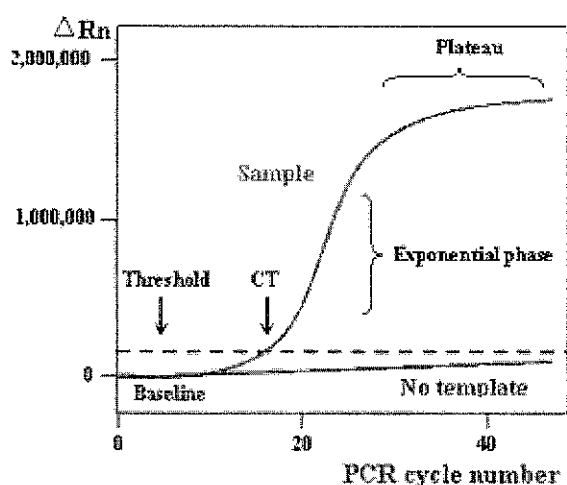
Obr. 8 Princip sond Molecular beacon

([http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp\\_gp/cvn\\_gp\\_how.html](http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp_gp/cvn_gp_how.html))

### 2.2.4.2 Monitorování PCR v reálném čase

Pro real-time PCR je nezbytné fluorescenční záření, které odráží množství vznikajících produktů. Během prvních cyklů je signál slabý a není možné ho odlišit od pozadí. Jak se postupně kumuluje množství produktů, fluorescenční signál začne exponenciálně narůstat. Po určité době se exponenciální růst zastaví pravděpodobně z důvodu

vyčerpání některé důležité součásti reakce (Obr.9). Mohou to být primery, barvivo, směs nukleotidů, nebo i polymeráza. Je typické, že tato saturace nastává u všech vzorků současně. Proto je nemožné u klasické PCR zjistit počáteční množství cílových molekul DNA. U real-time PCR však lze u jednotlivých vzorků rozlišit různý počátek exponenciální fáze a tento rozdílný nástup odráží odlišné množství templátové DNA. Množství amplifikačních cyklů, které jednotlivé vzorky potřebují, aby dosáhly tzv. thresholdu (tj. prahového fluorescenčního signálu) se označuje jako Ct hodnota. Tato Ct hodnota se pak využívá ke kvantifikaci rozdílu mezi jednotlivými vzorky (Kubista et al. 2006). Ke stanovení thresholdu využívají programy přístrojů různé algoritmy, lze však stanovit i manuálně.



Obr. 9 Průběh exponenciální křivky při real-time PCR

(<http://www.rt-pcr.com/>)

#### 2.2.4.3 Analýza kvantitativních dat

V závislosti na cílech a dalších aplikacích analýzy se získaná kvantitativní data vyhodnocují buď absolutní kvantifikací, nebo relativní kvantifikací.

##### ***Absolutní kvantifikace***

Při absolutní kvantifikaci se neznámé vzorky porovnávají s kalibrační křivkou. Jako standardy se pak označují vzorky se známou koncentrací DNA. Pro standardy platí, že by měly být amplifikovány stejnými primery jako neznámé vzorky a se stejnou efektivitou. Koncentrace standardů také musí být stanovena velmi přesně. Absolutní kvantifikace se však pro kvantifikaci genové exprese nepoužívá.

### ***Relativní kvantifikace***

Termín relativní kvantifikace se používá tehdy pokud není výsledkem absolutní číslo, tj. počet kopií, ale poměr (tzv. normalizace dat). Tento poměr se dále používá k výpočtu rozdílu v genové expresi.

Normalizace dat se může provádět vztahením k celkovému obsahu buněčné RNA. Tato metoda vyžaduje přesnou kvantifikaci izolované RNA, nebo mRNA. Obsah RNA však může být v jednotlivých buňkách či tkáních variabilní a může se měnit i vlivem experimentálních podmínek (Bustin 2002).

Více používaná metoda je normalizace dat k vybranému referenčnímu genu. Pro všechny vzorky v experimentu pak musí být provedena další real-time RT-PCR reakce pro daný referenční gen. Pro každý cílový gen je pak vypočítán relativní poměr k tomuto genu. Velmi důležitým krokem pak je správný výběr referenčního genu. Základním předpokladem je, aby se jeho exprese neměnila vlivem vnějších podmínek. Běžně jsou používány housekeepingové geny jako GAPDH,  $\beta$ -aktin,  $\beta$ -2-mikroglobulin, PBGD, 18S rRNA a 28S rRNA, protože jsou to geny nezbytné pro buněčné přežití a vyskytují se ve všech typech buněk (Vandesompele et al. 2002, Goidin et al. 2001, Pfaffl et al. 2004). Mnoho studií však ukázalo, že i tyto housekeeping geny jsou regulovány a jejich exprese se mění vlivem experimentálních podmínek (Goidin et al. 2001, Schmittgen et Zajkrajsek 2000). Pravděpodobně tedy neexistuje univerzální referenční gen s konstantní expresí ve všech tkáních a výběr tohoto genu musí být proveden individuálně (Bustin 2000).

### ***Výpočet relativní kvantifikace***

Pro výpočet relativní kvantifikace existují dva nejčastěji používané výpočty a to srovnávací  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoda (Livak et Schmittgen 2001) a druhá metoda, která započítává i efektivitu jednotlivých reakcí, relativní kvantitativní analýza (Pfaffl 2001).

## 2.3 Kvantifikace genové exprese v průběhu apoptózy

Po indukci apoptózy v buňkách dochází k expresi mnoha genů řídících tento děj. Pomocí kvantifikace genové exprese, či zjištění změn v expresi těchto genů, lze vyvodit různé poznatky, týkající se jak samotné apoptózy, tak i např. citlivosti jednotlivých nádorových buněčných linií či přímo nádorových buněk pacientů na běžně používaná cytostatika.

### 2.3.1 Kvantifikace genové exprese u buněčných linií

Vlivem cytostatik na expresi apoptotických genů se zabývali např. Ikeguchi et al. (2002a), kteří ovlivnili buněčné linie MKN-45, LoVo a PANC-1 Cisplatinou (CDDP) po dobu 0, 8, 12, 24 hod a sledovali expresi genů BAX, BCL2 a Survivin metodou real-time RT-PCR. U buněčné linie MKN-45 se statisticky významně zvýšila exprese genu BAX po 24 hod. V expresi genů BCL2, Survivin nebyly statisticky významné rozdíly. U buněčné linie LoVo, došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu BAX po 12 hod a 24 hod. U genu BCL2 statisticky významné snížení exprese po 24 hod, Survivin beze změny. U buněčné linie PANC-1 gen BAX beze změny, BCL2 statisticky významné zvýšení exprese po 12 hod a 24 hod, Survivin statisticky významné zvýšení exprese po 12 hod a 24 hod.

Buňky buněčných linií IMR90 a SV40 byly ovlivněné pomocí 5-FU po dobu 5 dní. Poměr exprese genů BCL2/BAX byl snížen jako odpověď na působení 5-FU u IMR90 buněk (Suzuki et al. 1999).

Brown et Dunmore (2007) indukovali apoptózu u BRIN-BD 11 buněk a k některým přidali leptin. Metodou real-time RT-PCR měřili expresi genů BCL2 a BAX. Přidání leptinu zabránilo vzniku apoptózy, což korelovalo i se zvýšením exprese genu BCL2.

Buňky buněčné linie odvozené od karcinomu jícnu (OE-19) byly ovlivněné simvastatinem. Metodou real-time RT-PCR bylo naměřeno snížení exprese genu BCL2 a zvýšení exprese genu BAX (Konturek et al. 2007).

Působením LPS (lipopolysacharid) na psí neutrofilu byla oddálena apoptóza. Pomocí real-time RT-PCR byla měřena hladina genů BCL-XL, BCL2, MCL1 a BAX. Po 9 hod byla výrazně zvýšena exprese antiapoptického genu BCL-XL (Sano et al. 2005).

Působením SO<sub>2</sub> o různých koncentracích 6 hod denně po dobu 7 dní způsobilo výrazné zvýšení exprese genů TP53 a BAX u jaterních buněk krysy, naopak došlo ke snížení exprese genu BCL2 (Bai et Meng 2005).

Xing et al. (2008) indukovali apoptózu u buněk karcinomu žaludku látkou LY2940002. Metodou real-time RT-PCR bylo naměřeno zvýšení exprese genů TP53 a PUMA.

Boley et al. (2002) vystavili dvě skupiny myši, TP53<sup>+/+</sup> homozygoty a TP53<sup>+/-</sup> heterozygoty, působení benzenu (100 ppm) 3x týdně 10 hodin po dobu 15 týdnů. Z kostní dřeně pak byla izolována mRNA a metodou real-time RT-PCR měřena exprese genů. Množství TP53 bylo signifikantně vyšší u homozygotů než u heterozygotů. Kvantitativní analýza genu BAX pak ukázala, že v buňkách kostní dřeně ovlivněných homozygotů je téměř dvakrát tolik mRNA než u buněk kostní dřeně heterozygotních myši. Gen BCL2 byl pouze mírně snížen u TP53<sup>+/+</sup> ve srovnání s TP53<sup>+/-</sup>.

Buňky buněčné linie RT4 byly ovlivněny silibininem po dobu 24 hod a 48 hod a byly použity různé koncentrace silibininu (0, 50, 100 a 200 μM). Hladina exprese Survivinu byla zjišťována pomocí real-time RT-PCR. Po 24 hod došlo ke 41 %, 53 % a úplnému vymizení mRNA Survivinu při 50, 100 a 200 μM koncentraci silibininu. Po 48 hod došlo pouze k 8 % a 28 % snížení hladiny mRNA Survivinu při koncentracích 50 a 100 μM, při koncentraci 200 μM došlo ke kompletnímu vymizení (Tyagi et al. 2003).

Sabbagh et al. (2004) indukovali apoptózu u buněk buněčné linie KOX-14 přes receptor TCR. Kvantifikace mRNA byla provedena pro kaspázy 2, 3, 6, 7 a 8. Pouze u kaspázy 3 bylo sledováno zvýšení mRNA. Metodou real-time RT-PCR bylo naměřeno 2,5 násobné zvýšení mRNA kaspázy 3 po 4 hod od ligace TCR.

Singh et al. (2006) indukovali apoptózu u Hep-2 buněk karboplatinou a 5-fluorouracilem (5-FU). Apoptózu předcházely pokles hladiny proteinu BCL2, aktivace kaspázy 9 a naštěpení proteinu PARP, protein BAX zůstal beze změny. Další analýza odhalila i pokles mRNA genu BCL2.

Floros et al. (2006a) ovlivnili buňky buněčné linie HL-60 etoposidem. Metodou RT-PCR pak byla sledována exprese genů BCL2, BAX, FAS, kaspázy 3 a BCL2L12. Po 4 hod ovlivnění byla naměřena snížená exprese genu BCL2L12 a ve stejném čase bylo sledováno zvýšení exprese BAX. U ostatních genů nebyla změna detekována.

Malerba et al. (2005) indukovali apoptózu etoposidem a taxolem u HL-60 buněk a u buněk kostní dřeně. Metodou Western blot byla u buněk kostní dřeně zjištěna zvýšená exprese proteinů TP53 a BCL-X po působení etoposidu, zatímco taxol stimuloval expresi BAX. U buněčné linie HL-60 nebyla zaznamenána žádná změna v expresi těchto proteinů.

Floros et al. (2006b) sledovali u buněk buněčné linie HL-60 změny exprese genů po ovlivnění topotecanem a methotrexatem metodou RT-PCR. U buněk ovlivněných



topotecanem bylo sledováno snížení exprese genů BCL2L12, BCL2 a FAS. Po ovlivnění methotrexatem došlo ke snížení exprese BCL2 a FAS.

Rózalski et al. (2005) indukovali apoptózu u HL-60 buněk pomocí amifostinu samotného a amifostinu v kombinaci s doxorubicinem, cytarabinem a etoposidem. Exprese byla sledována metodou RT-PCR u genů BCL2, BAX a p65. Snížení exprese genu BCL2 a zvýšení exprese BAX a p65 bylo sledováno u buněk po ovlivnění doxorubicinem a amifostinem.

Floros et al. (2004) u buněk buněčné linie HL-60 indukovali apoptózu pomocí doxorubicinu a karboplatiny a metodou RT-PCR sledovali expresi genů BCL2, BAX, FAS, kaspázy 3, kaspázy 9 a BCL2L12. Zvýšení exprese genů FAS, BCL2L12 a kaspázy 3 bylo pozorováno po 3 hod a 6 hod po ovlivnění karboplatinou. Po 12 hod byl pozorován pokles exprese těchto genů. Zvýšení exprese u stejných genů bylo pozorováno i u buněk ovlivněných doxorubicinem po dobu 6 hod. Pokles exprese byl pozorován u genů BAX, BCL2 a kaspázy 9 po ovlivnění karboplatinou, zatímco po ovlivnění doxorubicinem se exprese nezměnila.

Floros et al. (2003) metodou RT-PCR měřili expresi genů BCL2 a BCL2L12 u buněčné linie HL-60 po indukci apoptózy cisplatinou. Exprese genu BCL2 se kontinuálně snižovala, zatímco exprese genu BCL2L12 se zvýšila po 3 hod a 6 hod. Ke snížení exprese pak došlo až po 12 hodinách ovlivnění.

Pan et al. (2003) indukovali apoptózu u buněčné linie COLO 205 pomocí HDB. Nejnižší viabilita buněk byla po působení HDB při 100  $\mu$ M koncentraci po 48 hod. Buňky byly ovlivněné HDB s touto koncentrací po dobu 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 hod. Exprese byla měřena metodou Western blot a po 8 hod byla naměřena zvýšená exprese proteinů Cyklin D3, p21 a BAX. Naopak snížena byla u proteinu BCL-XL a nezměněna zůstala u BCL2 a BAD.

Iguchi et al. (2002) ovlivnili buněčné linie HL-60, Jurkat, Molt-4 a NALL-1 etoposidem a neocarzinostatinem (NCS) po dobu 24 hod při koncentracích 0.01, 0.1, 1 a 10  $\mu$ g/ml. NCS byl u těchto buněčných linií účinnější při indukci apoptózy. U buněk Molt-4 se netvořily typické laddery z DNA jako u ostatních linií. Při stanovení exprese proteinů DFFB a DFFA však nebyly zjištěny rozdíly v porovnání s ostatními liniemi.

Singh et al. (2003) stanovili expresi proteinů DFFA, BCL2, BCL-XL a BAX metodou Western blot u buněk vyvíjejícího se mozečku krys při hypothyroidních podmínkách. Exprese proapoptotických proteinů BCL2, BCL-XL byla snížena, exprese antiapoptotického BAX zvýšena. Byla také zjištěna výrazná fragmentace DNA a naštěpené produkty DFFA u těchto buněk ve srovnání s kontrolou.

### 2.3.2 Kvantifikace exprese u tkání pacientů

Mnoho prací se také zabývá porovnáváním exprese těchto genů ve zdravé tkáni od pacienta ve srovnání s nádorovými buňkami. Ikeguchi et al. (2002b) porovnávali rakovinné buňky jater od 53 pacientů, buňky ještě zdravé tkáně a buňky zdravých jater od 5 pacientů. Rozdíl v expresi u těchto tří skupin nebyl statisticky významný u genů BCL2/BAX. Zato poměr exprese Survivin/GAPDH byl statisticky významně vyšší u pacientů s rakovinou než u zdravých. Navíc pacienti s vysokým poměrem Survivin/GAPDH měli vyšší výskyt recidivy.

Thomas et al. (2002) odebrali 10 lidem buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu, které byly určené k transplantaci. Poté byl měřen počet kopií mRNA genu BAX, který statisticky významně převyšoval počet kopií genu BCL2. To zřejmě souvisí s nízkou úspěšností transplantace těchto buněk.

McDonald et al. (2005) sledovali exprese genů p73, DFFA, DFFB, TNFRSF9 a TNFRSF25 u buněk oligodendrogliomu. Bylo srovnáno 13 vzorků s delecí p raménka u 1. chromozomu se vzorky bez delece. Pouze u genu DFFB byla zjištěna snížená exprese. Exprese byla snížena i ve srovnání s normálními mozkovými buňkami.

Mahmoud-Ahmed et al. (2006) sledovali změny v expresi genů pomocí microarrays u mozkových buněk myši. Analýzy byly dělané po 0,25, 1, 5 a 24 hod po ozáření 20 Gy a po 5 hod při ozáření 0, 2, 10 Gy. Pro další analýzu pomocí real-time RT-PCR byly vybrány geny Jak3, DFFB, Nsep1, Terf1. Zvýšená exprese genu DFFB byla pozorována již 1 hod po ozáření.

Nakagawa et al. (2003) u buněk akutní lymfoblastická leukémie (ALL) a u buněk chronické lymfoblastické leukémie (CLL) sledovali exprese genů Survivin a dalších genů IAP rodiny. Statisticky významný rozdíl v expresi byl u genu Survivin a cIAP2 u buněk CLL ve srovnání s kontrolou. U buněk ALL byla vyšší exprese, ale pouze u některých vzorků.

Ikeguchi et Kaibara (2002) odebrali od 57 pacientů s karcinomem jícnu nádorovou tkáň a přilehlou nenádorovou tkáň a sledovali expresi genu Survivin u těchto tkání. U nádorové tkáně byla statisticky významně vyšší exprese než u nenádorové. Navíc pacienti s vysokou expresí Survivinu měli horší prognózu než ti s nižší expresí. Survivin se tak jeví jako dobrý prognostický marker pro tento typ rakoviny.

Takeuchi et al. (2005) u 63 pacientů s metastazujícím melanomem měřili expresi genů Survivin a Livin. Nízká hladina Survivinu statisticky signifikantně korelovala s celkovým vyšším přežitím.

Křepela et al. (2006) měřili expresi genů Apaf-1, prokaspázy 9, 3, 6 a 7 a Smac u buněk NSCLC pomocí real-time RT-PCR. Tkáň byla odebrána od 65 pacientů a exprese byla měřena u buněk karcinomu i u zdravé tkáně. Exprese prokaspázy 9, 3, 6 byla statisticky významně vyšší v porovnání se zdravou tkání plic. Exprese Apaf-1 byla signifikantně nižší, exprese prokaspázy 7 beze změn.

Křepela et al. (2004) sledovali expresi genů Apaf-1, prokaspázy 3, 7 a 9 u buněk nemalobuněčného bronchogenního karcinomu. Byla zvýšena exprese u genů Apaf-1 a prokaspázy 3, ne však u prokaspázy 7 a 9, u buněk karcinomu v porovnání s normálními buňkami plic.

Metodou real-time RT-PCR byla měřena exprese genů TP53, BCL2 a BAX v buňkách metastází nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Bylo zjištěno, že existuje velká variabilita v expresi těchto genů (Stark et al. 2007).

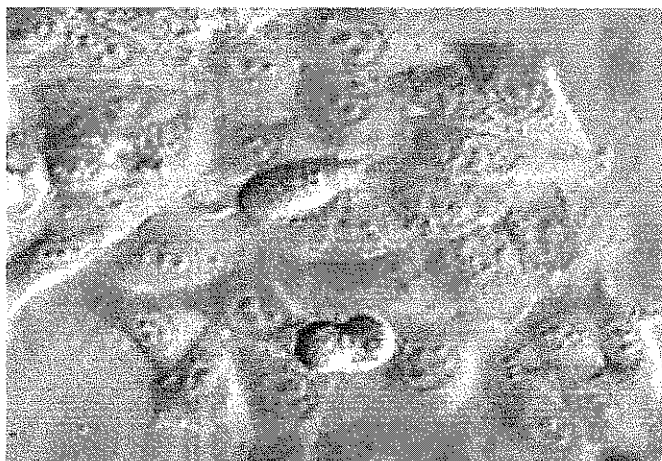
Stark et al. (2006) metodou real-time RT-PCR srovnávali expresi genů TP53, BCL2 a BAX v buňkách karcinomu prsu a v buňkách z metastází v mozku. Exprese genu BCL2, BAX a TP53 byla signifikantně nižší v buňkách metastází ve srovnání s primárním nádorem.

## 2.4 Buněčné linie Hep-2 a HL-60

### 2.4.1 Buněčná linie Hep-2

Stabilizovaná buněčná linie Hep-2 (Obr. 10) je odvozená z epitelových buněk primárního nádoru hrtanu 56-letého muže. Buněčná linie a kultivační podmínky byly popsány v práci Moore et al. (1955). Tyto buňky rostou přisedle na dně kultivační láhve a mohou být lehce uvolněny trypsinem.

Zdrojem buněčné linie Hep-2 pro tuto práci byla Evropská Sběrka buněčných kultur (ECACC), která garantuje autenticitu buněk. V některých pracích jsou tyto buňky považovány za deriváty HeLa buněk, od kterých jsou neodlišitelné jak morfologicky, tak i tím, že mají totožný DNA fingerprint a osahují markerové chromozomy HeLa buněk. Vzhledem k využití Hep-2 buněk v této práci jako modelové buněčné linie však tyto diskuze nebyly podstatné.



Obr. 10 Buněčná linie Hep-2

(<http://arthritis-research.com/content/4/4/R3/figure/F1>)

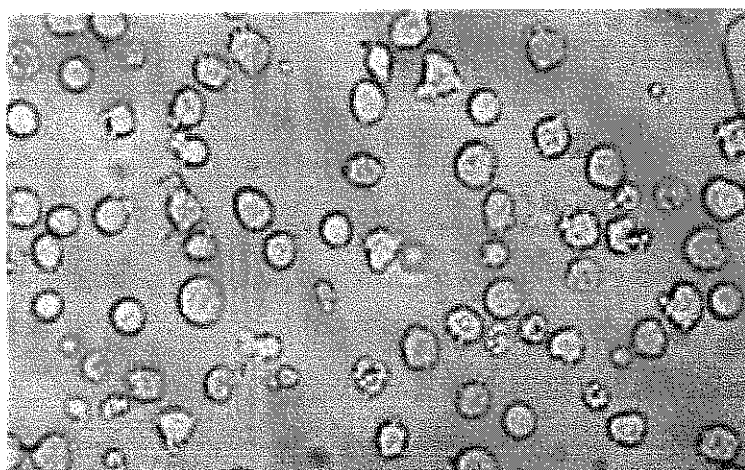
### Indukce apoptózy u Hep-2 buněk

Při indukci apoptózy etoposidem lze sledovat typické morfologické projevy jako je zakulacení buněk a tvorba pseudopodií. Později se objevuje tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány, kondenzace chromatinu a tvorba DNA laderů (Červinka et al. 1999, Rudolf et al. 2000a, Rudolf et Červinka 2005). Imunofluorescencí byla také detekována aktivní kaspáza 3 a pomocí imunofluorescenčního značení bylo zjištěno, že na tvorbě puchýřků se podílejí mikrofilamenta (Červinka et al. 2004). Indukcí apoptózy etoposidem u Hep-2 buněk se také zabývali Duran et al. (2000). Apoptózu u Hep-2 buněk lze indukovat

i jinými látkami jako je  $K_2CrO_4$ , nebo capthotecinem. I zde je možné pozorovat kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA či aktivaci kaspázy 3 (Rudolf et al. 2000b, Rudolf et al. 2004). Ramírez-Sandoval et al. (2003) také pozorovali kromě morfologických projevů přemístění proteinu BAX do mitochondrií. Po indukci apoptózy u Hep-2 buněk mutantem viru Herpes simplex bylo pozorována aktivace kaspázy 3 a 9, uvolnění cytochromu c, kondenzace chromatinu a fragmentace DNA (Galvan et al. 2000, Aubert et al. 2007). Singh et al. (2006) indukovali apoptózu u Hep-2 buněk karboplatinou a 5-fluorouracilem (5-FU). Apoptózu předcházela pokles hladiny proteinu BCL2, aktivace kaspázy 9 a naštěpení PARP, exprese proteinu BAX zůstala beze změny. Apoptózu u Hep-2 buněk indukoval i zinek. V buňkách byla pozorována aktivace proteinu TP53, uvolnění cytochromu c a AIF z mitochondrií i jejich přemístění do cytoplazmy. Došlo i ke ztrátě membránového potenciálu mitochondrií (Rudolf et al. 2005).

#### 2.4.2 Buněčná linie HL-60

Tato stabilizovaná buněčná linie byla popsána v roce 1979 v práci Gallagher et al. a popisuje buňky odvozené z akutní myeloidní leukémie 36-leté ženy. Buňky této buněčné linie rostou v suspenzi jako jednotlivé buňky, bez tendence adherovat ke stěnám kultivační nádoby (Obr. 11). Buňky jsou většinou zakulacené až ovoidní a příležitostně tvoří pseudopodia. Buněčná linie HL-60 také neexprimuje gen TP53 (Malerba et al. 2005, Higginbottom et al. 2007). Zdrojem buněčné linie HL-60 pro tuto práci byla Evropská Sběrka buněčných kultur (ECACC), která garantuje autenticitu buněk.



Obr. 11 Buněčná linie HL-60  
(Gallagher et al. 1979)

### Indukce apoptózy u HL-60 buněk

Apoptózu u HL-60 buněk lze indukovat různými látkami. Rudolf et Červinka (2005) popsali typické morfologické znaky jako tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány a kondenzace chromatinu po ovlivnění buněk etoposidem. Další autoři (Floros et al. 2006a) sledovali po indukci apoptózy etoposidem expresi genů BCL2, BAX, FAS, kaspázy 3 a BCL2L12. Bjorling-Poulsen et Issinger (2003) indukovali apoptózu etoposidem a změny v expresi genů sledovali pomocí cDNA array. U HL-60 buněk také pozorovali morfologické znaky jako tvorba puchýřků, apoptotických tělísek a typické DNA laddery na gelové elektroforéze. Typické morfologické znaky po indukci apoptózy etoposidem pozorovali i Kravtsov et al. (1999). Indukcí apoptózy u HL-60 buněk etoposidem se dále zabývali Grzanka et Grzanka (2003), Zuryn et al. (2007) a Navakauskiene et al. (2004). Indukci apoptózy topotecanem a methotrexatem a expresi apoptotických genů sledovali Floros et al. (2006b), doxorubicinem a karboplatinou Floros et al. (2004), cisplatinou (Floros et al. 2003). Rudolf et al. (2000b) popsali kondenzaci chromatinu a tvorbu DNA ladderů po indukci apoptózy látkou  $K_2CrO_4$ .

## 2.5 Etoposid

Etoposid je jeden z nejčastěji používaných protinádorových léků ve světě. Je používán k léčbě mnoha typů rakovin např. malobuněčného plicního karcinomu, sarkomů, leukémií a lymfomů. Primárním cílem v buňkách je pro etoposid topoizomeráza II. Tento nepostradatelný enzym odstraňuje zauzlení a překřížení v genomu vytvářením přechodných zlomů v dvouřetězcové DNA. Etoposid se váže a stabilizuje komplex tohoto enzymu a DNA (tzv. štěpící komplex). To vede k akumulaci těchto komplexů a vytváření trvalých zlomů v genetickém materiálu.

Etoposid (4' - demethyl - epipodophyllotoxin 9 - [4, 6 - O -(R) - ethylidene - beta - D -glucopyranoside], 4' -(dihydrogen phosphate)) je odvozen od podofylotoxinu, látky obsažené v rostlině *Podophyllum peltatum* (Noholist štítnatý), která byla používána v lidovém léčitelství. Vlastnosti této látky jsou antimitotické a její účinek je v zabránění polymerizace tubulinu. V 60-tých letech pak byly vytvořeny semi-syntetické deriváty podofylotoxinu etoposid a teniposid, které nebyly tak toxické a měly vyšší protirakovinné účinky (Stähelin et von Wartburg 1991). Etoposid nemá schopnost zabránit polymerizaci tubulinu a až v polovině 80-tých let bylo objeveno, že primární buněčný cíl pro etoposid je topoizomeráza II (Yang et al. 1985).

Topoizomeráza II je všudypřítomný enzym, který reguluje topologii DNA tím, že vytváří ve dvouřetězcové DNA přechodné zlomy a vytváří tím oddělené segmenty DNA (Burden et Osheroﬀ 1998, Fortune et Osheroﬀ 2000). Obratlovci mají dvě izoformy tohoto enzymu topoizomerázu II  $\alpha$  a  $\beta$  (Drake et al. 1989). Hladina topoizomerázy II  $\alpha$  dramaticky narůstá během buněčného růstu a tato izoforma je zodpovědná za funkci topoizomerázy II během replikace DNA a mitózy (Woessner et al. 1991). Izoforma  $\alpha$  byla původně popsána u obratlovců a obecně je považována za enzym charakterizovaný jako topoizomeráza II.

Topoizomeráza II vytváří spolu s DNA tzv. „štěpící komplex“ a během celého katalytického procesu dochází k rozštěpení a znovuspojení dvouřetězcové DNA. Díky tomuto mechanismu může topoizomeráza II uvolnit svinutí řetězce DNA, a nebo odstranit překřížení a zauzlení v genomu (Burden et Osheroﬀ 1998, Fortune et Osheroﬀ 2000). Tato druhá funkce je nezbytná pro buněčné přežití, protože při absenci enzymu nedochází při mitóze k oddělení dceřiných chromozomů a buňky následně umírají.

Za normálních okolností jsou tyto štěpící komplexy pomíjivé a vytváří se pouze v průběhu katalytického procesu. Proto jsou zlomy na DNA v nízkých množstvích a jsou

buňkami tolerovány. Zvýšení koncentrace, nebo prodloužení životnosti štěpícího komplexu může vést mutagenním změnám. (Burden et Osheroff 1998, Fortune et Osheroff 2000). Např. pokud se replikační vidlička setká se štěpícím komplexem z topoizomerázy II a DNA, může se původně přechodný zlom změnit na trvalý (Howard et al. 1994). Pokud jsou zlomy na DNA příliš vysokém množství buňka zahájí programovanou buněčnou smrt (Kaufmann 1998).

Štěpící komplexy složené z topoizomerázy II a DNA se stávají cílem pro etoposid, který se na komplex váže pravděpodobně přes topoizomerázu II (Burden et Osheroff 1998). Účinek etoposidu spočívá v zabránění topoizomeráze II ve zpětné ligaci naštěpené DNA. Etoposid tak nejen, že zvyšuje množství štěpících komplexů, ale také prodlužuje jejich životnost. Látky jako je etoposid, které zvyšují koncentraci štěpících komplexů jsou nazývány jedy topoizomerázy II, protože tento nezbytný enzym změni na potenciální buněčný toxin (Wilstermann et Osheroff 2003).



### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Přístrojové vybavení

Pro real-time PCR by využíván přístroj Rotorgene 3000 (Corbett Research, Austrálie).

Ostatní přístroje patří do běžného vybavení laboratoře molekulární biologie:

laminární box MSC 9 (Jouan, Francie), centrifuga (Hermle, Německo), mrazicí box na  $-70^{\circ}\text{C}$  (Sanyo, Japonsko) a na  $-20^{\circ}\text{C}$  (Whirpool, USA), Robo-Cycler Gradient 96 (Stratagene, USA), elektroforetický zdroj (OWL, USA), thermoblok (Major Science, USA), transiluminátor (Vilber Lourmat, Francie), spektrofotometr UV 1101 (WPA, Velká Británie), vortex, předvážky, mikrovlnná trouba, vany na elektroforézu.

#### 3.2. Chemikálie

##### Kultivace buněk:

DMEM, RPMI 1640, FCS, Gibco, Německo

Etoposid (20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), Bristol, USA

##### Izolace RNA:

NucleoSpin RNA II, Macherey–Nagel, Německo

$\beta$ -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich, Německo

ethanol 96 % p.a., Penta, ČR

##### Reverzní transkripce:

M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H<sup>-</sup> (200 U/ $\mu\text{l}$ ), 10x M-MuLV pufr (500 mM Tris-HCl (pH 8,3), 80 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM KCl, 100 mM DTT), Finzymes, Finsko

primery oligo dT<sub>12-18</sub>, Generi-Biotech, ČR

##### PCR a real-time PCR:

H<sub>2</sub>O pro PCR, Top-Bio, ČR

Thermo-Start DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ), 10x Thermo-Start Standard Buffer, Thermo-Start MgCl<sub>2</sub> (25 mM), AB gene, UK

dNTP Mix (2,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), TaKaRa, Japonsko

primery pro geny p53, BCL2, BAX, DFFB, PBGD (50  $\mu\text{M}$ ), Generi- Biotech, ČR

TaqMan sondy (100  $\mu\text{M}$ ), Generi-Biotech, ČR

##### Elektroforéza

agaróza pro DNA elektroforézu, Serva, Německo

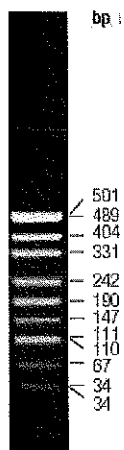
TBE pufr 10x (Tris, kyselina boritá, EDTA)

Ethidium Bromid (10 mg/ml), Top-Bio, ČR

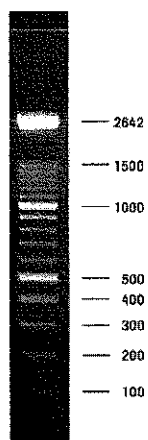
vkładací pufr, Top-Bio, ČR

Marker pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker,23, MBI Fermentas, Litva

Marker XIV, Roche, Německo



Obr. 12 Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker,23  
(<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/conyphagedamarkers.htm>)



Obr. 13 Marker molekulových hmotností XIV  
(<http://www.biocompare.com/itemdetails.asp?itemid=4419>)

### 3.3 Buněčné linie

Buňky dvou stabilizovaných buněčných linií Hep-2 a HL-60 byly poskytnuty Ústavem lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové. Buňky zde byly kultivovány, ovlivněny etoposidem, sklizeny a uloženy v  $-70^{\circ}\text{C}$  až do dalšího zpracování. Zdrojem buněčné linie Hep-2 a HL-60 byla Evropská Sběrka buněčných kultur (ECACC), která garantuje autenticitu buněk.

### Hep-2

Stabilizovaná buněčná linie odvozená z epitelových buněk lidského karcinomu hrtanu, (ECACC, No.-86030501, Porton Down). Buňky buněčné linie Hep-2 byly kultivovány v plastových lahvích v DMEM médiu s 10 % FCS, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µl/ml).

### HL-60

Stabilizovaná buněčná linie odvozená z lidské akutní myeloidní leukémie (ECACC, No.-85011431, Porton Down). Buňky této buněčné linie byly kultivovány v RPMI 1640 médiu s 10 % FCS, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µl/ml).

Buňky byly kultivovány ve standardních laboratorních podmínkách v 37° C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po 24 hodinách kultivace bylo standardní médium nahrazeno médiem s etoposidem o koncentraci 10 µg/ml.

## **3.4 Cytostatikum**

Etoposid byl naředěn z originálních ampulí do DMEM, nebo RPMI 1640 média na testovanou koncentraci 10 µg/ml.

## **3.5 Izolace RNA**

Po inkubaci buněk s etoposidem po dobu 6 hod a 12 hod byly buňky sklizeny a promyty v PBS pufru. Buňky byly zcentrifugovány a uloženy v -70° C až do izolace RNA. Ta byla izolována kitem NucleoSpin RNA II podle návodu výrobce. Během izolace probíhá i inkubace s DNázou a tak je zajištěno, aby izolovaná RNA neobsahovala zbytky genomické DNA.

### **Postup:**

#### **1. Lýze buněk**

K buněčné peletě bylo přidáno 350 µl pufru RA1 a 3,5 µl β-mercaptoethanolu a intenzivně zvortexováno.

#### **2. Filtrace lyzátu**

Viskozita byla redukována a lyzát vyčištěn pomocí filtrace přes NucleoSpin filtrační jednotku. Ta byla umístěna do sběrné zkumavky a centrifugována 1 min při 11000 x g.

### 3. Nastavení podmínek pro navázání RNA

K filtrátu bylo přidáno 350  $\mu$ l 70 % etanolu a zvortexováno.

### 4. Navázání DNA

Pro každou izolaci byla vybrána jedna NucleoSpin RNA II kolonka a vložena do 2 ml zkumavky. Do každé kolonky byl přepipetován lyzát a centrifugován 30 s při 8000 x g. Kolonka byla přemístěna do nové mikrozukavky.

### 5. Odsolení silika membrány

Do každé kolonky bylo přidáno 350  $\mu$ l MDB (Membrane desalting Buffer) a centrifugováno 1 min při 11000 x g. Odsolení membrány zefektivnilo rozložení DNA.

### 6. Rozložení DNA

Do každé kolonky bylo přímo na silika membránu aplikováno 95  $\mu$ l DNázy a inkubováno 15 min při pokojové teplotě.

### 7. Promytí a usušení silika membrány

#### 1. promytí:

Do kolonky bylo přidáno 200  $\mu$ l pufru RA2, který inaktivuje DNázu, a centrifugováno 30 s při 8000 x g. Kolonka byla přendána do nové mikrozukavky.

#### 2. promytí:

Do kolonky bylo přidáno 600  $\mu$ l pufru RA3 a centrifugováno 30 s při 8000 x g.

#### 3. promytí:

Do kolonky bylo přidáno 250  $\mu$ l pufru RA3 a centrifugováno 2 min při 11000 x g. Kolonka byla přendána do nuklease-free 1,5 ml zkumavky.

### 8. Eluace vysoce čisté RNA

RNA byla eluována v 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (RNase-free) a centrifugována 1 min 11000 x g.

## 3.6 Koncentrace RNA

Přítomnost RNA ve vzorcích byla ověřena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm. Koncentrace RNA byla vypočítána ze vztahu uvedeného v publikaci Křemen a kol. (1998). Při výpočtu se vychází z předpokladu, že při  $A_{260} = 1$  je koncentrace RNA = 40  $\mu$ g/ml.

$$c(\text{RNA}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

A – absorbance při vlnové délce 260 nm

c – koncentrace RNA

### 3.7 Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci byla použita M-MuLV Reverzní transkriptáza. Do reakční směsi byl přidán vždy 1 µg celkové RNA a celkový objem reakční směsi byl 20 µl. Postup reverzní transkripce byl zvolen podle doporučení výrobce.

1. do sterilní mikrozkušavky byl napipetován 1 µg RNA, 3 µl primerů oligo dT<sub>12-18</sub> a doplněno do 16 µl vodou RNasa –free
2. vzorek byl zahřán na 70° C po dobu 5 min v termobloku
3. mikrozkušavka byla přemístěna na led
4. krátce protřepána
5. do mikrozkušavky přidán 1 µl dNTP, 2 µl 10x M-MuLV pufru a 1 µl M-MuLV reverzní transkriptázy
6. obsah zkumavky byl lehce promíchán a inkubován 60 min při 37° – 42° C

Po skončení inkubace byla mikrozkušavka s cDNA uskladněna v -20° C.

### 3.8 Optimalizace real-time PCR

Při optimalizaci real-time PCR byly čerpány informace z manuálu firmy Corbett research – Real-time amplification on the Rotor-Gene: Overview of the chemistries and optimizations (Real time summery, version 1.7).

Při jakékoliv real-time PCR aplikaci je žádoucí dosáhnout 100 % efektivity amplifikační reakce. To znamená, že při každém cyklu se zdvojnásobí počet amplikonů. Jako fluorescenční znační byly v této práci používány fluorescenčně značené sondy nazývané jako hydrolytické, nebo také „TaqMan“ sondy.

Při optimalizaci real-time PCR reakce a navrhování sond a primerů je potřeba dodržet několik doporučení.

#### 3.8.1 Výběr primerů a sond

- nejprve je navržena sonda a k ní jsou navrženy primery tak blízko, jak je to možné, ale bez překrývání
- délka amplikonu by neměla přesáhnout 400 bp. Ideální délka je 75 – 150 bp. Při kratší délce amplikonu je dosaženo vyšší efektivity reakce
- obsah GC bazí by měl být mezi 30 – 70 %, sekvence bohaté na GC báze jsou náchylnější k nespecifickým interakcím, které mohou redukovat efektivitu reakce

- vyhnout se sekvencím s identickými nukleotidy, hlavně s G bází, opět to může ovlivnit efektivitu reakce
- primery a sonda by neměly tvořit dimerové formace a smyčky, opět to snižuje efektivitu reakce
- primery a sonda by měly být delší než 17 bází

#### Pravidla pro sondy:

- teplota tání ( $T_m$ ) by měla být mezi 68° a 70° C
- v sekvenci by měly převažovat C báze nad G, více G bází redukuje efektivitu reakce
- sonda by neměla být delší než 30 nukleotidů
- neměla by tvořit sekundární struktury
- posledních pět bází na 3' konci by nemělo obsahovat více než dvě G a/nebo C báze, to by mohlo vést vytváření nespecifických produktů

#### Pravidla pro primery:

- teplota tání by měla být mezi 58° a 60° C. To je důležité, protože tyto PCR reakce by měly probíhat při annealingové teplotě 60° C. Při této teplotě je nejvyšší 5' exonukleázová aktivita polymerázy
- posledních pět bází by nemělo obsahovat více než dvě G a/nebo C báze

Sekvence navržených primerů a sond byly zkontrolovány v databázi Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). Funkčnost primerů při annealingové teplotě 60° C byla ověřena metodou PCR a je uvedena v kapitole Výsledky.

### 3.8.2 Koncentrace $MgCl_2$

Reakce s TaqMan sondami vyžaduje vyšší koncentraci  $MgCl_2$  než běžné amplifikace. Je to z toho důvodu, že Taq-Polymeráza vyžaduje pro svojí 5' exonukleázovou aktivitu vyšší koncentraci  $MgCl_2$ , v rozmezí 3,5 – 6 mM, obvykle 5 mM. Optimální koncentrace  $MgCl_2$  byla ověřena metodou PCR u všech genů a je uvedena v kapitole Výsledky (kap. 4.1).

### 3.8.3 Optimalizace koncentrace primerů a sond

Při práci s TaqMan sondami je nutné nalézt optimální koncentraci sondy a primerů, při které je dosaženo nejnižší  $C_t$  hodnoty, ale zároveň nejstrmější zvýšení fluorescence. Koncentrace primerů se testuje v rozsahu 25 – 900 nM. Koncentrace sondy v rozmezí 10 – 250 nM. Výsledky optimalizace koncentrací jsou uvedeny v kapitole Výsledky (kap. 4.1).

### 3.8.4 Teplotní profil reakce

Po úvodní denaturaci (délka závisí na typu Taq-polymerázy) se opakují dva teplotní kroky: 15 – 20 s při 95° C a 45 - 60 s při 60° C. V případě používání TaqMan sond se vynechává teplotní krok při 72° C. Teplotní profil používaný vždy pro daný gen je uveden v kapitole Výsledky (kap. 4.1).

### 3.9 Real-time PCR

Složení PCR směsi (20 µl):

H <sub>2</sub> O pro PCR	8,15 µl
10x PCR pufr	2 µl
dNTP Mix (2,5 mM)	1,6 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Sonda	1 µl
Thermo-Start Polym. (5 U/ µl)	0,25 µl
c DNA	1 µl

#### Kalibrační křivka

Pro zjištění efektivity reakce a dalších parametrů real-time PCR reakce bylo nutné mít ke každé reakci i kalibrační křivku. Ta byla získána z ředící řady cDNA získané z RNA z buněk kontrolní skupiny.

### 3.10 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Složení PCR směsi (objem 25 µl):

H <sub>2</sub> O pro PCR	16,75 µl
10x PCR pufr	2,5 µl
dNTP Mix (2,5 mM)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
Primer F (50 µM)	0,25 µl
Primer R (50 µM)	0,25 µl
Thermo-Start Polym. (5 U/ µl)	0,25 µl
c DNA	1 µl

Při ověřování primerů byl použit gradient annealingových teplot v rozmezí 56° - 67° C. Při zjišťování optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub> bylo použito rozmezí 3 – 7 mM (tj. do PCR směsi bylo přidáno 3 – 7 µl MgCl<sub>2</sub>) při teplotě annealingu 60° C.

Teplotní profil:

95° C / 15 min	
95° C / 20 s	} 34 cyklů
56° - 67° C / 60 s	
72° C 20 s	
72° C / 1 min	

### 3.11 Elektroforéza

- v 60 ml 1x TBE pufru bylo rozpuštěno 0,9 g agarózy. Agaróza byla v pufru rozvařena 2-3 min v mikrovlnné troubě
- do rozvařené a ochlazené agarózy byly přidány 4 µl ethidium bromidu
- vzniklý gel byl nalit do formy s vloženým hřebenem na tvorbu jamek. Po ztuhnutí gelu byl hřeben vyndán a gel použit k elektroforetickému dělení vzorků
- připravený gel byl umístěn do elektroforetické vany, která byla naplněna 1x TBE puftrem
- na proužku parafilmu bylo promícháno 10 µl vzorku s 2 µl vkladacího pufru. Takto připravený vzorek byl napipetován do jamky v gelu
- do jedné z jamek bylo napipetováno 6 µl markeru molekulových hmotností pro určení délky ampliconů
- elektroforetické dělení probíhalo 50 min při 80 V. Po ukončení elektroforézy byl gel pozorován pod UV světlem v transiluminátoru

### 3.12 Analýza dat

Kvantifikace genové exprese se vyhodnocuje jako relativní, obvykle se vztahuje k expresi jiného genu. Tento gen se označuje jako referenční gen, nebo jako housekeeping gen. Expres referenčního genu by v daných buňkách, tkáni, nebo buněčné linii měla být stálá.

V této práci byla relativní genová exprese vypočítána metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak et Schmittgen 2001) a vzorec pro výpočet touto metodou byl převzat z této publikace.



## Výpočet $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$$\text{poměr} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{housekeep.}})_{\text{timeX}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{housekeep.}})_{\text{time0}}$$

Ct target – Ct hodnota u genu, jehož genová exprese byla studována

Ct housekeeping – Ct hodnota referenčního genu (housekeeping genu)

time 0 – čas 0, v tomto případě buňky, které nebyly ovlivněny

time x – čas x, ovlivněné buňky po nějaký časový úsek, tzn. v této práci po dobu 0 hod, 6 hod a 12 hod

### **3.13 Statistické vyhodnocení**

Buňky byly rozdělené do tří skupin. První skupina byla kontrolní (n=3), tzn. buňky bez ovlivnění etoposidem. Ve druhé skupině byly buňky ovlivněné etoposidem 6 hod (n=3) a ve třetí skupině 12 hod (n=3). Každý vzorek byl při real-time RT-PCR reakci použit v duplexu a pro výpočet relativní exprese byla vybrána průměrná hodnota z těchto dvou Ct hodnot.

Data získaná po výpočtu metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  byla vyhodnocena testem ANOVA, v programu QC.Expert 3.0 (TriloByte, ČR). Jako statisticky významné bylo považováno  $p < 0,05$ . Pro následné zjištění statisticky významného rozdílu mezi jednotlivými skupinami byla použita Scheffého metoda.

## 4. Výsledky

### 4.1 Optimalizace real-time RT-PCR pro jednotlivé geny

#### 4.1.1 TP53

##### Výběr primerů a sondy

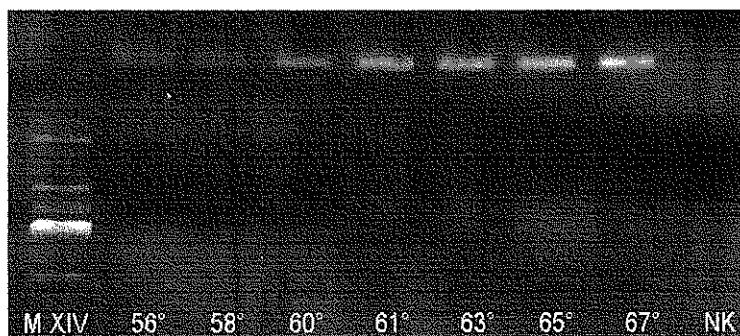
Primery a sonda pro gen TP53 byly navrženy firmou Generi-Biotech. Pro výběr primerů by vybrán lokus NM\_000546 o délce 2629 bp, jedná se o sekvenční mRNA, tedy o sestříhanou variantu genu.

TP53 fw: 5'-ctg ctc aga tag cga tgg tct g-3'	Velikost produktu = 161 bp
TP53 rv: 5'-ttg tag tgg atg gtg gta cag tca-3'	
Sonda: 5'-ccc ctc ctc agc atc tta tcc gag tgg-3'	

Tabulka 1

##### Ověření funkce primerů metodou PCR

Metodou PCR byla ověřena funkčnost primerů, a zkontrolován průběh reakce při teplotách annealingu v rozmezí 56° - 67° C. Bylo ověřeno, že primery jsou funkční při teplotě 60° C a netvoří nesespecifické produkty. Teplota annealingu 60° C byla dále používána v teplotním profilu pro real-time RT-PCR reakci.

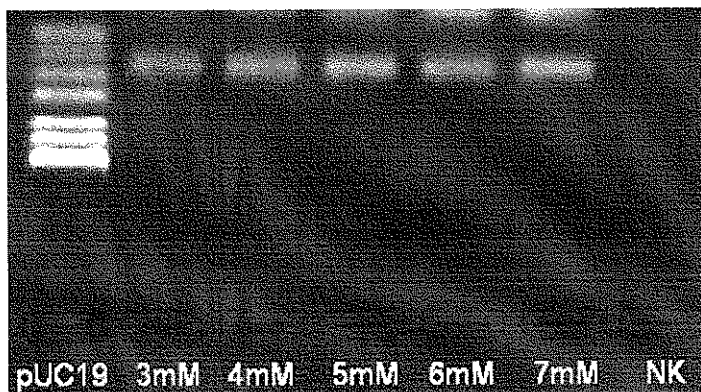


Obr. 14 Ověření funkčnosti primerů v gradientu annealingových teplot

Legenda: M XIV- Marker molekulových hmotností M XIV  
teploty annealingu 56° - 67° C  
NK – negativní kontrola

### Stanovení optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Pro optimální 5' exonukleázovou aktivitu Taq-polymerázy je nutná vyšší koncentrace MgCl<sub>2</sub>. Metodou PCR byla ověřena optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub> v rozsahu 3 mM až 7 mM při teplotě annealingu 60° C. Pro real-time RT-PCR byla vybrána 5 mM koncentrace MgCl<sub>2</sub>.



Obr. 15 Ověření optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
gradient MgCl<sub>2</sub> - 3 mM až 7 mM  
NK – negativní kontrola

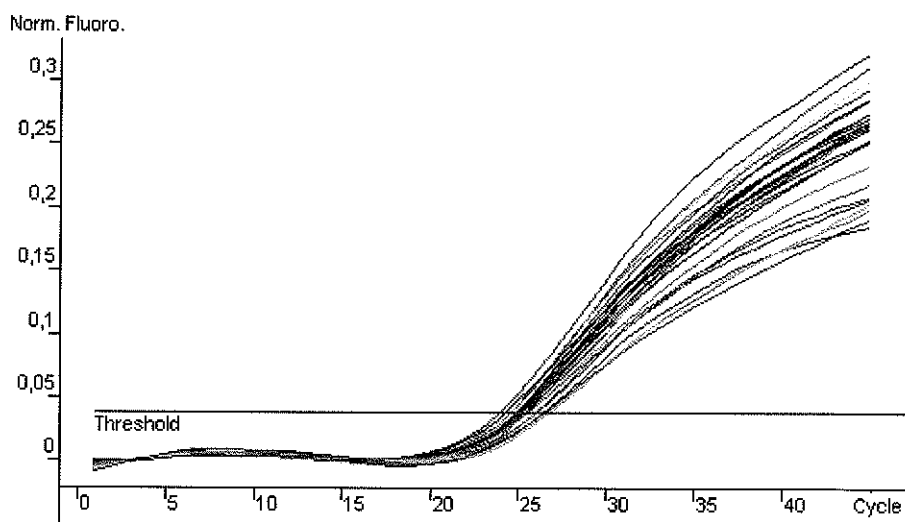
### Optimalizace koncentrace primerů a sond

Pro optimální průběh real-time RT-PCR reakce byly testovány různé koncentrace primerů a sondy. Jedná se o výslednou koncentraci v PCR reakční směsi. Cílem bylo dosažení nejnižší hodnoty Ct a zároveň nejstrmější zvýšení fluorescence. Testovány byly kombinace koncentrace primerů 300 nM, 600 nM a 900 nM a u sondy 100 nM, 150 nM a 250 nM. Po vyhodnocení grafu byly pro další reakce vybrány následující koncentrace:

primer forward – 600 nM

primer reverse – 600 nM

sonda – 100 nM



Graf 1 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce při různých kombinacích koncentrace primerů a sondy

1		100-300/300	10		150-300/300	19		250-300/300
2		100-300/600	11		150-300/600	20		250-300/600
3		100-300/900	12		150-300/900	21		250-300/900
4		100-600/300	13		150-600/300	22		250-600/300
5		100-600/600	14		150-600/600	23		250-600/600
6		100-600/900	15		150-600/900	24		250-600/900
7		100-900/300	16		150-900/300	25		250-900/300
8		100-900/600	17		150-900/600	26		250-900/600
9		100-900/900	18		150-900/900	27		250-900/900

Tabulka 2 Barevné označení dané kombinace koncentrací v pořadí: sonda–primerF/primerR

Teplotní profil reakce:

úvodní denaturace	95° C, 15 min	
denaturace	95° C, 20 s	} 45 cyklů
annealing	60° C, 60 s	

## 4.1.2 BCL2

### Výběr primerů a sondy

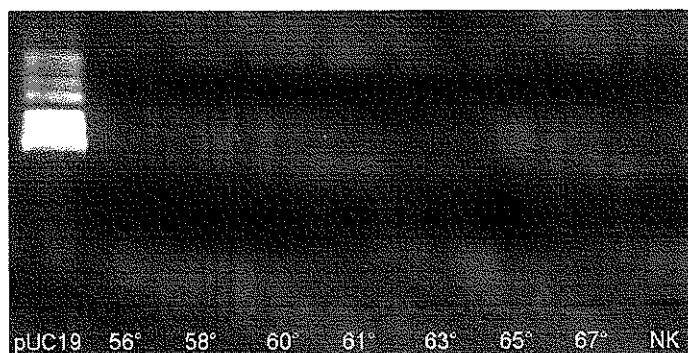
Primery byly převzaty z práce Ikeguchi et al. (2002a). Pro výběr primerů by vybrán lokus NM\_000657, o délce 1207 bp, jedná se o sekvenční mRNA, tedy o sestříhanou variantu genu.

BCL2 fw: 5' - ttg gcc ccc gtt gct t -3'	Velikost produktu = 65 bp
BCL2 rv: 5' - cgg tta teg tac cct gtt etc - 3'	
Sonda: 5' - agc gtg cgc cat cct tcc cag -3'	

Tabulka 3

### Ověření funkce primerů metodou PCR

Metodou PCR byla ověřena funkčnost primerů, a zkontrolován průběh reakce při teplotách annealingu v rozmezí 56° - 67° C. Bylo ověřeno, že primery jsou funkční při teplotě 60° C a netvoří nespecifické produkty. Teplota annealingu 60° C byla dále používána v teplotním profilu pro real-time RT-PCR reakci.

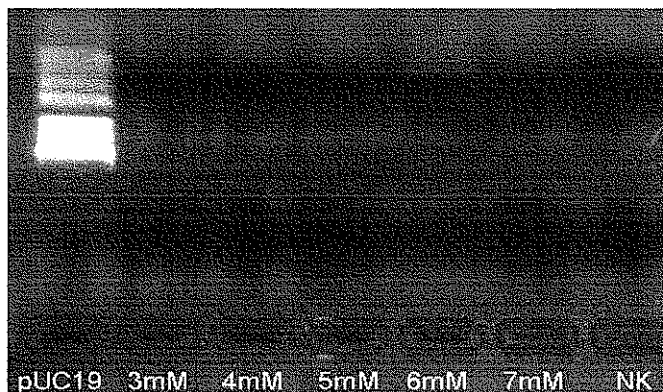


Obr. 16 Ověření funkčnosti primerů v gradientu annealingových teplot

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
teploty annealingu 56° - 67° C  
NK – negativní kontrola

### Stanovení optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Pro optimální 5' exonukleázovou aktivitu Taq-polymerázy je nutná vyšší koncentrace MgCl<sub>2</sub>. Metodou PCR byla ověřena optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub> v rozsahu 3 mM až 7 mM při teplotě annealingu 60° C. Pro real-time RT-PCR byla vybrána 5 mM koncentrace MgCl<sub>2</sub>.



Obr. 17 Ověření optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
gradient MgCl<sub>2</sub> - 3 mM až 7 mM  
NK – negativní kontrola

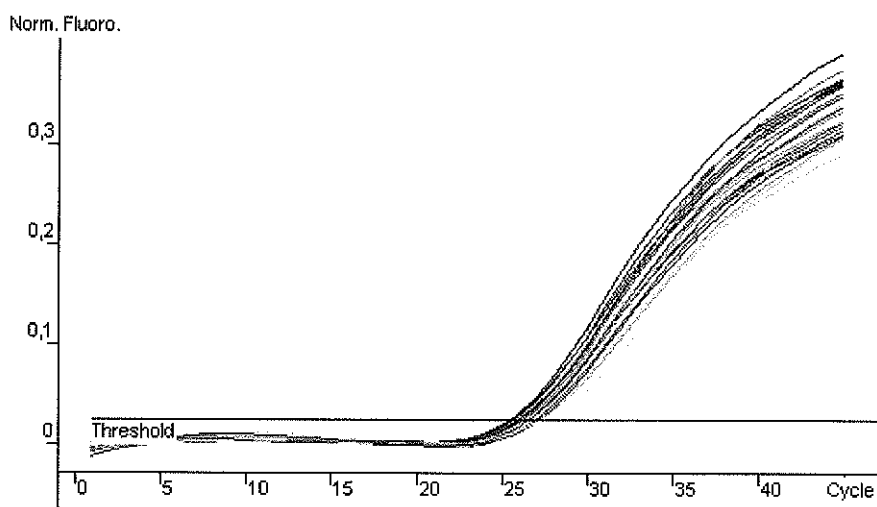
### Optimalizace koncentrace primerů a sond

Pro optimální průběh real-time RT-PCR reakce byly testovány různé koncentrace primerů a sondy. Jedná se o výslednou koncentraci v PCR reakční směsi. Cílem bylo dosažení nejnižší hodnoty Ct a zároveň nejstrmější zvýšení fluorescence. Testovány byly kombinace koncentrace primerů 300 nM, 600 nM a 900 nM a u sondy 100 nM, 150 nM a 250 nM. Po vyhodnocení grafu byly pro další reakce vybrány následující koncentrace:

primer forward – 900 nM

primer reverse – 900 nM

sonda – 100 nM



Graf 2 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce při různých kombinacích koncentrace primerů a sondy

1		100-300/300	10		150-300/300	19		250-300/300
2		100-300/600	11		150-300/600	20		250-300/600
3		100-300/900	12		150-300/900	21		250-300/900
4		100-600/300	13		150-600/300	22		250-600/300
5		100-600/600	14		150-600/600	23		250-600/600
6		100-600/900	15		150-600/900	24		250-600/900
7		100-900/300	16		150-900/300	25		250-900/300
8		100-900/600	17		150-900/600	26		250-900/600
9		100-900/900	18		150-900/900	27		250-900/900

Tabulka 4 Barevné označení dané kombinace koncentrací v pořadí: sonda–primerF/primerR

Teplotní profil reakce:

úvodní denaturace	95° C, 15 min	} 45 cyklů
denaturace	95° C, 15 s	
annealing	60° C, 20 s	

### 4.1.3 BAX

#### Výběr primerů a sondy

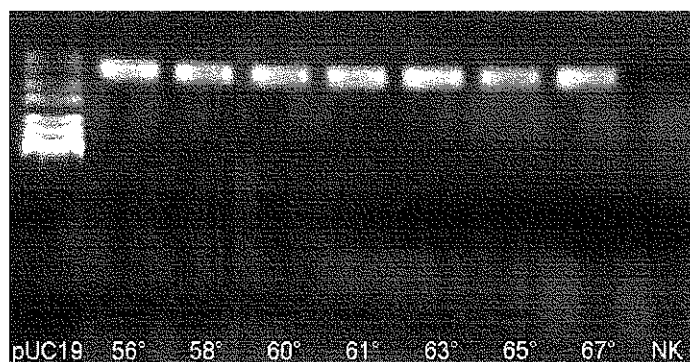
Primery a sonda pro gen BAX byly navrženy firmou Generi-Biotech. Pro výběr primerů by vybrán lokus NM\_004324 o délce 891 bp, jedná se o sekvenční mRNA, tedy o sestříhanou variantu genu. Pro výběr primerů byla zvolena transkripční varianta  $\beta$ .

Bax fw: 5' - gtc gcc ctt ttc tac ttt gcc ag -3'	Velikost produktu = 124 bp
Bax rv: 5' - tcc agc cca aca gcc gct cc - 3'	
Sonda: 5' - cca atg tcc agc cca tga tgg ttc tga - 3'	

Tabulka 5

#### Ověření funkce primerů metodou PCR

Metodou PCR byla ověřena funkčnost primerů, a zkontrolován průběh reakce při teplotách annealingu v rozmezí 56° - 67° C. Bylo ověřeno, že primery jsou funkční při teplotě 60° C a netvoří nespecifické produkty. Teplota annealingu 60° C byla dále používána v teplotním profilu pro real-time RT-PCR reakci.



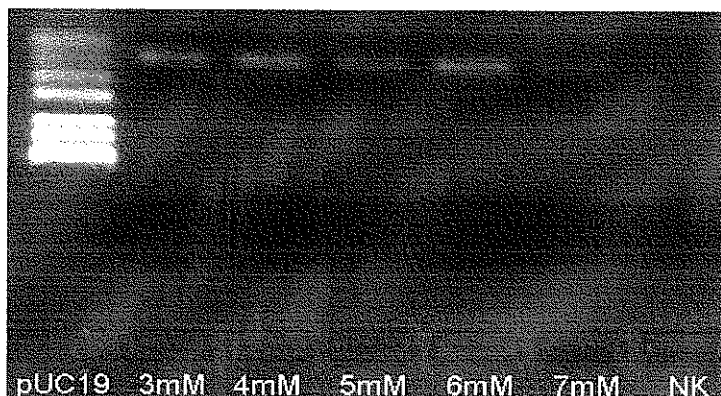
Obr. 18 Ověření funkčnosti primerů v gradientu annealingových teplot

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
teploty annealingu 56° - 67° C  
NK – negativní kontrola



### Stanovení optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Pro optimální 5' exonukleázovou aktivitu Taq-polymerázy je nutná vyšší koncentrace MgCl<sub>2</sub>. Metodou PCR byla ověřena optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub> v rozsahu 3 mM až 7 mM při teplotě annealingu 60° C. Pro real-time RT-PCR byla vybrána 5 mM koncentrace MgCl<sub>2</sub>.



Obr. 19 Ověření optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
gradient MgCl<sub>2</sub> - 3 mM až 7 mM  
NK – negativní kontrola

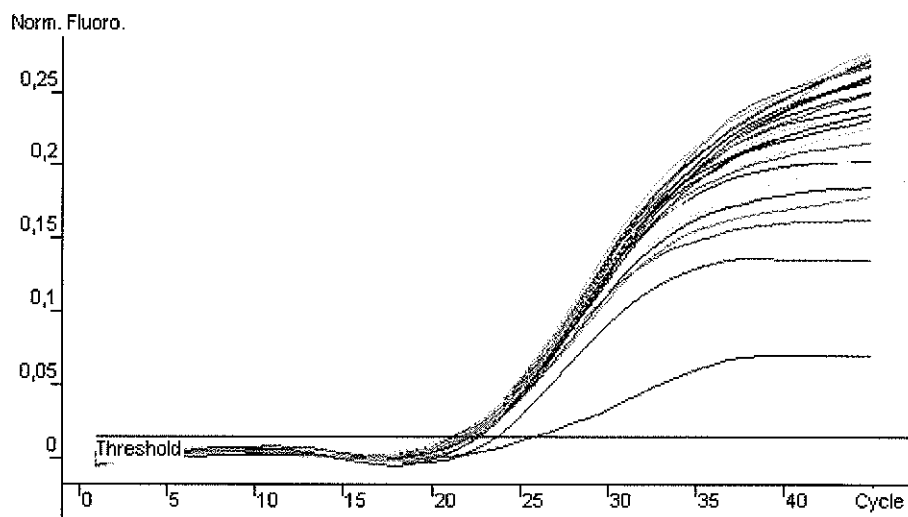
### Optimalizace koncentrace primerů a sond

Pro optimální průběh real-time RT-PCR reakce byly testovány různé koncentrace primerů a sondy. Jedná se o výslednou koncentraci v PCR reakční směsi. Cílem bylo dosažení nejnižší hodnoty Ct a zároveň nejstrmější zvýšení fluorescence. Testovány byly kombinace koncentrace primerů 300 nM, 600 nM a 900 nM a u sondy 100 nM, 150 nM a 250 nM. Po vyhodnocení grafu byly pro další reakce vybrány následující koncentrace:

primer forward – 300 nM

primer reverse – 300 nM

sonda – 100 nM



Graf 3 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce při různých kombinacích koncentrace primerů a sondy

1		100-300/300	10		150-300/300	19		250-300/300
2		100-300/600	11		150-300/600	20		250-300/600
3		100-300/900	12		150-300/900	21		250-300/900
4		100-600/300	13		150-600/300	22		250-600/300
5		100-600/600	14		150-600/600	23		250-600/600
6		100-600/900	15		150-600/900	24		250-600/900
7		100-900/300	16		150-900/300	25		250-900/300
8		100-900/600	17		150-900/600	26		250-900/600
9		100-900/900	18		150-900/900	27		250-900/900

Tabulka 6 Barevné označení dané kombinace koncentrací v pořadí: sonda–primerF/primerR

Teplotní profil reakce:

úvodní denaturace	95° C, 15 min	} 45 cyklů
denaturace	95° C, 10 s	
annealing	60° C, 40 s	

#### 4.1.4 DFFB

##### Výběr primerů a sondy

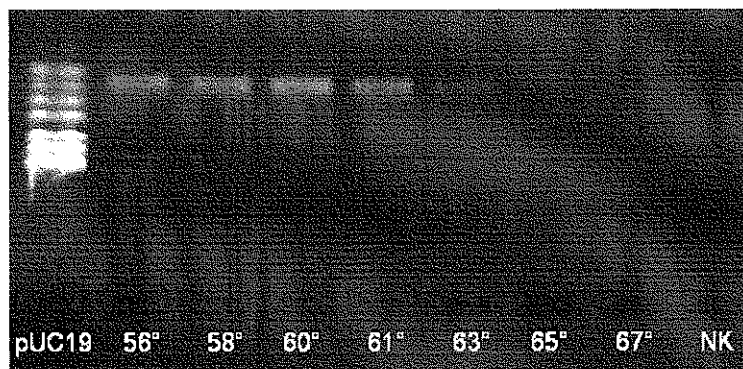
Primery a sonda pro gen DFFB byly navrženy firmou Generi-Biotech. Pro výběr primerů by vybrán lokus NM\_004402 o délce 3034 bp, jedná se o sekvence mRNA, tedy o sestříhanou variantu genu.

DFFB fw: 5' - aag att act tcc cca gtg ttc c - 3'	Velikost produktu = 121 bp
DFFB rv: 5' - acc tgt ggc tgc tga aat gc -3'	
Sonda: 5' - ctc acc ttg ggc cag gcc tgg c -3'	

Tabulka 7

##### Ověření funkce primerů metodou PCR

Metodou PCR byla ověřena funkčnost primerů, a zkontrolován průběh reakce při teplotách annealingu v rozmezí 56° - 67° C. Bylo ověřeno, že primery jsou funkční při teplotě 60° C a netvoří nespecifické produkty. Teplota annealingu 60° C byla dále používána v teplotním profilu pro real-time RT-PCR reakci.

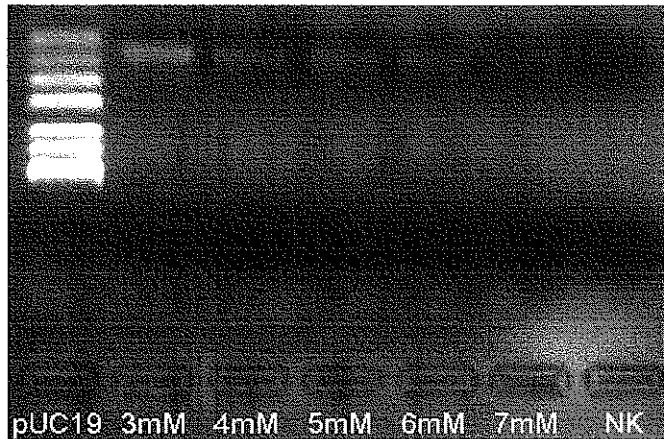


Obr. 20 Ověření funkčnosti primerů v gradientu annealingových teplot

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
teploty annealingu 56° - 67° C  
NK – negativní kontrola

### Stanovení optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Pro optimální 5' exonukleázovou aktivitu Taq-polymerázy je nutná vyšší koncentrace MgCl<sub>2</sub>. Metodou PCR byla ověřena optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub> v rozsahu 3 mM až 7 mM při teplotě annealingu 60° C. Pro real-time RT-PCR byla vybrána 3 mM koncentrace MgCl<sub>2</sub>.



Obr. 21 Ověření optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
gradient MgCl<sub>2</sub> - 3 mM až 7 mM  
NK – negativní kontrola

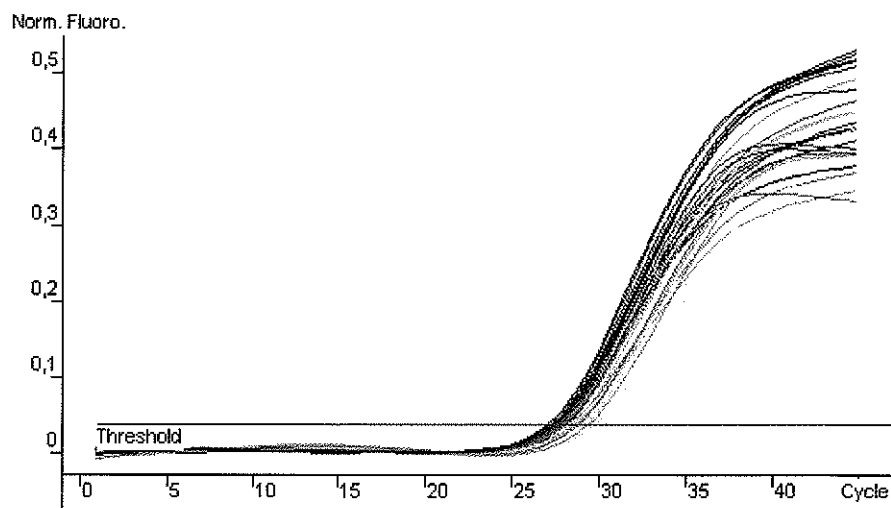
### Optimalizace koncentrace primerů a sond

Pro optimální průběh real-time RT-PCR reakce byly testovány různé koncentrace primerů a sondy. Jedná se o výslednou koncentraci v PCR reakční směsi. Cílem bylo dosažení nejnižší hodnoty Ct a zároveň nejstrmější zvýšení fluorescence. Testovány byly kombinace koncentrace primerů 300 nM, 600 nM a 900 nM a u sondy 100 nM, 150 nM a 250 nM. Po vyhodnocení grafu byly pro další reakce vybrány následující koncentrace:

primer forward – 900 nM

primer reverse – 900 nM

sonda – 150 nM



Graf 4 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce při různých kombinacích koncentrace primerů a sondy

1		100-300/300	10		150-300/300	19		250-300/300
2		100-300/600	11		150-300/600	20		250-300/600
3		100-300/900	12		150-300/900	21		250-300/900
4		100-600/300	13		150-600/300	22		250-600/300
5		100-600/600	14		150-600/600	23		250-600/600
6		100-600/900	15		150-600/900	24		250-600/900
7		100-900/300	16		150-900/300	25		250-900/300
8		100-900/600	17		150-900/600	26		250-900/600
9		100-900/900	18		150-900/900	27		250-900/900

Tabulka 8 Barevné označení dané kombinace koncentrací v pořadí: sonda–primerF/primerR

#### Teplotní profil reakce:

úvodní denaturace	95° C, 15 min	} 45 cyklů
denaturace	95° C, 10 s	
annealing	60° C, 40 s	

### 4.1.5 PBGD

#### Výběr primerů a sondy

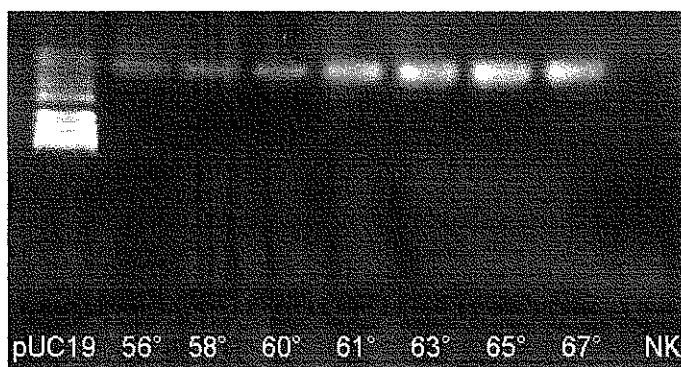
Primery a sonda pro gen PBGD byly navrženy firmou Generi–Biotech. Pro výběr primerů by vybrán lokus NM\_000190.3, o délce 1526 bp, jedná se o sekvenční mRNA, tedy o sestříhanou variantu genu.

PBGD fw: 5'- acc atc gga gcc atc tgc aag – 3'	Délka ampliconu – 106 bp
PBGD rv: 5'- ccc acc aca ctc ttc tct ggc a – 3'	
Sonda: 5'- ccc tea tga tgc tgt tgt ctt tca ccc aa – 3'	

Tabulka 9

#### Ověření funkce primerů metodou PCR

Metodou PCR byla ověřena funkčnost primerů, a zkontrolován průběh reakce při teplotách annealingu v rozmezí 56° - 67° C. Bylo ověřeno, že primery jsou funkční při teplotě 60° C a netvoří nespecifické produkty. Teplota annealingu 60° C byla dále používána v teplotním profilu pro real-time RT-PCR reakci.

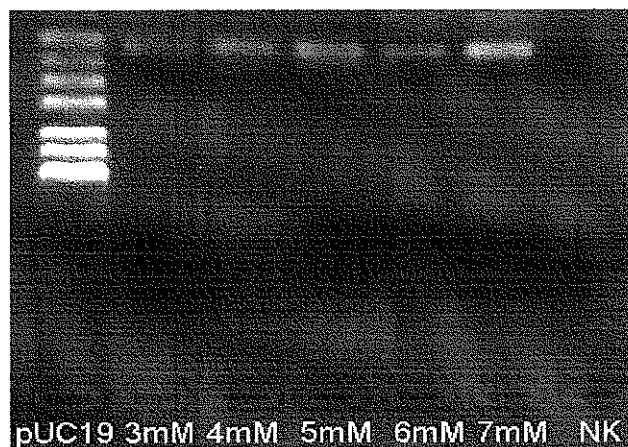


Obr. 22 Ověření funkčnosti primerů v gradientu annealingových teplot

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
teploty annealingu 56° - 67° C  
NK – negativní kontrola

### Stanovení optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Pro optimální 5' exonukleázovou aktivitu Taq-polymerázy je nutná vyšší koncentrace MgCl<sub>2</sub>. Metodou PCR byla ověřena optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub> v rozsahu 3 mM až 7 mM při teplotě annealingu 60° C. Pro real-time RT-PCR byla vybrána 5 mM koncentrace MgCl<sub>2</sub>.



Obr. 23 Ověření optimální koncentrace MgCl<sub>2</sub>

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
gradient MgCl<sub>2</sub> - 3 mM až 7 mM  
NK – negativní kontrola

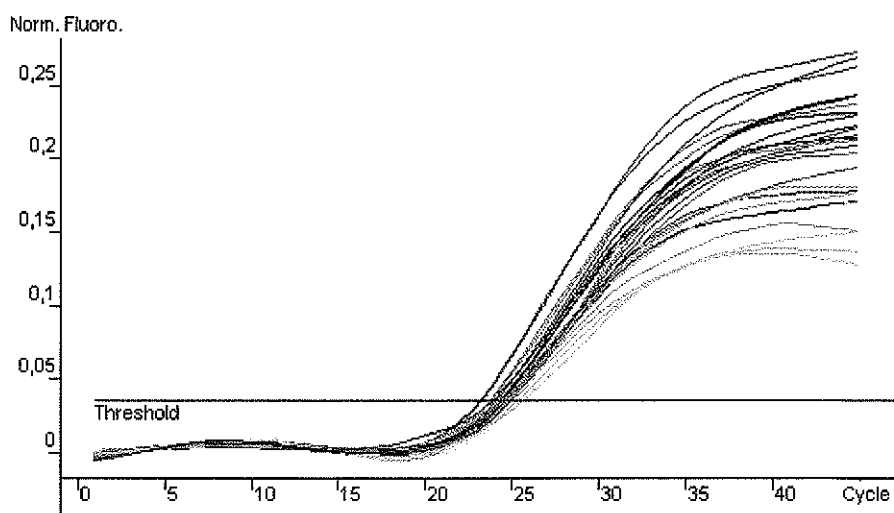
### Optimalizace koncentrace primerů a sond

Pro optimální průběh real-time RT-PCR reakce byly testovány různé koncentrace primerů a sondy. Jedná se o výslednou koncentraci v PCR reakční směsi. Cílem bylo dosažení nejnižší hodnoty Ct a zároveň nejstrmější zvýšení fluorescence. Testovány byly kombinace koncentrace primerů 300 nM, 600 nM a 900 nM a u sondy 100 nM, 150 nM a 250 nM. Po vyhodnocení grafu byly pro další reakce vybrány následující koncentrace:

primer forward – 300 nM

primer reverse – 900 nM

sonda – 100 nM



Graf 5 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce při různých kombinacích koncentrace primerů a sondy

1	100-300/300	10	150-300/300	19	250-300/300
2	100-300/600	11	150-300/600	20	250-300/600
3	100-300/900	12	150-300/900	21	250-300/900
4	100-600/300	13	150-600/300	22	250-600/300
5	100-600/600	14	150-600/600	23	250-600/600
6	100-600/900	15	150-600/900	24	250-600/900
7	100-900/300	16	150-900/300	25	250-900/300
8	100-900/600	17	150-900/600	26	250-900/600
9	100-900/900	18	150-900/900	27	250-900/900

Tabulka 10 Barevné označení dané kombinace koncentrací v pořadí: sonda–primerF/primerR

Teplotní profil reakce:

úvodní denaturace	95° C, 15 min	} 45 cyklů
denaturace	95° C, 20 s	
annealing	60° C, 60 s	

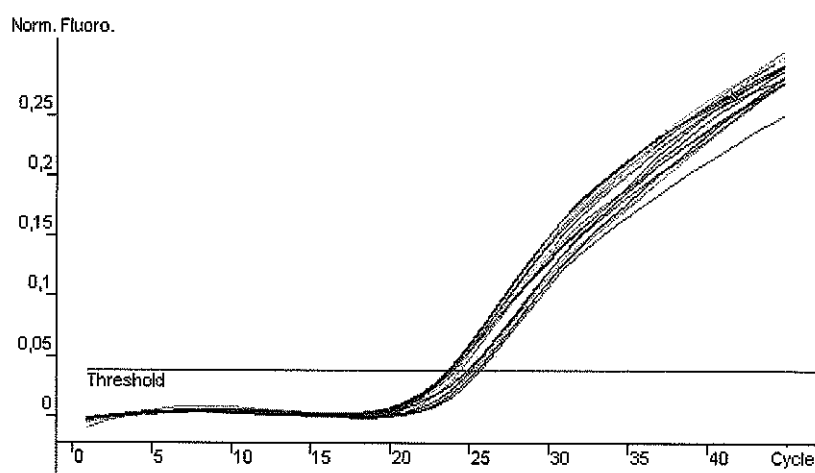


## 4.2 Experimentální část










V experimentální části práce byla indukována apoptóza pomocí etoposidu u dvou stabilizovaných buněčných linií Hep-2 a HL-60. Buňky byly rozdělené do tří skupin. První skupina byla kontrolní (n=3), tzn. buňky bez ovlivnění etoposidem. Ve druhé skupině byly buňky ovlivněné etoposidem 6 hod (n=3) a ve třetí skupině 12 hod (n=3). Metodou real-time RT-PCR pak byly kvantifikovány změny v expresi genů TP53, BCL2, BAX a DFFB. Výpočet relativní exprese byl prováděn metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak et Schmittgen 2001). Jako referenční gen byl použit gen PBGD.

### 4.2.1 Ovlivnění buněčné linie Hep-2 etoposidem

#### 4.2.1.1 Exprese genu TP53



Graf 6 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu TP53

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

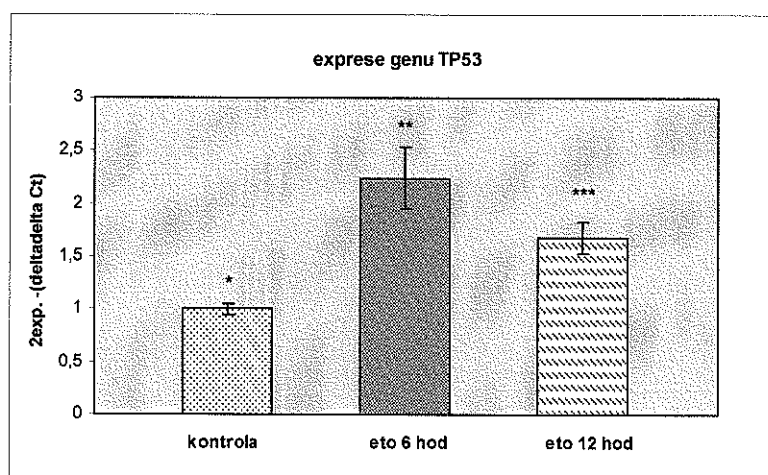
Tabulka 11 Barevné označení jednotlivých křivek

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,94	2,1	1,85
	1,01	2,04	1,61
	1,05	2,57	1,57
průměrná hodnota	1	2,24	1,68

Tabulka 12 Hodnoty vypočítané metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

skupiny	statistický rozdíl
kontrola a etoposid 6 h	významný
kontrola a etoposid 12 h	významný
etoposid 6 h a etoposid 12 h	významný

Tabulka 13 Statistické vyhodnocení

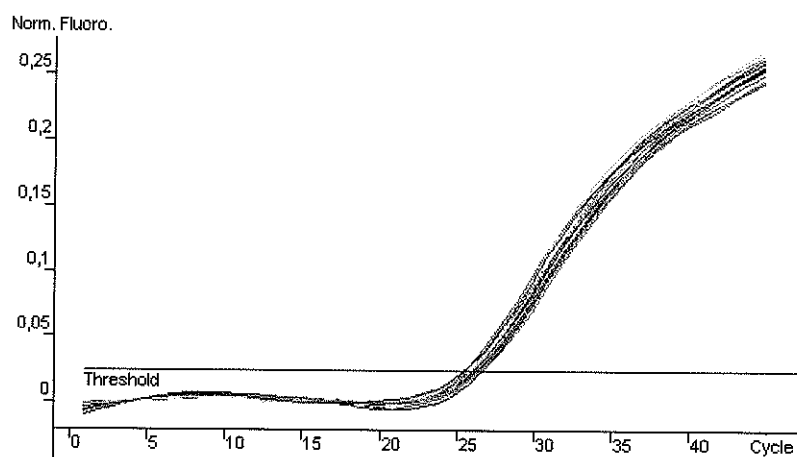


Graf 7 Grafické znázornění  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  hodnot u jednotlivých skupin. Mezi \*, \*\* a \*\*\* byl statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

#### Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu TP53. U buněk ovlivněných 12 hod byla exprese statisticky významně vyšší než u kontrolních buněk, v porovnání s buňkami ovlivněných 6 hod však došlo ke statisticky významnému snížení exprese tohoto genu.

#### 4.2.1.2 Expresí genu BCL2



Graf 8 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu BCL2

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

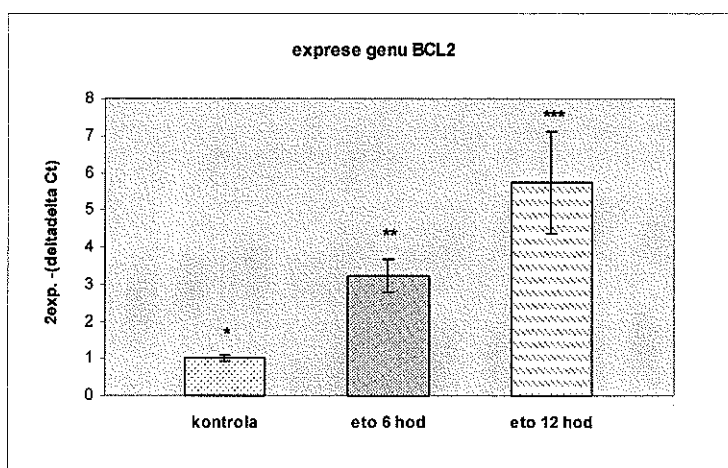
Tabulka 14 Barevné označení jednotlivých křivek

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,9	3,71	6,59
	1,09	3,18	4,14
	1,03	2,83	6,5
průměrná hodnota	1,01	3,24	5,74

Tabulka 15 Hodnoty vypočítané metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

skupiny	statistický rozdíl
kontrola a etoposid 6 h	významný
kontrola a etoposid 12 h	významný
etoposid 6 h a etoposid 12 h	významný

Tabulka 16 Statistické vyhodnocení

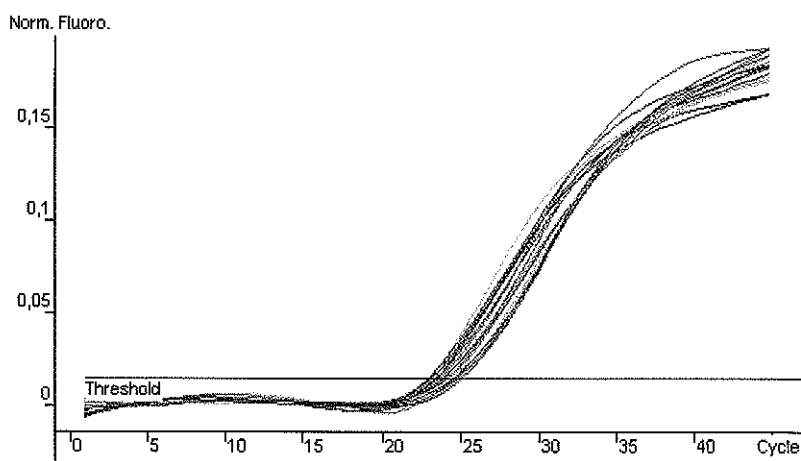


Graf 9 Grafické znázornění  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  hodnot u jednotlivých skupin. Mezi \*, \*\* a \*\*\* byl statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu BCL2. U buněk ovlivněných 12 hod byla také statisticky významně vyšší exprese ve srovnání s kontrolními buňkami, stejně tak byla vyšší exprese i ve srovnání s buňkami ovlivněných 6 hod.

#### 4.2.1.3 Exprese genu BAX



Graf 10 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu BAX

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

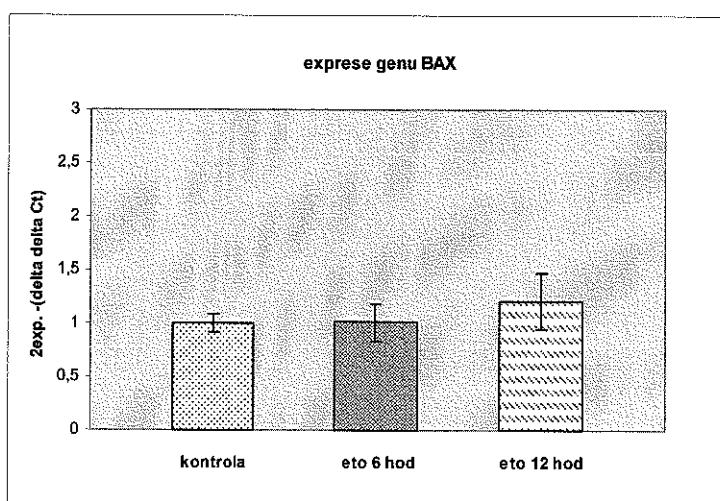
Tabulka 17 Barevné označení jednotlivých křivek

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,94	1,13	1,49
	1,1	0,81	1,17
	0,97	1,1	0,96
průměrná hodnota	1	1,01	1,21

Tabulka 18 Hodnoty vypočítané metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

skupiny	statistický rozdíl
kontrola a etoposid 6 h	nevýznamný
kontrola a etoposid 12 h	nevýznamný
etoposid 6 h a etoposid 12 h	nevýznamný

Tabulka 19 Statistické vyhodnocení

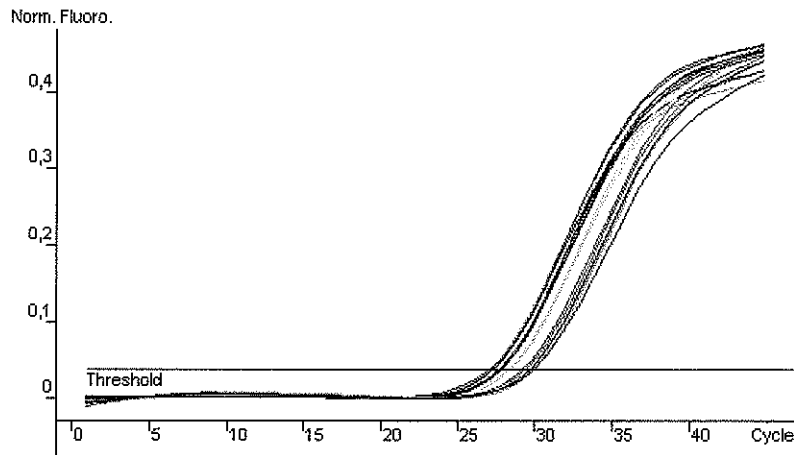


Graf 11 Grafické znázornění  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  hodnot u jednotlivých skupin.










Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod nedošlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu BAX. K malému zvýšení exprese došlo u buněk ovlivněných 12 hod, nebylo to však zvýšení statisticky významné.

#### 4.2.1.4 Exprese genu DFFB



Graf 12 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu DFFB

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

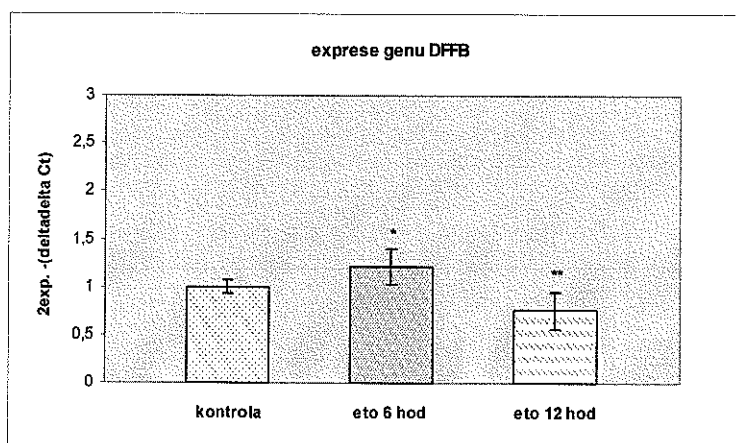
Tabulka 20 Barevné označení jednotlivých křivek

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,93	1	0,72
	1,06	1,27	0,97
	1,01	1,36	0,59
průměrná hodnota	1	1,21	0,76

Tabulka 21 Hodnoty vypočítané metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

skupiny	statistický rozdíl
kontrola a etoposid 6 h	nevýznamný
kontrola a etoposid 12 h	nevýznamný
etoposid 6 h a etoposid 12 h	významný

Tabulka 22 Statistické vyhodnocení

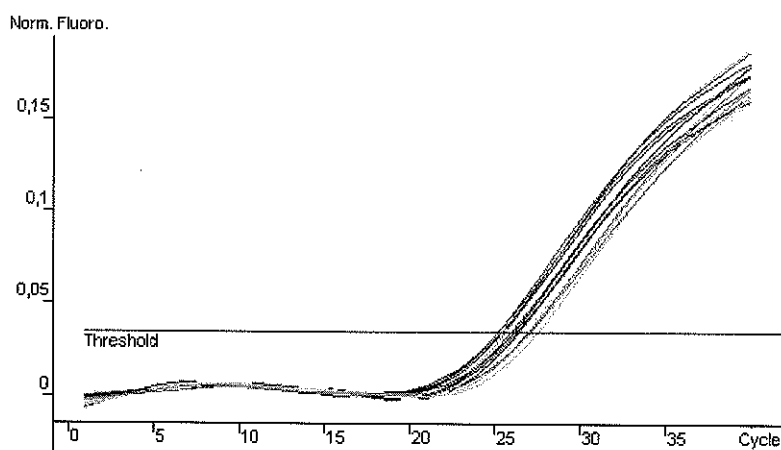


Graf 13 Grafické znázornění  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  hodnot u jednotlivých skupin. Mezi \* a \*\* byl statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).










Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem 6 hod došlo ke zvýšení exprese genu DFFB v porovnání s kontrolní skupinou. Toto zvýšení však nebylo statisticky významné. Po 12 hod ovlivnění došlo u této skupiny buněk ke snížení exprese genu ve srovnání jak s kontrolou, tak i s buňkami ovlivněnými 6 hod. Zde snížení exprese bylo statisticky významné jen při srovnání se skupinou ovlivněnou 6 hod.

#### 4.2.1.5 Exprese genu PBGD



Graf 14 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu PBGD

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

Tabulka 23 Barevné označení jednotlivých křivek

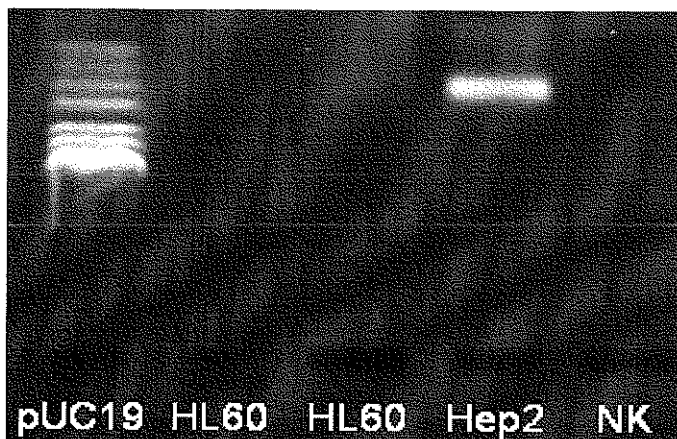
Shrnutí:

Gen PBGD byl vybrán jako referenční gen. Pomocí tohoto genu byla vypočítána relativní exprese všech výše uvedených genů.

#### 4.2.2 Ovlivnění buněčné linie HL-60 etoposidem

##### 4.2.2.1 Exprese genu TP53

Buněčná linie HL-60 neexprimuje gen TP53, proto nemohla být provedena kvantifikace genové exprese.

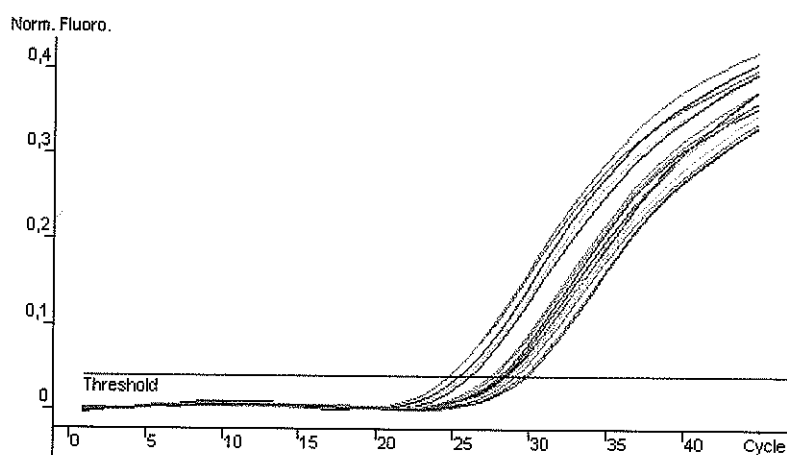


Obr. 24 Exprese genu TP53 u buněčné linie HL-60 a Hep-2

Legenda: pUC 19 - Marker molekulových hmotností pUC19 DNA/MspI (HpaII)  
HL60 – buněčná linie HL-60  
Hep2 – buněčná linie Hep-2  
NK – negativní kontrola



#### 4.2.2. Expese genu BCL2



Graf 15 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu BCL2

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

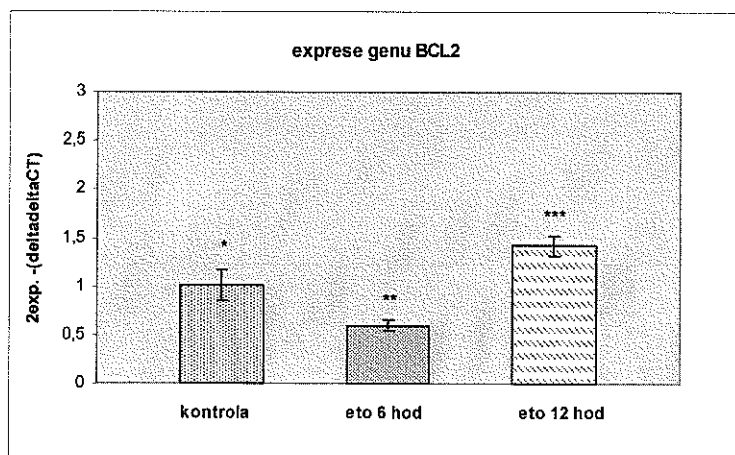
Tabulka 24 Barevné označení jednotlivých křivek

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,87	0,66	1,49
	1,18	0,59	1,3
	0,97	0,55	1,47
průměrná hodnota	1,01	0,6	1,42

Tabulka 25 Hodnoty vypočítané metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

skupiny	statistický rozdíl
kontrola a etoposid 6 h	významný
kontrola a etoposid 12 h	významný
etoposid 6 h a etoposid 12 h	významný

Tabulka 26 Statistické vyhodnocení

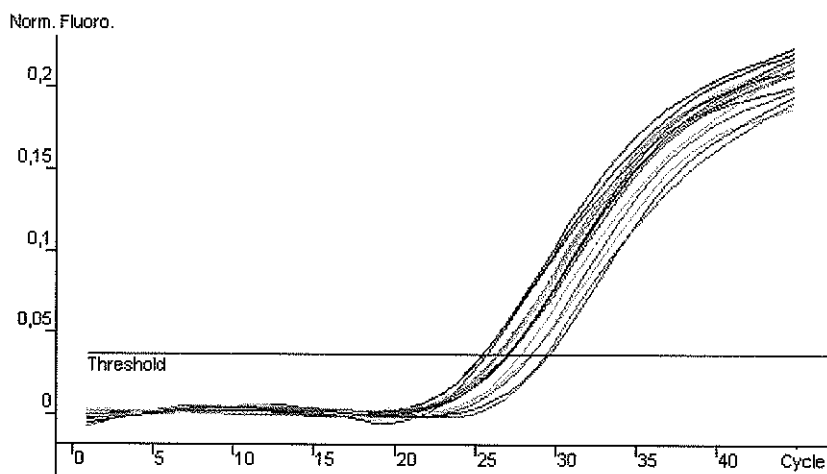


Graf 16 Grafické znázornění  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  hodnot u jednotlivých skupin. Mezi \*, \*\* a \*\*\* byl statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

#### Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem 6 hod došlo ke statisticky významnému snížení exprese genu BCL2 v porovnání s kontrolou. U buněk ovlivněných 12 hod byla statisticky významně vyšší exprese než u kontrolních buněk, stejně tak byla statisticky významně vyšší exprese i ve srovnání s buňkami ovlivněných 6 hod.

#### 4.2.2.3 Exprese genu BAX



Graf 17 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu BAX

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

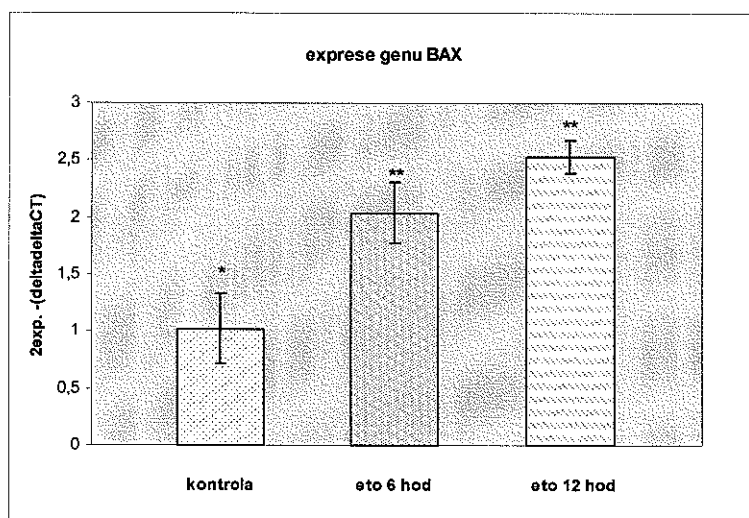
Tabulka 27 Barevné označení jednotlivých křivek

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,79	2,15	2,69
	0,91	2,23	2,45
	1,37	1,73	2,45
průměrná hodnota	1,02	2,04	2,53

Tabulka 28 Hodnoty vypočítané metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

skupiny	statistický rozdíl
kontrola a etoposid 6 h	významný
kontrola a etoposid 12 h	významný
etoposid 6 h a etoposid 12 h	nevýznamný

Tabulka 29 Statistické vyhodnocení

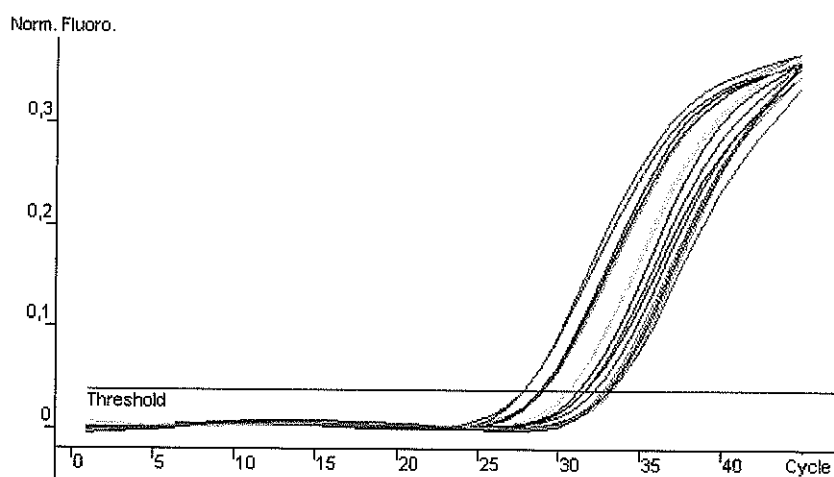


Graf 18 Grafické znázornění  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  hodnot u jednotlivých skupin. Mezi \* a \*\* byl statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).










#### Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese genu BAX. Statisticky významně vyšší byla exprese genu BAX i po 12 hod ovlivnění v porovnání s kontrolní skupinou, ne však ve srovnání s buňkami ovlivněnými 6 hod.

#### 4.2.2.4 Expese genu DFFB



Graf 19 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu DFFB

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

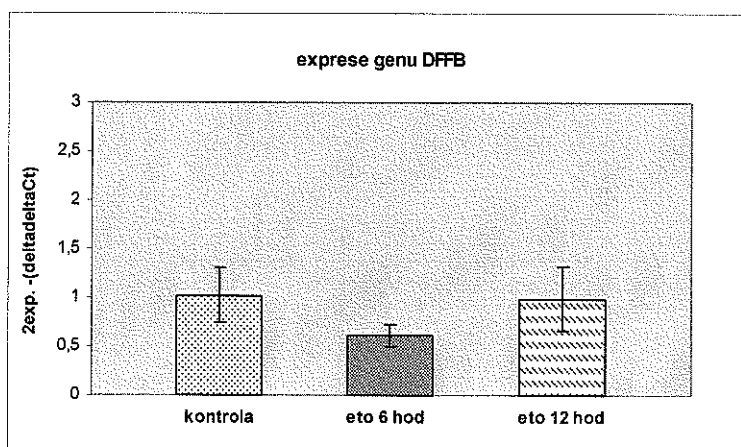
Tabulka 30 Barevné označení jednotlivých křivek

	kontrola	etoposid 6 h	etoposid 12 h
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,91	0,73	0,71
	1,34	0,58	0,89
	0,81	0,51	1,36
průměrná hodnota	1,02	0,61	0,99

Tabulka 31 Hodnoty vypočítané metodou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

skupiny	statistický rozdíl
kontrola a etoposid 6 h	nevýznamný
kontrola a etoposid 12 h	nevýznamný
etoposid 6 h a etoposid 12 h	nevýznamný

Tabulka 32 Statistické vyhodnocení

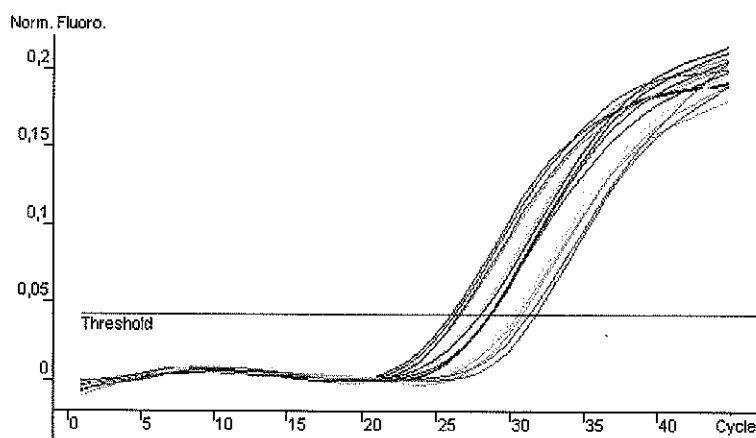


Graf 20 Grafické znázornění  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  hodnot u jednotlivých skupin.

#### Shrnutí:

Z uvedených výsledků vyplývá, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 h došlo k mírnému snížení exprese genu DFFB, tato změna však nebyla statisticky významná. U buněk ovlivněných 12 hod nedošlo ke změně exprese tohoto genu.

#### 4.2.2.5 Exprese genu PBGD



Graf 21 Grafické znázornění průběhu real-time RT-PCR reakce pro expresi genu PBGD

	kontrola - 1		etoposid 6 h - 1		etoposid 12 h - 1
	kontrola - 2		etoposid 6 h - 2		etoposid 12 h - 2
	kontrola - 3		etoposid 6 h - 3		etoposid 12 h - 3

Tabulka 33 Barevné označení jednotlivých křivek

#### Shrnutí:

Gen PBGD byl vybrán jako referenční gen. Pomocí tohoto genu byla vypočítána relativní exprese všech výše uvedených genů.

## 5. Diskuze

### 5.1 Indukce apoptózy

U buněk buněčné linie Hep-2 a HL-60 byla indukována apoptóza pomocí etoposidu o koncentraci 10 µg/ml. Buňky byly ovlivněny etoposidem v jedné skupině 6 hod a v druhé 12 hod. Třetí skupina sloužila jako kontrolní tzn. tyto buňky nebyly ovlivněny. Poté byly buňky uskladněny v -70° C až do izolace RNA.

Práce tak navazuje na předchozí výzkum na Ústavu lékařské biologie a genetiky, kde byla testována schopnost etoposidu indukovat apoptózu u buněk různých nádorových buněčných linií, včetně buněčných linií Hep-2 a HL-60 (Červinka et al. 1999, Rudolf et al. 2000a, Červinka et al. 2004, Rudolf et Červinka 2005). V těchto pracích však byly sledovány hlavně morfologické projevy apoptózy.

#### Etoposid

Etoposid je jeden z nejčastěji používaných protinádorových léků ve světě. Je používán k léčbě mnoha typů rakovin např. malobuněčného plicního karcinomu, sarkomů, leukémií a lymfomů. Etoposid je derivátem podophyllotoxinu, přírodní látky z rostliny *Podophyllum peltatum*. Primárním cílem v buňkách je pro etoposid topoizomeráza II. Tento nepostradatelný enzym odstraňuje zauzlení a překřížení v genomu vytvářením přechodných zlomů v dvouřetězcové DNA. Etoposid se váže a stabilizuje komplex tohoto enzymu a DNA (tzv. štěpící komplex). To vede k akumulaci těchto komplexů a vytváření trvalých zlomů v genetickém materiálu (Baldwin et Osheroff 2005).

Etoposid může indukovat apoptózu u různých buněčných linií (Jakubowicz-Gil et al. 2002, Higginbottom et al. 2007, Parihar et al. 2008) a to včetně buněčných linií Hep-2 a HL-60.

#### Hep-2

Indukcí apoptózy u buněk buněčné linie Hep-2 etoposidem, o koncentraci 10 µg/ml, se ve své práci zabýval Červinka et al. (1999). U buněk bylo možné po 4 - 8 hod od ovlivnění pozorovat typické morfologické znaky apoptózy, jako je zakulacení buněk a tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány. Byla také zaznamenána změna v membránovém potenciálu mitochondrií a tvorba DNA ladderů, které vznikají při internukleozomálním štěpení

DNA. Výše uvedená koncentrace etoposidu se ukázala jako dostačující k indukci apoptózy. Rudolf et al. (2000a) pozorovali zakulacení buněk a tvorbu puchýřků v rozmezí 2 - 6 hod od ovlivnění a po 8 hod od ovlivnění bylo možné pozorovat rytmické kontrakce označované jako membránový blebbing. Červinka et al. (2004) detekovali i aktivní enzym kaspázu 3. Rudolf et Červinka (2005) pozorovali tvorbu puchýřků (blebbing), které se objevovali od 4 - 14 hod od ovlivnění etoposidem, průměrná doba trvání byla 6 hod. Indukcí apoptózy u Hep-2 buněk pomocí etoposidu o koncentraci 5  $\mu\text{l/ml}$  a 50  $\mu\text{l/ml}$  se také zabývali Duran et al. (2000). U buněk se objevily typické morfologické znaky apoptózy jako je zakulacení buněk a fragmentace jádra.

### **HL-60**

Indukci apoptózy etoposidem, o koncentraci 10  $\mu\text{l/ml}$ , u buněk buněčné linie HL-60 popisují Rudolf et Červinka (2005). Tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány se objevila již po 1 hod od ovlivnění, maximálně však po 4 hod, průmětně trvala 2 hod. Indukcí apoptózy u HL-60 buněk etoposidem se zabývali i další autoři. Higginbottom et al. (2007) indukovali apoptózu u HL-60 buněk etoposidem o koncentracích 1  $\mu\text{l/ml}$  a 10  $\mu\text{l/ml}$  a jako znak apoptózy uváděli naštěpení kaspázy 9. Kravtsov et al. (1999) použili k ovlivnění HL-60 buněk etoposid o koncentracích 1, 2.5, 5, 10 a 20  $\mu\text{mol/L}$ . Jako nejúčinnější se při indukci apoptózy ukázala koncentrace etoposidu 10  $\mu\text{mol/L}$ , při které bylo možné pozorovat i typické morfologické znaky jako je zmenšování buněk a tvorba puchýřků na povrchu plazmatické membrány. Tento jev byl nejvíce pozorován mezi 4 – 8 hod po ovlivnění. Po 8 hod bylo také zjištěno nejvíce apoptotických buněk (61 %). Další z apoptotických znaků, které bylo možné pozorovat byla tvorba DNA ladderů, které bylo možné pozorovat po 4 hod až 16 hod od ovlivnění etoposidem. Eliseev et al (2003) popisují morfologické změny jako je tvorba puchýřků, kondenzace chromatinu a fragmentace DNA po ovlivnění HL-60 buněk 50  $\mu\text{M}$  etoposidem. Zuryn et al. (2007) indukovali apoptózu u HL-60 buněk etoposidem o 20 a 200  $\mu\text{M}$  koncentracích a Bjørling-Poulsen et Issinger (2003) indukovali apoptózu inkubací HL-60 buněk 30  $\mu\text{M}$  etoposidem po dobu 5 hod.

Z těchto poznatků vyplývá, že etoposid, o koncentraci 10  $\mu\text{l/ml}$ , je vhodné cytostatikum pro indukci apoptózy u buněčných linií Hep-2 a HL-60. Buňky mají morfologické projevy typické pro apoptózu a cílem práce bylo proto zjistit, zda tyto morfologické projevy jsou doprovázené změnami v expresi genů, které se podílejí na vstupu buněk do apoptózy, nebo na jejím průběhu. Kvantitativní změna v expresi vybraných genů byla měřena metodou real-time RT-PCR.

## 5.2 Kvantifikace exprese genu TP53

### Hep-2

Po analýze exprese genu TP53 u buněčné linie Hep-2 po indukci apoptózy bylo zjištěno, že u skupiny buněk ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. U buněk ovlivněných 12 hod došlo ke statisticky významnému snížení exprese ve srovnání se skupinou ovlivněnou 6 hod. Exprese genu TP53 však byla stále statisticky významně vyšší než u kontrolní skupiny.

Ke zvýšení exprese genu TP53 může vést několik důvodů. Působením etoposidu na buňky dochází k vytváření trvalých zlomů v řetězci DNA. Tento jev se projeví zejména při replikaci a buňky proto zastavují buněčný cyklus v G2 fázi. Protein TP53 je významný regulátor transkripce mnoha genů, z nichž jednu skupinu tvoří geny, které regulují buněčný cyklus v obou kontrolních bodech G1/S i v G2/M (Bunz et al. 1998). Při zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi je cílem regulace transkripce gen p21 (Harper et al. 1995). Pro vstup buňky do mitózy, tj. kontrolní bod G2/M, je nejdůležitější komplex cyklin B-Cdk1, kde TP53 slouží jako regulátor transkripce cyklinu B (Innocente et al. 1999). Regulace transkripce genů, řídících buněčný cyklus, pak může být jedním z vysvětlení zvýšení exprese genu TP53.

TP53 se však podílí i na regulaci transkripce genů, které řídí vstup buňky do apoptózy. Mezi transkripční cíle TP53 patří také rodina BCL2 genů. Mezi pozitivně regulované patří gen BAX, který je proapoptotický (Miyashita et Reed 1995), regulace transkripce může však být i negativní např. u genu BCL2 (Miyashita et al. 1994b). Zvýšení exprese genu TP53 tedy odpovídá indukci apoptózy u ovlivněných buněk.

Zvýšení exprese genu TP53 po indukci apoptózy potvrzují i další práce. Kvantifikací exprese genu TP53 se zabývali např. Xing et al. (2008), kteří indukovali apoptózu u buněk karcinomu žaludku látkou LY2940002 (phosphoinositide-3-kinase inhibitor). Metodou real-time RT-PCR naměřili zvýšení exprese genu TP53. Výrazné zvýšení exprese genů TP53 a BAX a snížení exprese BCL2 u jaterních buněk krys po působení SO<sub>2</sub> naměřili Bai et Meng (2005). Malerba et al. (2005) indukovali apoptózu etoposidem a taxolem u HL-60 buněk a u buněk kostní dřeně. Metodou Western blot byla zjištěna zvýšená exprese proteinu TP53 a BCL-X u buněk kostní dřeně po působení etoposidu.



## HL-60

Buněčná linie HL-60 neexprimuje gen TP53. Defektní funkce TP53 není mezi nádorovými buňkami nic neobvyklého, uvádí se že až 50 % primárních lidských nádorů nese mutaci v tomto genu (Hollstein et al. 1991). Indukci apoptózy u těchto buněk tedy gen TP53 nemůže zprostředkovat. Jednu z možností jiné indukce apoptózy popisují např. Higginbottom et al. (2007), kteří objevili několik nových alternativních míst pro fosforylaci u cyklin dependentní kinázy 1 (Cdk 1) asociované s cyklinem A. Zdá se, že tento proces je spojen s indukcí apoptózy u HL-60 buněk po ovlivnění etoposidem.

### 5.3 Kvantifikace exprese genů BCL2 a BAX

Geny BCL2 a BAX patří do rodiny BCL2 genů, které hrají v apoptóze důležitou regulační roli. BCL2 patří do skupiny která inhibuje apoptózu, BAX je pro-apoptotický (Chao et Korsmeyer 1998). Protein BCL2 je asociován s membránami mitochondrií, zatímco BAX je ve své neaktivní fázi lokalizován v cytoplazmě, po aktivaci se přemísťuje do mitochondrií a umožní tak uvolnění cytochromu c (Wolter et al. 1997). Další charakteristikou BCL2 proteinů je jejich schopnost tvorby homo- i heterodimerů, kterou zajišťuje  $\alpha$ -helix BH3 domény (Minn et al. 1998). Na regulaci aktivity pro- a anti-apoptotických BCL2 proteinů existuje několik buněčných mechanismů. Anti-apoptotický protein BCL2 je schopen tvořit dimery s pro-apoptotickým proteinem BAX a neutralizovat tím jeho aktivitu. Jako heterodimer je BAX neaktivní, ale jakmile může tvořit homodimery je schopen indukovat apoptózu (Gross et al. 1998). Dalším mechanismem je změna poměru pro- a anti-apoptotických BCL2 proteinů. Pokud je množství BCL2 proteinu vyšší, nebo stejné jako množství BAX, daná buňka je chráněna před apoptózou. Naopak pokud je množství BAX proteinu vyšší než BCL2 má buňka větší pravděpodobnost začít s apoptózou. Změna exprese tak může inhibovat, nebo naopak podpořit apoptózu (Adams et Cory 1998).

Při indukcii apoptózy se proto na úrovni genové exprese předpokládá snížení exprese genu BCL2, nebo zvýšení exprese genu BAX. Tento předpoklad potvrzují i výsledky více autorů např. Brown et Dunmore (2007) indukovali apoptózu u BRIN-BD 11 buněk a k jedné skupině buněk přidali leptin. Přidání leptinu zabránilo vzniku apoptózy, což korelovalo i se zvýšením exprese genu BCL2. Buňky buněčné linie odvozené od karcinomu jícnu (OE-19) byly ovlivněné simvastatinem. Metodou real-time RT-PCR bylo naměřeno snížení exprese

genu BCL2 a zvýšení exprese genu BAX (Konturek et al. 2007). Buňky buněčných linií IMR90 a SV40 byly ovlivněné pomocí 5-FU po dobu 5 dní, což snížilo poměr exprese genů BCL2/BAX u IMR90 buněk (Suzuki et al. 1999). Působení SO<sub>2</sub> způsobilo výrazné zvýšení exprese genu BAX u jaterních buněk krys, naopak došlo ke snížení exprese genu BCL2 (Bai et Meng 2005). Pan et al. (2003) indukovali apoptózu u buněčné linie COLO 205 pomocí HDB. Expresse byla měřena metodou Western blot a po 8 hod bylo naměřeno zvýšení exprese proteinu BAX, protein BCL2 zůstal nezměněn. Singh et al. (2003) stanovili expresi proteinů BCL2 a BAX metodou Western blot u buněk vyvíjejícího se mozečku krys při hypothyroidních podmínkách. Expresse proteinu BCL2 byla snížena, exprese BAX zvýšena.

## Hep-2

Po analýze genové exprese genu BCL2 u buněčné linie Hep-2 po indukci apoptózy bylo zjištěno, že u skupiny buněk ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. U buněk ovlivněných 12 hod došlo také ke statisticky významnému zvýšení exprese, a to jak ve srovnání s kontrolní skupinou, tak se skupinou ovlivněnou 6 hod.

Kvantifikace genové exprese genu BAX ukázala, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod nedošlo ke statisticky významnému zvýšení exprese. K malému zvýšení exprese došlo u buněk ovlivněných po dobu 12 hod, nebylo to však zvýšení statisticky významné.

Zvýšení exprese genu BCL2 a exprese genu BAX beze změn neodpovídá původním předpokladům. Apoptóza je však komplexní děj a i když morfologické znaky mohou ukazovat na probíhající apoptózu, exprese těchto dvou genů tomu nemusí odpovídat. Na indukci apoptózy se také mohou podílet jiné geny BCL2 rodiny, které v této práci nebyly analyzovány.

Literární údaje zabývající se indukcí apoptózy u Hep-2 buněk etoposidem, nebo expresí genů BCL2 a BAX nejsou časté. Balasubashini et al. (2006) se zmiňují o poklesu BCL2 proteinu po indukci apoptózy u Hep-2 buněk pomocí jedu z ryby Perutýna ohnivého (*Pterios volitans*). Singh et al. (2006) indukovali apoptózu u Hep-2 buněk karboplatinou a 5-fluorouracilem (5-FU). Na úrovni proteinů pak zaznamenali pokles hladiny BCL2, protein BAX zůstal beze změny.

Podobné výsledky, ale u buněk buněčné linie PANC-1, zaznamenali např. i Ikeguchi et al. (2002a), kteří se zabývali vlivem cisplatinou na expresi apoptotických genů u různých

buněčných linií. U buněčné linie PANC-1 naměřili zvýšení exprese genu BCL2 po 12 hod a 24 hod, gen BAX zůstal beze změny. U buněčné linie MKN-45 se zvýšila exprese genu BAX po 24 hod, exprese genu BCL2 se nezměnila. U buněčné linie LoVo, došlo ke zvýšení exprese genu BAX po 12 hod a 24 hod, u genu BCL2 snížení exprese po 24 hod. Tyto výsledky ukazují, že každá buněčná linie může na indukci apoptózy jedním druhem cytostatika reagovat různou expresí genů.

## **HL-60**

Po analýze genové exprese genu BCL2 u buněčné linie HL-60 po indukci apoptózy bylo zjištěno, že u skupiny buněk ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému snížení exprese ve srovnání s kontrolní skupinou. U buněk ovlivněných 12 hod došlo naopak ke statisticky významnému zvýšení exprese a to jak ve srovnání s kontrolní skupinou tak se skupinou ovlivněnou 6 hod.

Kvantifikace genové exprese genu BAX ukázala, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese. U buněk ovlivněných 12 hod byla statisticky významně vyšší exprese než u kontrolních buněk, nebyla však statisticky významně vyšší ve srovnání s buňkami ovlivněných 6 hod.

Tyto výsledky odpovídají původním předpokladům o vývoji exprese těchto dvou genů po indukci apoptózy. I výsledky ostatních autorů jsou podobné, ale i zde platí, že exprese těchto dvou genů se liší podle typu použitého cytostatika na indukci apoptózy.

Floros et al. (2006a) naměřili zvýšení exprese genu BAX po 4 hod od ovlivnění buněčné linie HL-60 etoposidem. Exprese genu BCL2 se nezměnila. U stejné buněčné linie pak naměřili snížení exprese BCL2 po indukci apoptózy topotecanem a methotrexatem (Floros et al. 2006b). Rózalski et al. (2005) naměřili snížení exprese genu BCL2 a zvýšení exprese BAX po ovlivnění HL-60 buněk doxorubicinem a amifostinem. Floros et al. (2004) u buněk buněčné linie HL-60 indukovali apoptózu a zaznamenali pokles exprese genů BAX a BCL2 po ovlivnění karboplatinou, zatímco po ovlivnění doxorubicinem se exprese nezměnila. Po ovlivnění cisplatinou bylo zaznamenáno snižování exprese BCL2 (Floros et al. 2003).

## 5.4 Kvantifikace exprese genu DFFB

Jeden z nejdůležitějších enzymů způsobující internukleozomální fragmentaci je endonukleáza nazývaná DFF. V neaktivní formě je DFF heterodimer složený ze dvou 40 a 45 kDa proteinových podjednotek nazývaných DFFB a DFFA. DFFB je katalytická podjednotka, zatímco DFFA regulační podjednotka DFF. Protein DFFA navázaný na DFFB inhibuje nukleázovou aktivitu a po naštěpení DFFA kaspázou 3 je uvolněn aktivní enzym DFFB (Liu et al. 1997). DFFB uvolněný z komplexu s DFFA pak tvoří homooligomery, které tvoří enzymaticky aktivní formu nukleázy. Aktivní enzym pak štěpí chromatin mezi nukleozomy za vzniku mono- a oligonukleozomálních fragmentů (Liu et al. 1999).

Kvantifikací genové exprese DFFB se zabývali např. McDonald et al. (2005), kteří sledovali expresi genů DFFA a DFFB u buněk oligodendroglionu. Pouze u genu DFFB byla zjištěna snížená exprese ve srovnání s normálními mozkovými buňkami. Mahmoud-Ahmed et al. (2006) sledovali změny v expresi genů mozkových buněk myši po indukci apoptózy ozářováním. Pomocí real-time RT-PCR byla naměřena zvýšená exprese DFFB již 1 hod po ozáření.

Více prací je však zaměřeno na detekci proteinů DFFA a DFFB a ověřování jejich funkčnosti, či na expresi na úrovni proteinů. Iguchi et al. (2002) nepozorovali tvorbu typických ladderů z DNA po indukci apoptózy etoposidem a neocarzinostatinem u Molt-4 buněk. Při stanovení exprese proteinů DFFB a DFFA však nebyly zjištěny rozdíly v porovnání s ostatními liniemi. Luciano et al. (2002) indukovali apoptózu u T a B leukemických buněčných linií. U B leukemických buněčných linií nebyla pozorována DNA fragmentace. Při sledování exprese proteinů DFFA a DFFB bylo zjištěno, že u T buněk dochází k vysoké expresi DFFB v poměru k DFFA. U B buněk tomu bylo naopak tzn. vyšší exprese DFFA a velmi nízká DFFB. Park et al. (2005) indukovali apoptózu sulindakem u buněk buněčné linie HT-29. Prokázali translokaci AIF a endonukleázy G z mitochondrií do jádra a DFFB z cytosolu do jádra. Neobjevila se však oligonukleozomální fragmentace DNA, pouze štěpení DNA na velké fragmenty. Tyto výsledky ukazují, že translokace DFFB a endonukleázy G nestačí k oligonukleozomální fragmentaci DNA v této buněčné linii.

### Hep-2

Kvantitativní analýzou genové exprese genu DFFB bylo zjištěno, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo k mírnému zvýšení exprese genu DFFB

v porovnání s kontrolní skupinou. Toto zvýšení však nebylo statisticky významné. U skupiny buněk ovlivněných 12 hod došlo ke snížení exprese genu ve srovnání s kontrolní skupinou i s buňkami ovlivněnými 6 hod. Statisticky významné bylo toto snížení pouze při srovnání se skupinou buněk ovlivněných 6 hod.

### **HL-60**

Kvantitativní analýzou exprese genu DFFB bylo zjištěno, že u buněk ovlivněných etoposidem po dobu 6 hod došlo k mírnému snížení exprese genu DFFB, tato změna však nebyla statisticky významná. U skupiny buněk ovlivněných 12 hod nedošlo ke změně exprese tohoto genu.

Z uvedených výsledků vyplývá, že exprese genu DFFB, je v obou buněčných liniích poměrně stálá a nemění se ani po indukci apoptózy u těchto buněk. Exprese genů nic nevyovídá o funkčnosti proteinu, v publikacích je však popsána tvorba DNA ladderů jak u Hep-2 buněk (Červinka et al. 1999), tak i HL-60 buněk (Kravtsov et al. 1999, Bjorling-Poulsen et Issinger 2003, Rudolf et al. 2000b).

## 6. Závěr

U dvou stabilizovaných buněčných linií Hep-2 a HL-60 byla indukována apoptóza pomocí etoposidu. U každé buněčné linie byly tři skupiny buněk. První skupina kontrolní, tzn. buňky, které zůstaly bez ovlivnění. Druhou a třetí skupinu tvořily buňky ovlivněné etoposidem po dobu 6 hod a 12 hod. Po ovlivnění byly buňky sklizeny, byla izolována RNA, reverzní transkripcí převedena na cDNA a provedena kvantifikace genové exprese metodou real-time RT-PCR. Pro kvantifikaci genové exprese byly vybrány geny TP53, BCL2, BAX a DFFB. Jako referenční gen, ke kterému byla vztažena genová exprese těchto genů, byl použit gen PBGD.

Po kvantitativní analýze genové exprese genu TP53 bylo zjištěno, že u buněčné linie Hep-2 došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese po 6 hod ovlivnění ve srovnání s kontrolou, po 12 hod se exprese snížila, stále však byla statisticky významně vyšší než u kontrolní skupiny. Gen TP53 řídí jak zastavení buněčného cyklu, tak vstup buněk do apoptózy, zvýšení jeho exprese proto odpovídá indukci apoptózy u Hep-2 buněk. Buněčná linie HL-60 neexprimuje gen TP53, proto nemohla být provedena analýza.

Kvantifikace exprese genu BCL2 u buněčné linie Hep-2 ukázala, že jak po 6 hod tak po 12 hod došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese tohoto genu. Naopak exprese genu BAX zůstala beze změny. U HL-60 buněk došlo ke statisticky významnému poklesu exprese BCL2 po 6 hod ve srovnání s kontrolní skupinou, po 12 hod došlo ke zvýšení exprese ve srovnání jak se skupinou ovlivněnou 6 hod, tak s kontrolou. U genu BAX došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese po 6 hod ovlivnění, po 12 hod toto zvýšení bylo statisticky významné jen v porovnání s kontrolou. Expresí genů BCL2 a BAX se u těchto dvou buněčných linií značně liší, indukci apoptózy spíše odpovídá exprese genů u HL-60 buněk. U Hep-2 buněk však mohlo dojít k expresi i jiných proapoptotických genů, které v této práci nebyly analyzovány. Jedná se zřejmě také o různé reakce těchto nádorových buněk na působení etoposidu.

Analýza exprese genu DFFB u Hep-2 buněk ukázala, že došlo k mírnému nárůstu exprese po 6 hod, ne však statisticky významnému. Po 12 hod exprese tohoto genu klesla v porovnání s kontrolou i se skupinou ovlivněnou 6 hod. U buněčné linie HL-60 nedošlo ke změně exprese tohoto genu. Z těchto výsledků vyplývá, že exprese tohoto genu je v těchto buněčných liniích stálá a významně se nemění ani po indukci apoptózy.

## 7. Seznam literatury

- 1) **Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-6.
- 2) **Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH.** Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 1990; 136(3):593-608.
- 3) **Au JLS, Panchal N, Li D, Gan Y.** Apoptosis: a new pharmacodynamic endpoint. *Pharmaceut. Res.* 1997;14:1659-71.
- 4) **Aubert M, Pomeranz LE, Blaho JA.** Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells. *Apoptosis*. 2007;12(1):19-35.
- 5) **Bai J, Meng Z.** Expression of apoptosis-related genes in livers from rats exposed to sulfur dioxide. *Toxicology*. 2005;216(2-3):253-60.
- 6) **Balasubashini MS, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Rukkumani R, Menon VP.** FV peptide induces apoptosis in HEp 2 and HeLa cells: an insight into the mechanism of induction. *J. Carcinog.* 2006;5:27.
- 7) **Baldwin EL, Osheroff N.** Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. 2005;5(4):363-72.
- 8) **Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M.** mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 1993;12(2):461-8.
- 9) **Bengtsson M, Karlsson HJ, Westman G, Kubista M.** A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(8):45.
- 10) **Bjørning-Poulsen M, Issinger OG.** cDNA array analysis of alterations in gene expression in the promyelocytic leukemia cell line, HL-60, after apoptosis induction with etoposide. *Apoptosis*. 2003;8(4):377-88.
- 11) **Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D.** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996;85: 803-15.
- 12) **Boley SE, Wong VA, French JE, Recio L.** p53 heterozygosity alters the mRNA expression of p53 target genes in the bone marrow in response to inhaled benzene. *Toxicol. Sci.* 2002;66(2):209-15.

- 13) **Brown JE, Dunmore SJ.** Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2 : Bax ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2007;23(6):497-502.
- 14) **Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S et al.** Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature.* 1995;377(6550):646-9.
- 15) **Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C et al.** Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 1998;282(5393):1497-501.
- 16) **Burden DA, Osheroff N.** Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1400(1-3):139-54.
- 17) **Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.
- 18) **Bustin SA.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 2002;29(1):23-39.
- 19) **Candé C, Cohen I, Daugas E et al.** Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.* 2002;84(2-3):215-22.
- 20) **Caplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT.** Light Cycler™ hybridization probes-the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica.* 1999;1: 5-8.
- 21) **Cervinka M, Bereiter-Hahn J, Peychl J, Rudolf E, Cervinková Z.** The role of mitochondria in apoptosis induced in vitro. *Gen. Physiol. Biophys.* 1999;18 Spec No:33-40.
- 22) **Cervinka M, Cerman J, Rudolf E.** Apoptosis in Hep2 cells treated with etoposide and colchicine. *Cancer Detect. Prev.* 2004;28(3):214-26.
- 23) **Clem R J, Cheng E H-Y, Karp CL et al.** Modulation of cell death by Bcl-X<sub>L</sub> through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95: 554-9.
- 24) **Cohen J.** Apoptosis. *Immunol. Today.* 1993; 14:126-30.
- 25) **Corbett reseach.** Real-time amplification on the Rotor-Gene: Overview of the chemistries and optimizations (Real time summery, version 1.7), 50 p.
- 26) **Dal Canto MC, Gurney ME.** Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* 1994;145(6):1271-9.
- 27) **Dallaporta B, Marchetti P, de Pablo MA et al.** Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 1999;162:6534-42.



- 28) Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Crooke ST, Mirabelli CK.** Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry*. 1989;28(20):8154-60.
- 29) Duran N., Allahverdiyev AM, Cetiner S.** Flow Cytometric Analysis of the Effects of Methotrexate and Vepesid on the HEP-2 Cell Cycle. *Turk. J. Med. Sci.* 2001;31:187-192.
- 30) Earnshaw WC, Martins LM, Kaufman SH.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:383-424.
- 31) el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75(4):817-25.
- 32) Eliseev RA, Gunter KK, Gunter TE.** Bcl-2 prevents abnormal mitochondrial proliferation during etoposide-induced apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 2003;289(2):275-81.
- 33) Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007;35(4):495-516.
- 34) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998;391(6662):43-50.
- 35) Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM.** The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell. Death. Differ.* 1998;5:551-562.
- 36) Filipski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M, Walker PR.** Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J.* 1990;9(4):1319-27.
- 37) Floros KV, Talieri M, Scorilas A.** Topotecan and methotrexate alter expression of the apoptosis-related genes BCL2, FAS and BCL2L12 in leukemic HL-60 cells. *Biol. Chem.* 2006b;387(12):1629-33.
- 38) Floros KV, Thomadaki H, Florou D, Talieri M, Scorilas A.** Alterations in mRNA expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, FAS, caspase-3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006a;1090:89-97.
- 39) Floros KV, Thomadaki H, Katsaros N, Talieri M, Scorilas A.** mRNA expression analysis of a variety of apoptosis-related genes, including the novel gene of the BCL2-family, BCL2L12, in HL-60 leukemia cells after treatment with carboplatin and doxorubicin. *Biol. Chem.* 2004;385(11):1099-103.
- 40) Floros KV, Thomadaki H, Lallas G, Katsaros N, Talieri M, Scorilas A.** Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential

expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;1010:153-8.

**41) Formigli L, Papucci L, Tani A et al.** Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.* 2000;182(1):41-9.

**42) Fortune JM, Osheroff N.** Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2000;64:221-53.

**43) Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE.** Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999;26(1):112-22, 124-5.

**44) Fuchs B, Zhang K, Rock MG, Bolander ME, Sarkar G.** Repeat cDNA synthesis and RT-PCR with the same source of RNA. *Mol Biotechnol.* 1999;12(3):231-5.

**45) Gallagher R, Collins S, Trujillo J et al.** Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1979;54(3):713-33.

**46) Galvan V, Brandimarti R, Munger J, Roizman B.** Bcl-2 blocks a caspase-dependent pathway of apoptosis activated by herpes simplex virus 1 infection in HEP-2 cells. *J. Virol.* 2000;74(4):1931-8.

**47) Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA.** Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1998;273: 32608-13.

**48) Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O.** Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal. Biochem.* 2001;295(1):17-21.

**49) Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ.** Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 1998;17: 3878-85.

**50) Grzanka A, Grzanka D.** The influence of etoposide on the distribution of tubulin in human leukemia cell line HL-60. *Med. Sci. Monit.* 2003;9(1):66-9.

**51) Halenbeck R, MacDonald H, Roulston A, Chen TT, Conroy L, Williams LT.** CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF45. *Curr. Biol.* 1998;8(9):537-40.

**52) Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K et al.** Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell.* 1995;6(4):387-400.

**53) Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M.** Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-9.

**54) Hawkins HK, Ericsson JLE, Biberfeld P, Trump BF.** Lysosome and phagosome stability in lethal cell injury: morphologic tracer studies in cell injury due the inhibition of energy metabolism, immune cytolysis, and photosensitization. *Am. J. Pathol.* 1972;68:255-288.

**55) Hermeking H, Lengauer C, Polyak K et al.** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell.* 1997;1(1):3-11.

**56) Higginbottom K, Jahnke U, Newland AC, Cotter FE, Allen PD.** New alternative phosphorylation sites on the cyclin dependent kinase 1/cyclin a complex in p53-deficient human cells treated with etoposide: possible association with etoposide-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2007;12(10):1847-55.

**57) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992;10(4):413-7.

**58) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991;88(16):7276-80.

**59) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253(5015):49-53.

**60) Howard MT, Neece SH, Matson SW, Kreuzer KN.** Disruption of a topoisomerase-DNA cleavage complex by a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994;91(25):12031-5.

**61) Chao DT, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family: regulators of cell death. *J. Annu. Rev. Immunol.* 1998;16: 395-419.

**62) Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL.** Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J. Biol. Chem.* 1978;253:4809-4817.

**63) Iguchi K, Hirano K, Ishida R.** Activation of caspase-3, proteolytic cleavage of DFF and no oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic Molt-4 cells. *J. Biochem.* 2002;131(3):469-75.

**64) Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N.** Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2002b;95(9):1938-45.

**65) Ikeguchi M, Kaibara N.** survivin messenger RNA expression is a good prognostic biomarker for oesophageal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 2002;87(8):883-7.

- 66) **Ikeguchi M, Nakamura S, Kaibara N.** Quantitative analysis of expression levels of bax, bcl-2, and survivin in cancer cells during cisplatin treatment. *Oncol. Rep.* 2002a;9(5):1121-6.
- 67) **Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM.** p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(5):2147-52.
- 68) **Inohara N, Koseki T, Chen S, Wu X, Nunez G.** CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 1998;17(9):2526-33.
- 69) **Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Gawron A, Kandefers-Szerszeń M.** The effect of heat shock, cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp27 expression in human normal and tumour cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2002;40(1):31-5.
- 70) **Kaufmann SH.** Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1400(1-3):195-211.
- 71) **Kerr JRF, Wyllie AH, Currie, AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972;26:239-257.
- 72) **Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, Muegge K, Durum SK.** Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999;96:14476-81.
- 73) **Ko LJ, Prives C.** p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996;10(9):1054-72.
- 74) **Konturek PC, Burnat G, Hahn EG.** Inhibition of Barrett's adenocarcinoma cell growth by simvastatin: involvement of COX-2 and apoptosis-related proteins. *J. Physiol. Pharmacol.* 2007;58 Suppl 3:141-8.
- 75) **Korsmeyer S.** BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *J. Cancer Res.* 1999;59:1693-1700.
- 76) **Krammer PH.** CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol. Today* 1999;71:163-210.
- 77) **Kravtsov VD, Daniel TO, Koury MJ.** Comparative analysis of different methodological approaches to the in vitro study of drug-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.* 1999;155(4):1327-39.
- 78) **Krepela E, Prochazka J, Fiala P, Zatloukal P, Selinger P.** Expression of apoptosome pathway-related transcripts in non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2006;132(1):57-68.

- 79) **Krepela E, Procházka J, Liul X, Fiala P, Kinkor Z.** Increased expression of Apaf-1 and procaspase-3 and the functionality of intrinsic apoptosis apparatus in non-small cell lung carcinoma. *Biol. Chem.* 2004;385(2):153-68.
- 80) **Kroemer G, Zamzami N, Susin SA.** Mitochondrial control of apoptosis. *Imunol. Today.* 1997;18: 44-51.
- 81) **Křemen J., Pohlreich P., Stříbrná J.** *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně.* 1998, Karolinum, Praha 117p.
- 82) **Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al.** The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.
- 83) **Lane DP.** Cancer, p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15-6.
- 84) **Levine AJ.** p53 the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323-31.
- 85) **Levine JS, Koh JS.** The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen, and accelerant. *Semin. Nephrol.* 1999;19:34-47.
- 86) **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91:479-89.
- 87) **Liu X, Li P, Widlak P et al.** The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998;95(15):8461-6.
- 88) **Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X.** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 1997;89(2):175-84.
- 89) **Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X.** Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J. Biol. Chem.* 1999;274(20):13836-40.
- 90) **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- 91) **Luciano F, Ricci JE, Herrant M et al.** T and B leukemic cell lines exhibit different requirements for cell death: correlation between caspase activation, DFF40/DFF45 expression, DNA fragmentation and apoptosis in T cell lines but not in Burkitt's lymphoma. *Leukemia.* 2002;16(4):700-7.

- 92) **Lugovskoy AA, Zhou P, Chou JJ, McCarty JS, Li P, Wagner G.** Solution structure of the CIDE-N domain of CIDE-B and a model for CIDE-N/CIDE-N interactions in the DNA fragmentation pathway of apoptosis. *Cell.* 1999;99(7):747-55.
- 93) **Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94: 481-90.
- 94) **Mahmoud-Ahmed AS, Atkinson S, Wong CS.** Early gene expression profile in mouse brain after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 2006;165(2):142-54.
- 95) **Malerba I, Gribaldo L, Diodovich C et al.** Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human bone marrow and HL-60 p53 null cells treated with anti-cancer drugs. *Toxicol. In Vitro.* 2005;19(4):523-32.
- 96) **Mannhalter C, Koizar D, Mitterbauer G.** Evaluation of RNA isolation methods and reference genes for RT-PCR analyses of rare target RNA. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000;38(2):171-7.
- 97) **McDonald JM, Dunmire V, Taylor E et al.** Attenuated expression of DFFB is a hallmark of oligodendrogliomas with 1p-allelic loss. *Mol. Cancer.* 2005;4:35.
- 98) **Minn AJ, Swain RE, Ma A, Thompson CB.** Recent progress on the regulation of apoptosis by Bcl-2 family members. *Adv. Immunol.* 1998;70: 245-79.
- 99) **Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC.** Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* 1994a;54(12):3131-5.
- 100) **Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M et al.** Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994b;9(6):1799-805.
- 101) **Miyashita T, Reed JC.** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-9.
- 102) **Momand J, Wu HH, Dasgupta G.** MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene.* 2000;242(1-2):15-29.
- 103) **Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW.** Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* 1955;15(9):598-602.
- 104) **Mukae N, Enari M, Sakahira H et al.** Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998;95(16):9123-8.
- 105) **Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M et al.** Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* 2004;28(5):487-94.

- 106) Navakauskiene R, Treigyte G, Savickiene J, Gineitis A, Magnusson KE.** Alterations in protein expression in HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis modulated by the caspase inhibitor ZVAD.fmk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1030:393-402.
- 107) Newmeyer DD, Ferguson-Miller S.** Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 2003;112(4):481-90.
- 108) Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y.** Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* 2002;12(5):231-5.
- 109) Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N.** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998;17: 3237-45.
- 110) Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al.** Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 1993;12(9):3679-84.
- 111) Oda E, Ohki R, Murasawa H et al.** Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288(5468):1053-8.
- 112) Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S et al.** Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.* 2001;21(13):4752-60.
- 113) Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC et al.** Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell Biol.* 1995;15(6):3032-40.
- 114) Pan MH, Huang MC, Wang YJ, Lin JK, Lin CH.** Induction of apoptosis by hydroxydibenzoylmethane through coordinative modulation of cyclin D3, Bcl-X(L), and Bax, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(14):3977-84.
- 115) Parihar A, Parihar MS, Ghafourifar P.** Significance of mitochondrial calcium and nitric oxide for apoptosis of human breast cancer cells induced by tamoxifen and etoposide. *Int. J. Mol. Med.* 2008;21(3):317-24.
- 116) Park YC, Jeong JH, Park KJ et al.** Sulindac activates nuclear translocation of AIF, DFF40 and endonuclease G but not induces oligonucleosomal DNA fragmentation in HT-29 cells. *Life Sci.* 2005;77(16):2059-70.
- 117) Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP.** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 2004;26(6):509-15.

- 118) Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- 119) Pohl U, Wagenknecht B, Naumann U, Weller M.** p53 enhances BAK and CD95 expression in human malignant glioma cells but does not enhance CD95L-induced apoptosis. *Cell Physiol. Biochem.* 1999;9(1):29-37.
- 120) Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL.** Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 2003;283(1):1-16.
- 121) Raja S, Luketich JD, Kelly LA, Ruff DW, Godfrey TE.** Increased sensitivity of one-tube, quantitative RT-PCR. *Biotechniques.* 2000;29(4):702, 704, 706.
- 122) Ramírez-Sandoval R, Sánchez-Rodríguez SH, Herrera-van Oostdam D, Avalos-Díaz E, Herrera-Esparza R.** Antinuclear antibodies recognize cellular autoantigens driven by apoptosis. *Joint Bone Spine.* 2003;70(3):187-94.
- 123) Rehemtulla A, Hamilton CA, Chinnaiyan AM, Dixit VM.** Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J. Biol. Chem.* 1997;272:25783-6.
- 124) Rózsalski M, Mirowski M, Balcerczak E, Krajewska U, Mlynarski W, Wierzbicki R.** Induction of caspase 3 activity, bcl-2 bax and p65 gene expression modulation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by doxorubicin with amifostine. *Pharmacol. Rep.* 2005;57(3):360-6.
- 125) Rudolf E, Cervinka M.** Membrane blebbing in cancer cells treated with various apoptotic inducers. *Acta Medica.* 2005;48(1):29-34.
- 126) Rudolf E, Peychl J, Cervinka M.** The dynamics of the hexavalent chromium induced apoptotic patterns in vitro. *Acta Medica.* 2000b;43(3):83-9.
- 127) Rudolf E, Peychl J, Novak J, Cervinka M.** Apoptosis - when the cells begin to dance. *Front. Biosci.* 2000a;5:F1-2.
- 128) Rudolf E, Radocha J, Cervinka M, Cerman J.** Combined effect of sodium selenite and camptothecin on cervical carcinoma cells. *Neoplasma.* 2004;51(2):127-35.
- 129) Rudolf E, Rudolf K, Cervinka M.** Zinc induced apoptosis in HEP-2 cancer cells: the role of oxidative stress and mitochondria. *Biofactors.* 2005;23(2):107-20.
- 130) Sabbagh L, Bourbonniere M, Sekaly RP, Cohen LY.** Selective up-regulation of caspase-3 gene expression following TCR engagement. *Mol. Immunol.* 2005;42(11):1345-54.
- 131) Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230(4732):1350-4.



- 132) Sakahira H, Enari M, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S.** Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr. Biol.* 1999;9(10):543-6.
- 133) Salvesen GS, Dixit VM.** Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997;91: 443-6.
- 134) Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S.** Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* 1999;18:2040-8.
- 135) Sano J, Oguma K, Kano R, Yazawa M, Tsujimoto H, Hasegawa A.** High expression of Bcl-xL in delayed apoptosis of canine neutrophils induced by lipopolysaccharide. *Res. Vet. Sci.* 2005;78(2):183-7.
- 136) Shimizu S, Tsujimoto Y.** Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97: 577-82.
- 137) Schanne FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL.** Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science.* 1979;206:700-702.
- 138) Schmittgen TD, Zakrajsek BA.** Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem. Biophys. Methods.* 2000;46(1-2):69-81.
- 139) Schwabe H, Stein U, Walther W.** High-copy cDNA amplification of minimal total RNA quantities for gene expression analyses. *Mol. Biotechnol.* 2000;14(2):165-72.
- 140) Schwartzman RA and Cidlowski JA.** Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev.* 1993;14:133-151.
- 141) Singh R, Upadhyay G, Kumar S et al.** Hypothyroidism alters the expression of Bcl-2 family genes to induce enhanced apoptosis in the developing cerebellum. *J. Endocrinol.* 2003;176(1):39-46.
- 142) Singh S, Chhipa RR, Vijayakumar MV, Bhat MK.** DNA damaging drugs-induced down-regulation of Bcl-2 is essential for induction of apoptosis in high-risk HPV-positive HEp-2 and KB cells. *Cancer Lett.* 2006;236(2):213-21.
- 143) Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE.** An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000;97(26):14376-81.
- 144) Stähelin HF, von Wartburg A.** The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: ninth Cain memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1991;51(1):5-15.

- 145) Stark AM, Hugo HH, Tscheslog H, Mehdorn HM.** p53, BCL-2 and BAX in non-small cell lung cancer brain metastases: a comparison of real-time RT-PCR, ELISA and immunohistochemical techniques. *Neurol. Res.* 2007;29(5):435-40.
- 146) Stark AM, Pfannenschmidt S, Tscheslog H et al.** Reduced mRNA and protein expression of BCL-2 versus decreased mRNA and increased protein expression of BAX in breast cancer brain metastases: a real-time PCR and immunohistochemical evaluation. *Neurol. Res.* 2006;28(8):787-93.
- 147) Strasser A, O'Connor L, Dixit VM.** Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:217-45.
- 148) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al.** Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 1999a;189:381-94.
- 149) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999b;397:441-6.
- 150) Suzuki K, Kazui T, Yoshida M et al.** Drug-induced apoptosis and p53, BCL-2 and BAX expression in breast cancer tissues in vivo and in fibroblast cells in vitro. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 1999;29(7):323-31.
- 151) Svanvik N, Westman G, Wang D, Kubista M.** Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution. *Anal. Biochem.* 2000;281(1):26-35.
- 152) Swift GH, Peyton MJ, MacDonald RJ.** Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques.* 2000;28(3):524-531.
- 153) Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, Hoon DS.** Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int. J. Cancer.* 2005;117(6):1032-8.
- 154) Thomas D, Yang H, Boffa DJ et al.** Proapoptotic Bax is hyperexpressed in isolated human islets compared with antiapoptotic Bcl-2. *Transplantation.* 2002;74(11):1489-96.
- 155) Turmaine M, Raza A, Mahal A et al.** Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(14):8093-7.
- 156) Tyagi AK, Agarwal C, Singh RP, Shroyer KR, Glode LM, Agarwal R.** Silibinin down-regulates survivin protein and mRNA expression and causes caspases activation and apoptosis in human bladder transitional-cell papilloma RT4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;312(4):1178-84.

- 157) Tyagi S, Kramer FR.** Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 1996;14(3):303-8.
- 158) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):0034.1-0034.11.
- 159) Vogelstein B, Kinzler KW.** p53 function and dysfunction. *Cell.* 1992;70(4):523-6.
- 160) Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P.** Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol. Med.* 2001;7(1):36-48.
- 161) Widlak P, Li P, Wang X, Garrard WT.** Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J. Biol. Chem.* 2000;275(11):8226-32.
- 162) Wilstermann AM, Osheroff N.** Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. *Curr. Top. Med. Chem.* 2003;3(3):321-38.
- 163) Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH.** Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ.* 1991;2(4):209-14.
- 164) Wolter KG, Hsu Y-T, Smith CL, Nechushtan A, Xi X-G, Youle RJ.** Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997;139: 1281-92.
- 165) Wu GS, Burns TF, McDonald ER et al.** KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 1997;17(2):141-3.
- 166) Xing CG, Zhu BS, Liu HH et al.** LY294002 induces p53-dependent apoptosis of SGC7901 gastric cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2008;29(4):489-98.
- 167) Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 1995;80: 285-91.
- 168) Yang L, Rowe TC, Liu LF.** Identification of DNA topoisomerase II as an intracellular target of antitumor epipodophyllotoxins in simian virus 40-infected monkey cells. *Cancer Res.* 1985;45:5872-6.
- 169) Zamzami N, Kroemer G.** Condensed matter in cell death. *Nature.* 1999;40:127-8.
- 170) Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer S.** Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell.* 1996;87: 619-28.

**171) Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F.** Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e103.

**172) Zundel W, Giaccia A.** Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Devel.* 1998;12: 1941-46.

**173) Zuryn A, Grzanka A, Stepien A, Grzanka D, Debski R, Smolinski D.** Expression of cyclin A in human leukemia cell line HL-60 following treatment with doxorubicin and etoposide: the potential involvement of cyclin A in apoptosis. *Oncol. Rep.* 2007;17(5):1013-9.

## **Internetové odkazy:**

Obr. 1 (<http://www.scq.ubc.ca/apoptosis/>)

Obr.2 (<http://biology.about.com/cs/cellbiology/a/aa031204a.htm>)

Obr. 3 (<http://www.cellsignal.com/reference/pathway.html>)

Obr. 4 (<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>)

Obr. 5 ([http://www.takarabiousa.com/html/PCR\\_RTPCR\\_INTRO.html](http://www.takarabiousa.com/html/PCR_RTPCR_INTRO.html))

Obr. 6 ([http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp\\_gp/cvn\\_gp\\_how.html](http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp_gp/cvn_gp_how.html))

Obr.7(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/gaikovitch-elena-a-2003-07-14/HTML/chapter2.html>)

Obr. 8 ([http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp\\_gp/cvn\\_gp\\_how.html](http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/sp_gp/cvn_gp_how.html))

Obr. 9 (<http://www.rt-pcr.com/>)

Obr. 10 (<http://arthritis-research.com/content/4/4/R3/figure/F1>)

Obr. 12 (<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/convphagedamarkers.htm>)

Obr. 13 (<http://www.biocompare.com/itemdetails.asp?itemid=4419>)

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v normální prsní žláze před a po chemoterapii:

	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální makrofágy	0 ± 0	4 ± 15
intraepiteliální lymfocyty	99 ± 2	89 ± 18
intraepiteliální neutrofil	1 ± 2	8 ± 13
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0
stromální makrofágy	0 ± 1	2 ± 5
stromální lymfocyty	86 ± 16	72 ± 13
stromální neutrofil	3 ± 4	5 ± 5
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	10 ± 12	20 ± 13

Procentuální zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v invazivním tumoru před chemoterapií ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity	změna do 5 %	zvýšení celularity
intraepiteliální makrofágy	3 ± 10	7 ± 15	1 ± 2
intraepiteliální lymfocyty	94 ± 14	90 ± 15	86 ± 28
intraepiteliální neutrofil	1 ± 3	2 ± 4	13 ± 29
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	2 ± 10	1 ± 4	0 ± 0
stromální makrofágy	2 ± 5	1 ± 3	1 ± 1
stromální lymfocyty	90 ± 9	92 ± 5	90 ± 8
stromální neutrofil	6 ± 6	3 ± 3	6 ± 7
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	3 ± 4	4 ± 4	4 ± 5

Procentuální zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v invazivním tumoru po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity	změna do 5 %	zvýšení celularity
intraepiteliální makrofágy	6 ± 13	13 ± 23	4 ± 9
intraepiteliální lymfocyty	87 ± 17	83 ± 29	87 ± 23
intraepiteliální neutrofil	4 ± 9	3 ± 7	9 ± 22
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	3 ± 11	1 ± 5	0 ± 0
stromální makrofágy	2 ± 4	6 ± 11	2 ± 2
stromální lymfocyty	81 ± 12	75 ± 13	83 ± 12
stromální neutrofil	8 ± 9	11 ± 10	7 ± 8
stromální eozinofil	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	9 ± 8	8 ± 8	8 ± 8

Procentuální zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v normální prsní žláze po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity	změna do 5 %	zvýšení celularity
intraepiteliální makrofágy	2 ± 6	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální lymfocyty	89 ± 17	97 ± 4	94 ± 8
intraepiteliální neutrofil	9 ± 17	3 ± 4	6 ± 8
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální makrofágy	2 ± 5	1 ± 1	1 ± 1
stromální lymfocyty	73 ± 15	66 ± 7	68 ± 15
stromální neutrofil	7 ± 7	8 ± 8	5 ± 3
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	18 ± 13	25 ± 16	26 ± 15

Procentuální zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v invazivním tumoru před chemoterapií ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1	Chevallier 2	Chevallier 3	Chevallier 4
intraepiteliální makrofágy	3 ± 7	0 ± 1	3 ± 11	3 ± 9
intraepiteliální lymfocyty	92 ± 13	73 ± 49	90 ± 20	94 ± 10
intraepiteliální neutrofil	5 ± 8	26 ± 48	4 ± 15	3 ± 5
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 10	0 ± 0
stromální makrofágy	1 ± 4	1 ± 0	2 ± 5	1 ± 1
stromální lymfocyty	88 ± 11	87 ± 15	90 ± 9	91 ± 8
stromální neutrofil	6 ± 6	12 ± 16	4 ± 15	4 ± 3
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	5 ± 6	1 ± 2	2 ± 3	5 ± 6

Procentuální zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v invazivním tumoru po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1	Chevallier 4
intraepiteliální makrofágy	8 ± 17	5 ± 10
intraepiteliální lymfocyty	86 ± 23	86 ± 16
intraepiteliální neutrofil	4 ± 13	6 ± 10
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	2 ± 9	3 ± 9
stromální makrofágy	4 ± 7	1 ± 3
stromální lymfocyty	78 ± 13	83 ± 10
stromální neutrofil	9 ± 10	7 ± 6
stromální eozinofil	0 ± 0	1 ± 2
stromální mastocyty	9 ± 9	8 ± 7

Procentuální zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v normální prsní žláze po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1	Chevallier 2	Chevallier 3	Chevallier 4
intraepiteliální makrofágy	1 ± 3	27 ± 47	2 ± 7	1 ± 2
intraepiteliální lymfocyty	94 ± 10	58 ± 36	90 ± 17	91 ± 11
intraepiteliální neutrofil	5 ± 9	15 ± 19	8 ± 17	8 ± 11
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální makrofágy	3 ± 5	5 ± 9	2 ± 5	0 ± 1
stromální lymfocyty	75 ± 8	68 ± 20	71 ± 15	72 ± 12
stromální neutrofil	4 ± 5	6 ± 8	5 ± 4	5 ± 9
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	18 ± 8	21 ± 23	22 ± 16	18 ± 9

Procentuální zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v invazivním tumoru před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR	non pCR
intraepiteliální makrofágy	3 ± 7	3 ± 10
intraepiteliální lymfocyty	92 ± 13	90 ± 21
intraepiteliální neutrofil	5 ± 8	5 ± 18
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	2 ± 8
stromální makrofágy	1 ± 4	1 ± 4
stromální lymfocyty	83 ± 11	90 ± 9
stromální neutrofil	6 ± 6	6 ± 7
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	5 ± 6	3 ± 4

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v normální prsní žláze před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilů	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	3 ± 2	1 ± 1	11 ± 30	2 ± 2
stromální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 9	0 ± 0

Počty intraepiteliálních granulocytů v dilatovaných vývodech prsní žlázy po chemoterapii:

	max.
intraepiteliální neutrofilů	3 ± 6
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních granulocytů v invazivním tumoru před chemoterapií ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5%		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální neutrofilů	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	6 ± 19
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	9 ± 16	2 ± 3	6 ± 4	1 ± 2	21 ± 49	16 ± 44
stromální eozinofilů	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních granulocytů v invazivním tumoru po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5%		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální neutrofilů	1 ± 2	0 ± 1	2 ± 5	1 ± 3	5 ± 15
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	21 ± 42	3 ± 4	14 ± 12	4 ± 3	67 ± 177	7 ± 14
stromální eozinofilů	2 ± 9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních granulocytů v normální prsní žláze po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5%		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální neutrofilů	1 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	6 ± 5	3 ± 2	5 ± 4	4 ± 3	4 ± 4	2 ± 2
stromální eozinofilů	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v normální prsní žláze před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	10 ± 8	6 ± 3	14 ± 10	7 ± 4

Počty intraepiteliálních mastocytů v dilatovaných vývodech prsní žlázy po chemoterapii:

	max.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních mastocytů v invazivním tumoru před chemoterapií ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5%		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	5 ± 7	1 ± 1	4 ± 5	1 ± 1	5 ± 7	2 ± 2

Počet intraepiteliálních a stromálních mastocytů v invazivním tumoru po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5%		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální mastocyty	0 ± 2	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	10 ± 11	3 ± 4	10 ± 9	3 ± 4	13 ± 7	3 ± 3

Počet intraepiteliálních a stromálních mastocytů v normální prsní žláze po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5%		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	12 ± 7	6 ± 3	25 ± 19	12 ± 9	16 ± 12	7 ± 4

Počet intraepiteliálních a stromálních granulocytů v invazivním tumoru před chemoterapií ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilů	1 ± 1	0 ± 0	26 ± 50	12 ± 23	3 ± 10	0 ± 2	0 ± 1	0 ± 0
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	9 ± 13	3 ± 5	26 ± 29	10 ± 12	13 ± 29	6 ± 22	6 ± 8	2 ± 4
stromální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních granulocytů v invazivním tumoru po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilů	2 ± 8	1 ± 5	1 ± 3	0 ± 1
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	33 ± 96	4 ± 8	17 ± 33	1 ± 7
stromální eozinofilů	2 ± 8	0 ± 0	1 ± 4	0 ± 1

Počet intraepiteliálních a stromálních granulocytů v normální prsní žláze po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilů	2 ± 4	0 ± 1	2 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	27 ± 59	2 ± 2	4 ± 1	2 ± 1	5 ± 5	3 ± 2	5 ± 4	2 ± 2
stromální eozinofilů	3 ± 8	0 ± 0	15 ± 27	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních granulocytů v invazivním tumoru před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR		non pCR	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilů	1 ± 1	0 ± 0	3 ± 15	1 ± 6
intraepiteliální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilů	9 ± 13	3 ± 5	12 ± 24	5 ± 13
stromální eozinofilů	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních mastocytů v invazivním tumoru před chemoterapií ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	4 ± 3	1 ± 1	2 ± 2	1 ± 1	4 ± 3	1 ± 1	6 ± 9	2 ± 1

Počet intraepiteliálních a stromálních mastocytů v invazivním tumoru po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 2	0 ± 0	0 ± 2	0 ± 0
stromální mastocyty	11 ± 11	3 ± 4	10 ± 8	4 ± 4

Počet intraepiteliálních a stromálních mastocytů v normální prsní žláze po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	15 ± 11	7 ± 4	13 ± 11	7 ± 7	15 ± 9	8 ± 5	14 ± 11	5 ± 2

Počet intraepiteliálních a stromálních mastocytů v invazivním tumoru před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR		non pCR	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	4 ± 3	1 ± 1	5 ± 6	1 ± 1

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *normální prsní žláze* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	15 ± 8	9 ± 4	18 ± 35	6 ± 5
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	13 ± 13	8 ± 9	19 ± 18	8 ± 9
stromální lymfocyty	329 ± 525	65 ± 71	263 ± 388	38 ± 34
CD 3 stromální lymfocyty	260 ± 394	50 ± 40	128 ± 157	25 ± 30

Počty intraepiteliálních lymfocytů v *dilatovaných vývodech prsní žlázy* po chemoterapii:

	max.
intraepiteliální lymfocyty	9 ± 12
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	22 ± 31

Počet intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální lymfocyty	4 ± 4	2 ± 2	5 ± 8	3 ± 4	6 ± 7
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	4 ± 5	1 ± 2	4 ± 4	1 ± 1	10 ± 11	4 ± 5
stromální lymfocyty	299 ± 278	54 ± 69	200 ± 164	48 ± 34	543 ± 658	99 ± 144
CD 3 stromální lymfocyty	203 ± 157	45 ± 54	150 ± 129	31 ± 24	248 ± 175	58 ± 58

Počet intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální lymfocyty	5 ± 7	2 ± 3	13 ± 16	5 ± 7	8 ± 8
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	10 ± 19	3 ± 7	6 ± 8	2 ± 3	11 ± 10	2 ± 3
stromální lymfocyty	659 ± 698	63 ± 167	569 ± 383	29 ± 21	723 ± 503	57 ± 43
CD 3 stromální lymfocyty	374 ± 406	48 ± 111	345 ± 316	32 ± 42	323 ± 308	24 ± 23

Počet intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální lymfocyty	25 ± 52	7 ± 7	22 ± 25	10 ± 8	9 ± 8
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	23 ± 23	11 ± 12	11 ± 15	3 ± 4	13 ± 16	5 ± 7
stromální lymfocyty	259 ± 386	45 ± 44	70 ± 42	30 ± 1	34 ± 80	31 ± 34
CD 3 stromální lymfocyty	167 ± 207	39 ± 35	39 ± 2	17 ± 1	83 ± 96	10 ± 14

Počet intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	7 ± 6	4 ± 3	6 ± 6	4 ± 4
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	14 ± 14	7 ± 8	12 ± 6	5 ± 3
stromální lymfocyty	277 ± 305	50 ± 62	840 ± 782	84 ± 48
CD 3 stromální lymfocyty	263 ± 251	34 ± 30	398 ± 169	79 ± 56

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	4 ± 4	2 ± 3	6 ± 7	3 ± 4
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	5 ± 7	2 ± 3	5 ± 6	2 ± 3
stromální lymfocyty	328 ± 415	63 ± 93	310 ± 245	56 ± 58
CD 3 stromální lymfocyty	192 ± 147	38 ± 37	217 ± 175	55 ± 70

Počet intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	8 ± 10	3 ± 4	3 ± 6	1 ± 0
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	11 ± 19	3 ± 7	6 ± 9	2 ± 4
stromální lymfocyty	547 ± 496	35 ± 48	817 ± 772	95 ± 217
CD 3 stromální lymfocyty	308 ± 334	30 ± 52	454 ± 420	60 ± 135

Počet intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	15 ± 13	5 ± 2	12 ± 12	6 ± 6
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	18 ± 12	8 ± 7	21 ± 10	5 ± 5
stromální lymfocyty	400 ± 528	35 ± 26	247 ± 186	28 ± 11
CD 3 stromální lymfocyty	116 ± 105	28 ± 34	105 ± 144	13 ± 11

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	12 ± 12	6 ± 5	7 ± 8	1 ± 0
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	11 ± 7	6 ± 4	32 ± 30	14 ± 16
stromální lymfocyty	176 ± 267	44 ± 34	249 ± 432	25 ± 50
CD 3 stromální lymfocyty	127 ± 181	23 ± 20	154 ± 191	31 ± 45

Počet intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru* před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR		non pCR	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	7 ± 6	4 ± 3	5 ± 5	3 ± 3
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	14 ± 14	7 ± 8	5 ± 7	2 ± 3
stromální lymfocyty	277 ± 305	50 ± 62	355 ± 412	62 ± 80
CD 3 stromální lymfocyty	263 ± 251	34 ± 30	213 ± 162	47 ± 51

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *normální prsní žláze* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1
stromální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0

Počty intraepiteliálních NK buněk v *dilatovaných vývodech prsní žlázy* po chemoterapii:

	max.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	2 ± 7	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	3 ± 7	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke změně celularity tumoru po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
	intraepiteliální NK buňky	0 ± 1	0 ± 0	3 ± 4	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 3	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	1 ± 4	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	1 ± 2	0 ± 0	4 ± 10	0 ± 1

Počet intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle Chevallierovy klasifikace:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	1 ± 3	1 ± 2	2 ± 3	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 3	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru* před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR		non pCR	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	1 ± 4	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0



Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *normální prsní žláze* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 11	0 ± 2
CD 68 intraepiteliální makrofágy	8 ± 8	4 ± 4	6 ± 11	1 ± 2
stromální makrofágy	0 ± 1	0 ± 0	21 ± 41	1 ± 4
CD 68 stromální makrofágy	40 ± 49	16 ± 16	31 ± 72	9 ± 11

Počty intraepiteliálních (a intraluminálních) makrofágů v *dilatovaných vývodech prsní žlázy* po chemoterapii:

	max.
intraepiteliální makrofágy	32 ± 45
CD 68 intraepiteliální makrofágy	43 ± 58

Počet intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke *změně celularity tumoru* po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	1 ± 2	0 ± 0	2 ± 6	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	5 ± 6	2 ± 3	8 ± 8	4 ± 7	10 ± 11	5 ± 7
stromální makrofágy	7 ± 15	0 ± 1	7 ± 11	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 0
CD 68 stromální makrofágy	125 ± 88	49 ± 44	83 ± 41	37 ± 34	160 ± 120	59 ± 37

Počet intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke *změně celularity tumoru* po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	2 ± 7	0 ± 1	5 ± 8	2 ± 7	1 ± 1	0 ± 1
CD 68 intraepiteliální makrofágy	7 ± 12	2 ± 5	18 ± 18	6 ± 10	10 ± 6	3 ± 3
stromální makrofágy	35 ± 38	1 ± 2	35 ± 35	1 ± 1	56 ± 88	1 ± 2
CD 68 stromální makrofágy	100 ± 83	29 ± 36	102 ± 82	27 ± 22	117 ± 91	39 ± 25

Počet intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke *změně celularity tumoru* po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	2 ± 14	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 7	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	6 ± 13	1 ± 2	4 ± 6	2 ± 3	4 ± 7	0 ± 0
stromální makrofágy	9 ± 27	2 ± 6	1 ± 1	0 ± 0	13 ± 26	0 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	36 ± 57	11 ± 15	46 ± 34	13 ± 10	13 ± 18	3 ± 2

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *normální prsní žláze* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	1 ± 3	1 ± 1	3 ± 3	0 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0

Počty intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *dilatovaných vývodech prsní žlázy* po chemoterapii:

	max.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 4
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke *změně celularity tumoru* po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	3 ± 6	0 ± 1	6 ± 9	2 ± 5
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	2 ± 3	0 ± 2	2 ± 5	0 ± 1	6 ± 5	1 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	2 ± 10	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 3	0 ± 1

Počet intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke *změně celularity tumoru* po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 3	0 ± 1	3 ± 6	0 ± 1	4 ± 7	1 ± 1
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	3 ± 4	0 ± 1
CD 1a stromální dendritické buňky	3 ± 15	0 ± 1	5 ± 14	2 ± 6	4 ± 7	0 ± 1
CD 83 stromální dendritické buňky	11 ± 21	1 ± 2	6 ± 21	1 ± 2	19 ± 22	1 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	5 ± 10	1 ± 2	4 ± 5	1 ± 2	5 ± 5	0 ± 1

Počet intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke *změně celularity tumoru* po chemoterapii:

	snížení celularity		změna do 5 %		zvýšení celularity	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 3	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 0
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 3	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	2 ± 4	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 2	0 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	2 ± 3	1 ± 1	11 ± 11	1 ± 0	2 ± 4	1 ± 2

Počet intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle *Chevallierovy klasifikace*:

	Chevallier 1		Chevallier 2	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	0 ± 1	0 ± 0	2 ± 1	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	27 ± 53*	13 ± 23	10 ± 10	6 ± 9
stromální makrofágy	2 ± 3	0 ± 1	4 ± 7	1 ± 0
CD 68 stromální makrofágy	151 ± 142	59 ± 50	185 ± 116	44 ± 35

\*Vysoká hodnota v kategorii Chevallier 1 u maximálních intraepiteliálních hodnot CD 68 pozitivních makrofágů je způsobena jedním případem s velmi vysokým počtem makrofágů.

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	1 ± 3	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	8 ± 8	4 ± 5	5 ± 5	2 ± 3
stromální makrofágy	10 ± 18	1 ± 1	2 ± 4	0 ± 0
CD 68 stromální makrofágy	132 ± 91	47 ± 32	106 ± 85	50 ± 56

Počet intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle *Chevallierovy klasifikace*:

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	3 ± 8	1 ± 4	1 ± 2	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	10 ± 10	3 ± 6	10 ± 17	3 ± 6
stromální makrofágy	46 ± 54	1 ± 2	25 ± 35	1 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	105 ± 87	30 ± 35	101 ± 75	31 ± 25

Počet intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle *Chevallierovy klasifikace*:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	2 ± 3	0 ± 0	12 ± 20	4 ± 7	1 ± 5	0 ± 1	8 ± 18	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	5 ± 4	1 ± 1	16 ± 23	4 ± 6	3 ± 5	1 ± 2	11 ± 17	1 ± 1
stromální makrofágy	45 ± 62	1 ± 2	26 ± 26	2 ± 4	9 ± 28	2 ± 6	9 ± 21	0 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	92 ± 103	7 ± 7	56 ± 59	10 ± 10	22 ± 23	8 ± 8	48 ± 75	13 ± 19

Počet intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru* před chemoterapií dle *odpovědi na chemoterapii*:

	pCR		non pCR	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 3	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	27 ± 53*	13 ± 23	7 ± 8	3 ± 5
stromální makrofágy	2 ± 3	0 ± 1	7 ± 15	0 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	151 ± 142	59 ± 50	177 ± 92	48 ± 41

\*Vysoká hodnota v kategorii pCR u maximálních intraepiteliálních hodnot CD 68 pozitivních makrofágů je způsobena jedním případem s velmi vysokým počtem makrofágů.

Počet intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru* před chemoterapií ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle *Chevallierovy klasifikace*:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 1	6 ± 7	1 ± 2	3 ± 6	1 ± 5	1 ± 2	0 ± 0
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	1 ± 3	0 ± 0	4 ± 6	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	4 ± 4	0 ± 0	16 ± 13	0 ± 1	2 ± 4	0 ± 1	3 ± 4	0 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 3	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1	3 ± 13	0 ± 0

Počet intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle *Chevallierovy klasifikace*:

	Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	2 ± 5	0 ± 1	2 ± 3	0 ± 1
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	1 ± 3	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	3 ± 8	1 ± 3	6 ± 20	1 ± 2
CD 83 stromální dendritické buňky	9 ± 15	1 ± 2	15 ± 26	1 ± 3
S 100 stromální dendritické buňky	4 ± 8	1 ± 2	6 ± 10	1 ± 1

Počet intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *normální prsní žláze* po chemoterapii ve vztahu ke stupni regresivních změn po chemoterapii dle *Chevallierovy klasifikace*:

	Chevallier 1		Chevallier 2		Chevallier 3		Chevallier 4	
	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 4	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	1 ± 3	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	5 ± 6	1 ± 1	4 ± 5	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 1	4 ± 5	1 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	2 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 5	1 ± 1	1 ± 3	1 ± 2

Počet intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru* před chemoterapií dle *odpovědi na chemoterapii*:

	pCR		non pCR	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 1	2 ± 5	0 ± 2
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	1 ± 3	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	4 ± 4	0 ± 0	3 ± 6	0 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	2 ± 8	0 ± 0

## Histiocyty

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	1 ± 3	0 ± 0	2 ± 6	1 ± 3
CD 68 intraepiteliální makrofágy	10 ± 21	3 ± 10	10 ± 13	3 ± 6
stromální makrofágy	7 ± 14	0 ± 1	19 ± 49	1 ± 2
CD 68 stromální makrofágy	130 ± 99	49 ± 42	104 ± 83	30 ± 32

Srovnání počtu intraepiteliálních makrofágů v *in situ komponentě* tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	in situ	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální makrofágy	1 ± 1	10 ± 24
CD 68 intraepiteliální makrofágy	13 ± 24	18 ± 22

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru in situ komponentou nebo bez ní před chemoterapii*:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 3	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	5 ± 8	3 ± 5	10 ± 22	5 ± 11
stromální makrofágy	3 ± 4	0 ± 1	7 ± 15	0 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	114 ± 87	44 ± 43	133 ± 101	30 ± 42

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru in situ komponentou nebo bez ní po chemoterapii*:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	1 ± 1	0 ± 0	4 ± 8	1 ± 4
CD 68 intraepiteliální makrofágy	6 ± 8	2 ± 3	13 ± 15	4 ± 7
stromální makrofágy	47 ± 65	1 ± 2	32 ± 30	1 ± 2
CD 68 stromální makrofágy	103 ± 94	27 ± 25	104 ± 74	32 ± 36

Srovnání počtu intraepiteliálních makrofágů v *nekróze v invazivním tumoru* před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	nekróza v inv. tumoru	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální makrofágy	7 ± 12	15 ± 24
CD 68 intraepiteliální makrofágy	27 ± 42	32 ± 54

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru s nekrózami nebo bez nich před chemoterapii*:

	s nekrózou v inv. tumoru		bez nekróz v inv. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	3 ± 6	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	7 ± 6	2 ± 2	10 ± 23	5 ± 11
stromální makrofágy	22 ± 27	1 ± 2	3 ± 5	0 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	166 ± 96	45 ± 28	123 ± 99	30 ± 45

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru s nekrázami nebo bez nich po chemoterapii*:

	s nekrózou v inv. tumoru		bez nekróz v inv. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	3 ± 7	0 ± 0	2 ± 6	1 ± 3
CD 68 intraepiteliální makrofágy	15 ± 7	3 ± 3	9 ± 14	3 ± 6
stromální makrofágy	39 ± 16	2 ± 2	39 ± 52	1 ± 2
CD 68 stromální makrofágy	102 ± 49	33 ± 23	105 ± 88	30 ± 33

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu před chemoterapii*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	1 ± 3	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	7 ± 8	4 ± 5	9 ± 15	5 ± 10
stromální makrofágy	7 ± 13	0 ± 1	3 ± 6	0 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	134 ± 90	49 ± 40	93 ± 72	43 ± 41

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních makrofágů v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu po chemoterapii*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální makrofágy	2 ± 4	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 68 intraepiteliální makrofágy	8 ± 7	2 ± 2	5 ± 5	1 ± 2
stromální makrofágy	31 ± 27	1 ± 2	36 ± 41	0 ± 1
CD 68 stromální makrofágy	100 ± 73	28 ± 22	105 ± 110	27 ± 32

\*pro tyto tabulky byly vyřazeny tumory výrazně regrestivně zmokřelé, nediferencované karcinomy, tumory s rysy ductálními i lobulárními a ostatní vzácnější jednotky

## Dendritické buňky

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	2 ± 5	0 ± 2	2 ± 5	0 ± 1
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	4 ± 14	1 ± 3
CD 83 stromální dendritické buňky	3 ± 6	0 ± 1	11 ± 19	1 ± 2
S 100 stromální dendritické buňky	2 ± 7	0 ± 0	5 ± 9	1 ± 2

Srovnání počtu intraepiteliálních dendritických buněk v *in situ komponentě* tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	in situ	
	před NCHT	po NCHT
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	3 ± 6
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	1 ± 2
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	1 ± 2

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru in situ komponentou nebo bez ní před chemoterapii*:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 5	1 ± 2
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	3 ± 4	0 ± 0	4 ± 6	0 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 8	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru in situ komponentou nebo bez ní po chemoterapii*:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	2 ± 4	0 ± 1	2 ± 5	0 ± 1
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 3	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1
CD 1a stromální dendritické buňky	3 ± 9	1 ± 4	4 ± 17	0 ± 2
CD 83 stromální dendritické buňky	7 ± 7	1 ± 2	14 ± 25	1 ± 3
S 100 stromální dendritické buňky	3 ± 5	0 ± 2	6 ± 11	1 ± 2

Srovnání počtu intraepiteliálních dendritických buněk v *nekróze v invazivním tumoru* před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	nekróza v invaz. tumoru	
	před NCHT	po NCHT
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	6 ± 8
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru s nekrázami nebo bez nich před chemoterapii*:

	s nekrózou v invaz. tumoru		bez nekróz v invaz. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	2 ± 5	0 ± 1	2 ± 5	0 ± 2
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	3 ± 4	1 ± 1	4 ± 6	0 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	6 ± 16	0 ± 1	1 ± 2	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru s nekrázami nebo bez nich po chemoterapii*:

	s nekrózou v inv. tumoru		bez nekróz v inv. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	5 ± 9	1 ± 1	2 ± 4	0 ± 1
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	2 ± 4	1 ± 1	1 ± 2	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	5 ± 9	0 ± 0	4 ± 14	1 ± 3
CD 83 stromální dendritické buňky	24 ± 28	1 ± 2	10 ± 18	1 ± 2
S 100 stromální dendritické buňky	6 ± 6	0 ± 0	5 ± 9	1 ± 2

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu před chemoterapii*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	3 ± 6	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 0
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	1 ± 2	0 ± 0	2 ± 4	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	4 ± 6	0 ± 1	3 ± 3	0 ± 1
S 100 stromální dendritické buňky	2 ± 8	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních dendritických buněk v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu po chemoterapii*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
CD 1a intraepiteliální dendritické buňky	2 ± 5	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
CD 83 intraepiteliální dendritické buňky	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
S 100 intraepiteliální dendritické buňky	1 ± 3	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
CD 1a stromální dendritické buňky	6 ± 17	1 ± 3	2 ± 1	0 ± 0
CD 83 stromální dendritické buňky	13 ± 22	1 ± 3	1 ± 1	0 ± 0
S 100 stromální dendritické buňky	5 ± 9	1 ± 2	2 ± 3	0 ± 0

\*pro tyto tabulky byly vyřazeny tumory výrazně regrestivně zmokřelé, nediferencované karcinomy, tumory s rysy ductálními i lobulárními a ostatní vzácnější jednotky

### Lymfocyty

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	5 ± 5	3 ± 3	7 ± 10	3 ± 4
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	7 ± 8	3 ± 4	10 ± 16	3 ± 6
stromální lymfocyty	344 ± 398	60 ± 98	640 ± 613	56 ± 134
CD 3 stromální lymfocyty	220 ± 176	45 ± 49	359 ± 370	41 ± 90

Srovnání počtu intraepiteliálních lymfocytů v *in situ komponentě* tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	in situ	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální lymfocyty	3 ± 4	13 ± 24
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	5 ± 8	8 ± 7

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru s in situ komponentou nebo bez ní* před chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	3 ± 3	2 ± 2	5 ± 5	3 ± 3
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	3 ± 3	2 ± 2	7 ± 9	3 ± 3
stromální lymfocyty	269 ± 215	43 ± 34	356 ± 430	63 ± 83
CD 3 stromální lymfocyty	158 ± 167	50 ± 50	230 ± 177	44 ± 49

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru s in situ komponentou nebo bez ní* po chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	5 ± 6	2 ± 3	9 ± 12	4 ± 5
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	8 ± 16	1 ± 2	11 ± 16	3 ± 8
stromální lymfocyty	549 ± 541	33 ± 23	715 ± 664	74 ± 179
CD 3 stromální lymfocyty	296 ± 302	30 ± 32	409 ± 413	49 ± 117

Srovnání počtu intraepiteliálních lymfocytů v *nekroze* v *invazivním tumoru* před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	nekroza v invaz. tumoru	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální lymfocyty	11 ± 26	18 ± 26
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	1 ± 1	1 ± 1

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru s nekrotizací nebo bez ní* před chemoterapii:

	s nekrotizací v invaz. tumoru		bez nekrotiz. v invaz. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	5 ± 3	3 ± 2	5 ± 6	3 ± 3
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	6 ± 4	2 ± 2	7 ± 9	3 ± 5
stromální lymfocyty	433 ± 541	99 ± 146	325 ± 366	52 ± 52
CD 3 stromální lymfocyty	228 ± 189	46 ± 50	218 ± 176	45 ± 50

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru s nekrotizací nebo bez ní* po chemoterapii:

	s nekrotizací v inv. tumoru		bez nekrotiz. v inv. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	14 ± 19	2 ± 1	7 ± 8	3 ± 5
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	9 ± 10	1 ± 1	10 ± 17	3 ± 6
stromální lymfocyty	670 ± 639	38 ± 47	655 ± 621	59 ± 144
CD 3 stromální lymfocyty	378 ± 382	26 ± 29	371 ± 377	42 ± 97

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu* před chemoterapii\*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	5 ± 5	3 ± 3	2 ± 2	1 ± 0
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	7 ± 7	3 ± 4	4 ± 7	2 ± 3
stromální lymfocyty	350 ± 385	57 ± 67	342 ± 238	41 ± 33
CD 3 stromální lymfocyty	234 ± 183	44 ± 49	160 ± 151	36 ± 30

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních lymfocytů v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu* po chemoterapii\*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální lymfocyty	7 ± 11	3 ± 4	6 ± 9	1 ± 1
CD 3 intraepiteliální lymfocyty	8 ± 14	2 ± 3	8 ± 9	1 ± 1
stromální lymfocyty	661 ± 643	66 ± 165	535 ± 426	17 ± 11
CD 3 stromální lymfocyty	344 ± 366	43 ± 104	308 ± 212	16 ± 16

\*pro tyto tabulky byly vyloučeny tumory výrazně regresivně změněné, nediferencované karcinomy, tumory s rysy ductálního i lobulárního a ostatní vzácnější jednotky

### NK buňky

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru* před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	0 ± 2	0 ± 0	2 ± 6	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních NK buněk v *in situ komponentě* tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	in situ	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru s in situ komponentou nebo bez ní* před chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru s in situ komponentou nebo bez ní* po chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	2 ± 4	0 ± 0	2 ± 7	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních NK buněk v *nekroze* v *invazivním tumoru* před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	nekroza v invaz. tumoru	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru s nekrotizací nebo bez ní* před chemoterapii:

	s nekrotizací v invaz. tumoru		bez nekrotiz. v invaz. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru s nekrotizací nebo bez ní* po chemoterapii:

	s nekrotizací v inv. tumoru		bez nekrotiz. v inv. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	1 ± 2	0 ± 0	2 ± 7	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu* před chemoterapii\*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	0 ± 2	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních NK buněk v *invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu* po chemoterapii\*:

	ductální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální NK buňky	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální NK buňky	2 ± 7	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0

\*pro tyto tabulky byly vyloučeny tumory výrazně regresivně změněné, nediferencované karcinomy, tumory s rysy ductálního i lobulárního a ostatní vzácnější jednotky

**Neutrofilní a eozinofilní granulocyty**

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v *invazivním* tumoru před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilny	3 ± 14	1 ± 6	2 ± 7	1 ± 4
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilny	5 ± 17	0 ± 0	28 ± 80	4 ± 7
stromální eozinofily	0 ± 1	0 ± 0	2 ± 7	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních granulocytů v *in situ* komponentě tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	in situ	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální neutrofilny	0 ± 0	1 ± 2
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v *invazivním* tumoru s *in situ* komponentou nebo bez ní před chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilny	0 ± 0	0 ± 0	3 ± 15	1 ± 5
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilny	4 ± 3	1 ± 1	12 ± 25	5 ± 18
stromální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v *invazivním* tumoru s *in situ* komponentou nebo bez ní po chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilny	2 ± 9	1 ± 0	2 ± 4	1 ± 1
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilny	45 ± 117	5 ± 9	14 ± 19	3 ± 4
stromální eozinofily	1 ± 2	0 ± 0	3 ± 9	0 ± 0

**Žírné buňky**

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v *invazivním* tumoru před a po chemoterapii:

	před NCHT		po NCHT	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 2	0 ± 0
stromální mastocyty	5 ± 6	1 ± 1	10 ± 10	3 ± 4

Srovnání počtu intraepiteliálních mastocytů v *in situ* komponentě tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	in situ	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v *invazivním* tumoru s *in situ* komponentou nebo bez ní před chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	5 ± 4	1 ± 1	5 ± 6	1 ± 1

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v *invazivním* tumoru s *in situ* komponentou nebo bez ní po chemoterapii:

	s in situ komponentou		bez in situ komponenty	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0
stromální mastocyty	13 ± 12	4 ± 4	9 ± 7	2 ± 3

Srovnání počtu intraepiteliálních granulocytů v *nekróze* v *invazivním* tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	nekróza v invaz. tumoru	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální neutrofilny	94 ± 300	2 ± 1
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v *invazivním* tumoru s *nekrózami* nebo bez nich před chemoterapii:

	s nekrózou v invaz. tumoru		bez nekróz v invaz. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilny	13 ± 31	5 ± 13	0 ± 1	0 ± 0
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilny	21 ± 46	14 ± 39	9 ± 14	3 ± 3
stromální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v *invazivním* tumoru s *nekrózami* nebo bez nich po chemoterapii:

	s nekrózou v inv. tumoru		bez nekróz v inv. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilny	1 ± 2	0 ± 0	2 ± 7	1 ± 4
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilny	8 ± 4	2 ± 1	28 ± 84	4 ± 7
stromální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v *invazivním* tumoru v *duktálním* a *lobulárním* karcinomu před chemoterapii\*:

	duktální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilny	2 ± 14	1 ± 6	0 ± 1	0 ± 0
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilny	10 ± 17	3 ± 5	6 ± 4	2 ± 2
stromální eozinofily	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních granulocytů v *invazivním* tumoru v *duktálním* a *lobulárním* karcinomu po chemoterapii\*:

	duktální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální neutrofilny	1 ± 2	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 1
intraepiteliální eozinofily	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální neutrofilny	20 ± 40	3 ± 3	18 ± 33	2 ± 2
stromální eozinofily	2 ± 8	0 ± 0	2 ± 5	0 ± 1

\*pro tyto tabulky byly vybrány tumory výrazně regresivně změkčivé, nediferencované karcinomy, tumory s rysy duktálními i lobulárními a ostatní vzácnější jednotky

Srovnání počtu intraepiteliálních mastocytů v *nekróze* v *invazivním* tumoru před a po chemoterapii (zde pouze maximální hodnoty):

	nekróza v invaz. tumoru	
	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v *invazivním* tumoru s *nekrózami* nebo bez nich před chemoterapii:

	s nekrózou v invaz. tumoru		bez nekróz v invaz. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	2 ± 2	1 ± 1	5 ± 6	1 ± 1

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v *invazivním* tumoru s *nekrózami* nebo bez nich po chemoterapii:

	s nekrózou v inv. tumoru		bez nekróz v inv. tumoru	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 2	0 ± 0
stromální mastocyty	9 ± 6	1 ± 1	11 ± 11	3 ± 4

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v *invazivním* tumoru v *duktálním* a *lobulárním* karcinomu před chemoterapii\*:

	duktální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0
stromální mastocyty	5 ± 7	1 ± 1	5 ± 4	2 ± 2

Srovnání počtu intraepiteliálních a stromálních mastocytů v *invazivním* tumoru v *duktálním* a *lobulárním* karcinomu po chemoterapii\*:

	duktální karcinom		lobulární karcinom	
	max.	prům.	max.	prům.
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 3	0 ± 0
stromální mastocyty	11 ± 11	3 ± 3	8 ± 4	3 ± 2

\*pro tyto tabulky byly vybrány tumory výrazně regresivně změkčivé, nediferencované karcinomy, tumory s rysy duktálními i lobulárními a ostatní vzácnější jednotky

**Diferenciální rozpočet**

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v **invazivním tumoru před a po chemoterapii:**

	před NCHT	po NCHT
intraepiteliální makrofágy	3 ± 10	7 ± 15
intraepiteliální lymfocyty	91 ± 20	86 ± 21
intraepiteliální neutrofil	5 ± 17	5 ± 12
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	1 ± 7	2 ± 9
stromální makrofágy	1 ± 4	3 ± 6
stromální lymfocyty	90 ± 9	80 ± 12
stromální neutrofil	6 ± 7	8 ± 9
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 1
stromální mastocyty	3 ± 4	9 ± 8

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v **invazivním tumoru s in situ komponentou nebo bez ní před chemoterapii:**

	s in situ komponentou	bez in situ komponenty
intraepiteliální makrofágy	0 ± 0	4 ± 10
intraepiteliální lymfocyty	94 ± 18	90 ± 20
intraepiteliální neutrofil	0 ± 0	6 ± 18
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	6 ± 18	1 ± 4
stromální makrofágy	1 ± 1	2 ± 4
stromální lymfocyty	93 ± 5	89 ± 9
stromální neutrofil	3 ± 3	6 ± 7
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	3 ± 3	3 ± 5

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v **invazivním tumoru s in situ komponentou nebo bez ní po chemoterapii:**

	s in situ komponentou	bez in situ komponenty
intraepiteliální makrofágy	5 ± 13	8 ± 16
intraepiteliální lymfocyty	91 ± 20	83 ± 21
intraepiteliální neutrofil	4 ± 15	5 ± 10
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	3 ± 11
stromální makrofágy	3 ± 4	2 ± 7
stromální lymfocyty	79 ± 9	89 ± 15
stromální neutrofil	8 ± 7	9 ± 11
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 1
stromální mastocyty	10 ± 7	8 ± 9

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v **invazivním tumoru s nekrotizací nebo bez ní před chemoterapii:**

	s nekrotizací v invaz. tumoru	bez nekrotiz. v invaz. tumoru
intraepiteliální makrofágy	8 ± 15	2 ± 8
intraepiteliální lymfocyty	76 ± 34	94 ± 12
intraepiteliální neutrofil	16 ± 34	2 ± 6
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	2 ± 8
stromální makrofágy	2 ± 3	1 ± 4
stromální lymfocyty	98 ± 12	90 ± 8
stromální neutrofil	7 ± 11	5 ± 8
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	3 ± 6	3 ± 4

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v **invazivním tumoru s nekrotizací nebo bez ní po chemoterapii:**

	s nekrotizací v inv. tumoru	bez nekrotiz. v inv. tumoru
intraepiteliální makrofágy	4 ± 10	6 ± 14
intraepiteliální lymfocyty	94 ± 10	86 ± 21
intraepiteliální neutrofil	2 ± 4	3 ± 13
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	3 ± 10
stromální makrofágy	9 ± 14	2 ± 4
stromální lymfocyty	77 ± 18	81 ± 11
stromální neutrofil	11 ± 15	8 ± 8
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 1
stromální mastocyty	3 ± 2	9 ± 8

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v **invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu před chemoterapií:**

	ductální karcinom	lobulární karcinom
intraepiteliální makrofágy	4 ± 11	2 ± 6
intraepiteliální lymfocyty	91 ± 19	92 ± 13
intraepiteliální neutrofil	4 ± 15	3 ± 5
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	1 ± 7	3 ± 10
stromální makrofágy	1 ± 2	3 ± 8
stromální lymfocyty	90 ± 9	89 ± 10
stromální neutrofil	6 ± 7	4 ± 3
stromální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
stromální mastocyty	3 ± 4	4 ± 6

Srovnání procentuálního zastoupení zánětlivých elementů intraepiteliálně a ve stromatu v **invazivním tumoru v ductálním a lobulárním karcinomu po chemoterapii:**

	ductální karcinom	lobulární karcinom
intraepiteliální makrofágy	6 ± 15	4 ± 11
intraepiteliální lymfocyty	92 ± 16	85 ± 18
intraepiteliální neutrofil	2 ± 6	7 ± 13
intraepiteliální eozinofil	0 ± 0	0 ± 0
intraepiteliální mastocyty	0 ± 0	4 ± 11
stromální makrofágy	3 ± 7	1 ± 2
stromální lymfocyty	81 ± 13	79 ± 9
stromální neutrofil	8 ± 9	7 ± 8
stromální eozinofil	0 ± 0	1 ± 3
stromální mastocyty	7 ± 7	12 ± 7

\*pro tyto tabulky byly vyřazeny tumorové vzorky s metastázami, necrotizovanými karcinomy, sanceri a ryty ductálního i lobulárního karcinomu