

Abstrakt:

Karcinom pankreatu (KP) je velmi závažné onemocnění s pětiletým přežitím menším než 5 %. V současné době neexistuje žádný spolehlivý nástroj pro diagnózu KP v jeho časných stádiích. Pacienti v době diagnózy tak bývají často v pokročilém stádiu onemocnění a léčba nemívá výrazný účinek. Z těchto důvodů se klade stále větší důraz na nalezení vhodných molekulárních znaků, a to zejména pro zlepšení diagnózy a odhad prognózy. Jedním z takových nadějných znaků jsou miRNA. Jejich analýza v tkáni pankreatu je ale složitý proces. Hlavním důvodem je velmi malé množství vzorku získaného tenkojehlovou biopsií a dále pak samotný charakter pankreatické tkáně, ze které bývá úspěšnost molekulárně-genetických vyšetření výrazně nižší v porovnání s ostatními tkáněmi. Dalším negativním faktorem je značná heterogenita tkáně, díky které se zastoupení nádorových buněk v různých částech vzorku často liší. A tak vhodná volba postupu izolace nukleových kyselin (NK) a následných analýz včetně kvantifikace nádorových buněk ve vzorku je pro správné stanovení hladin miRNA zcela klíčová.

Tato práce je zaměřená na optimalizaci celého postupu stanovení hladin miRNA z bioptických vzorků pankreatické tkáně zahrnující izolaci NK, kvantifikaci nádorových buněk pomocí stanovení mutací v genu KRAS, syntézu cDNA a analýzu hladin vybraných miRNA metodou qPCR. Dílčí kroky byly hodnoceny na základě množství získaných NK a výtěžku a kvality PCR produktů amplifikovaných z DNA a cDNA templátů. Funkčnost celého postupu pak byla ověřena analýzou genu KRAS, dvou miRNA (miR-21 a miR-10b) a referenčního genu RNU6b na souboru 110 bioptických vzorků s úspěšností 100 % (KRAS a miR-21), 99 % (RNU6b) a 93 % (miR-10b). Podařilo se tedy vyvinout a ověřit účinný postup pro rutinní kvantifikaci miRNA z bioptických vzorků tkáně pankreatu.

Klíčová slova:

Karcinom pankreatu, EUS-FNB, biopsie tenkou jehlou, miRNA, optimalizace, chronická pankreatitida, izolace RNA, izolace DNA, qRT-PCR, heteroduplexní analýza, KRAS, diagnostika, prognóza.