

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Bc. Barbora Belšánová

Optimalizace metodiky pro stanovení volné nádorové DNA v plazmě a její
klinické využití u pacientů s karcinomy kolorekta, plic a slinivky břišní

Optimization of proces for detection of free tumor DNA in plasma and its clinical utility for
colorectal cancer, lung cancer and pancreatic cancer patients

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Lucie Benešová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.08.2017

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala mé školitelce RNDr. Lucii Benešové, Ph.D. velice si cením času a podpory, kterou mi věnovala při vypracování nejen této práce, ale i při celém studiu. Zároveň jí děkuji jako své přítelkyni za rady a to nejen v pracovním životě, ale i osobním. Dále děkuji RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D, řediteli výzkumného ústavu Genomac a to jak za podporu technickou tak i duševní. Celé své rodině, přátelům a spolupracovníkům za pochopení, kterého se mi z jejich strany dostalo. V neposlední řadě děkuji všem klinickým pracovníkům z Interní a Chirurgické kliniky Ústřední vojenské nemocnice v Praze, Thomayerovy nemocnice v Praze a Fakultní nemocnice Plzeň za ochotnou spolupráci a poskytnutí cenných vzorků.

Abstrakt:

Vyšetření cirkulující nádorové DNA (ctDNA) v periferní krvi onkologických pacientů nachází v dnešní době stále širší uplatnění, a to napříč různými nádorovými onemocněními. Jedná se o krátké fragmenty DNA pocházející z nádorové tkáně, které se volně vyskytují v periferní krvi těchto pacientů (převážně v pokročilých stádiích). Díky minimální invazivitě, téměř 100 % specificitě a poměrně vysoké sensitivitě u pacientů ve IV. stádiu onemocnění má toto vyšetření potencionální klinický význam zejména v časném záchytu návratu či progresi onemocnění po resekci tumoru (tzv. pooperační follow-up), predikci a sledování odpovědi na léčbu a odhadu prognózy onemocnění. Vzhledem však k velmi limitním hladinám ctDNA na pozadí vysoké koncentrace ostatních nenádorových fragmentů v plazmě pacientů je pro správnou diagnostiku tohoto markeru zcela klíčová použitá metodika vykazující co nejvyšší záchyt. Ta je zpravidla založena na nalezení mutace v tumorové tkáni a jejím následném průkazu v plazmě.

Tato práce je zaměřena na optimalizaci izolace ctDNA a metodiky její detekce na principu PCR s následnou analýzou heteroduplexů pomocí denaturační kapilární elektroforézy (DCE) s cílem dosáhnout co nejvyšší záchyt mutované frakce ve vzorku plazmy. Optimalizovanou metodou jsem vyšetřila přítomnost ctDNA u tří typů nádorových onemocnění, kterými byly kolorektální karcinom (122 vzorků plazmy), nemalobuněčný karcinom plic (30 vzorků plazmy) a adenokarcinom slinivky břišní (45 vzorků plazmy). Na základě získaných výsledků jsem u pacientů s kolorektálním karcinomem sledovala vztah mezi hladinami ctDNA a radikalitou resekce, návratem nebo progresí onemocnění a dále jsem pozitivitu ctDNA porovnávala s výsledky zobrazovacích metod a tumorových markerů. U pacientů s adenokarcinomem pankreatu jsem zjišťovala význam přítomnosti ctDNA ve vztahu k prognóze onemocnění a u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic jsem ověřovala možnost detekce mutací v genu EGFR v plazmě pro účely indikace cílené biologické léčby.

Klíčová slova:

cirkulující nádorová DNA (ctDNA), nádorové onemocnění, mutace, izolace DNA, PCR, denaturační kapilární elektroforéza (DCE), heteroduplexy, kolorektální karcinom, nemalobuněčný karcinom plic, adenokarcinom slinivky břišní, radikalita resekce, zobrazovací metody, tumorové markery, prognóza onemocnění, protoonkogen, tumor supresorový gen, KRAS, TP53, cílená biologická léčba

Abstract:

In current days, examination of circulating tumor DNA (ctDNA) finds new use across different cancers. It is directed at tumor-derived short fragments of DNA present in peripheral blood of patients (mainly in advanced stages). Due to its minimal invasivity, almost 100 % specificity and relatively high sensitivity in stage IV patients, this approach found its main potential clinical utility especially in early detection of disease relapse or progression after tumor resection (i.e. post-operative follow-up), prediction and monitoring of therapy response and estimation of prognosis. As a result of minute levels of ctDNA on a high background of other non-tumor DNA fragments present in plasma, a suitable method exhibiting highest sensitivity is the key for proper detection of this marker. The approach is predominantly based on initial identification of a mutation in tumor tissue and its subsequent detection in plasma.

The present work is aimed at optimization of ctDNA isolation and method of its detection based on PCR amplification followed by heteroduplex analysis by denaturing capillary electrophoresis (DCE) to achieve highest sensitivity for detection of mutated fraction in plasma sample. I have applied the optimized protocol to examine ctDNA in three types of cancers, namely colorectal cancer (122 plasma samples), non-small cell lung cancer (30 plasma samples) and pancreatic adenocarcinoma (45 plasma samples). Based on obtained results in colorectal cancer patients, I have evaluated a relation between ctDNA levels and surgical radicality, disease relaps or progression and I have also correlated with data from imaging techniques and tumor markers. In adenocarcinoma patients I have detected presence of ctDNA in relation to the disease prognosis and in non-small cell cancer I have tested use of ctDNA for plasma testing of mutations in *EGFR* for decision on targeted biological therapy.

Keywords:

Circulating tumor DNA (ctDNA), cancer, mutation, DNA isolation, PCR, denaturing capillary electrophoresis (DCE), heteroduplex, colorectal carcinoma, non-small cell lung carcinoma, pancreatic adenocarcinoma, radicality of surgical resection, imaging methods, tumor markers, disease prognosis, protooncogene, tumor suppressor gene, *KRAS*, *TP53*, targeted biological therapy

Obsah:

1	Úvod	8
2	Přehled a literatura	10
2.1	Charakteristika a vlastnosti ctDNA.....	10
2.1.1	Vlastnosti ctDNA	10
2.1.2	Původ ctDNA	12
2.2	Detekce ctDNA	15
2.2.1	Zpracování odebrané krve	15
2.2.2	Izolace ctDNA	16
2.2.3	Metody analýzy ctDNA.....	17
2.3	Využití ctDNA v klinické praxi.....	24
2.3.1	Molekulární podstata karcinogeneze.....	24
2.3.2	Diagnostika onkologických onemocnění.....	26
2.3.3	ctDNA jako nový biochemický marker	29
2.3.4	Vybraná nádorová onemocnění a využití ctDNA	33
3	Cíle práce.....	40
4	Materiál a metodika.....	41
4.1	Pacienti a vzorky.....	41
4.1.1	Pacienti.....	41
4.1.2	Vzorky.....	41
4.2	Izolace DNA	43
4.2.1	Izolace DNA ze vzorků nádoru.....	43
4.2.2	Optimalizace izolace cfDNA	44
4.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	47
4.3.1	PCR z nádorové DNA	48
4.3.2	Optimalizace amplifikačních podmínek pro cfDNA.....	50
4.3.3	PCR za použití cfDNA jako templátu	50
4.4	Tvorba heteroduplexů s následnou separací pomocí denaturační kapilární elektroforézy.....	51
4.4.1	DCE analýza PCR produktů z nádorové DNA.....	52
4.4.2	Optimalizace DCE analýzy PCR produktů z cfDNA	53
4.5	Vyhodnocení výsledků	53
4.5.1	Vyhodnocení elektroferogramů	53
4.5.2	Stanovení citlivosti záchytu mutantní alely.....	54
4.5.3	Stanovení procentuálního zastoupení mutantní frakce (PMF)	54

4.5.4	Zhodnocení radikality resekce	55
4.5.5	Zhodnocení přežití.....	55
5	Výsledky	56
5.1	Optimalizace metodiky	56
5.1.1	Optimalizace izolace ctDNA	56
5.1.2	Optimalizace amplifikačních podmínek	57
5.1.3	Optimalizace podmínek DCE	59
5.1.4	Test citlivosti záchytu mutantní alely.....	61
5.2	Analýza ctDNA ve vzorcích pacientů	62
5.2.1	Analýza ctDNA u kolorektálního karcinomu	62
5.2.2	Analýza ctDNA u karcinomu pankreatu	65
5.2.3	Analýza ctDNA u nemalobuněčného karcinomu plic	65
6	Diskuze	66
7	Souhrn	70
8	Literatura.....	71

Seznam zkratk:

APC	adematosis polyposisi coli
BEAMing -	<i>beads emulsion amplification and magnetic</i>
BRAF	B-Raf proto-oncogene
cfDNA	cirkulující volná DNA <i>circulating free DNA</i>
CT	výpočetní tomografie <i>Computed Tomography</i>
CTCs	volně cirkulující nádorové buňky <i>circulating tumor cells</i>
ctDNA	cirkulující nádorová DNA <i>circulating tumor DNA</i>
DCE	denaturační kapilární elektroforéza <i>denaturant capillary electrophoresis</i>
dPCR	digitální PCR <i>digital PCR</i>
EGFR	epidermal growth factor receptor
KK	kolorektální karcinom
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
mCRC	metastatický kolorektální karcinom <i>mestastatic colorectal cancer</i>
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MR	magnetická rezonance
NGS	sekvenování nové generace <i>nex-generation sequencing</i>
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic <i>non-small cell lung cancer</i>
p53	protein p53
PDAC	duktální adenokarcinom pankreatu <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PET	pozitronová emisní tomografie <i>Positron-emission tomography</i>
PMF	procentuálního zastoupení mutantní frakce
qPCR	kvantitativní PCR <i>quantitative PCR</i>
TM	tumorové markery
TP53	tumor protein p53
UZ	ultrazvuk
ZM	zobrazovací metody

1 Úvod

Nádorová onemocnění spolu s chorobami srdce a cév patří mezi nejrozšířenější civilizační onemocnění u nás i ve světě. V České republice na nádorová onemocnění zemře přibližně 27000 obyvatel ročně a to činí 23 % z celkové mortality (www.svod.cz).

Česká republika je jedním z nejvíce onkologicky zatížených států, a to jak v evropském, tak bohužel i v celosvětovém měřítku. Nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u žen i u mužů (vyjma onemocnění týkajících se pohlavních orgánů) je kolorektální karcinom, druhým je karcinom plic, třetím zhoubné novotvary močového ústrojí, které jsou následovány melanomem a pátým nečastějším nádorem je karcinom slinivky břišní (Obr. 1) (www.uzis.cz).

Struktura nejčastěji hlášených zhoubných novotvarů (ZN) u mužů v roce 2014



Struktura nejčastěji hlášených zhoubných novotvarů (ZN) u žen v roce 2014



Obr. 1

Rapidní nárůst incidence novotvarů se v roce 2010 zastavil a z posledních záznamů dostupných z roku 2014 se zdá, že jsou hodnoty stabilizovány (DUSEK a kol. 2014). Dle uvedených analýz je patrné, že i vývoj úmrtnosti v posledních letech stagnuje. Tyto jevy mohou být výsledkem zvyšující se osvěty zaměřené na zdravější životní styl, kvalitu konzumovaného jídla, snížení počtu kuřáků na straně jedné a stále se zlepšujícími screeningovými, diagnostickými a léčebnými metodami na straně druhé (www.uzis.cz).

Zásadním faktorem rozhodujícím o prognóze nádorového onemocnění je jeho záchyt v časných stádiích, kdy jde o lokalizované nádorové léze bez šíření do blízkého či vzdáleného okolí s možností úplného chirurgického odstranění. Vzhledem však k častému bezpříznakovému chování onemocnění v těchto fázích je takto diagnostikována naprostá menšina pacientů a to zpravidla v rámci screeningových programů, nebo jako náhodný nález. U pokročilých stádií je pak vedle samotné agresivity konkrétního nádoru rozhodující vhodně zvolená léčba (operace, radioterapie, chemoterapie, cílení biologická léčba, imunoterapie)

(VYZULA a kol. 2017). Vedle toho je však neméně důležité důsledné sledování pacienta i v období po skončení léčby tak, aby případný následný návrat (rekurence) onemocnění byl též zachycen v jeho časném nástupu s možností další léčby (SCHMOLL a kol. 2014). V současnosti bývá takové sledování založeno na měření hladin tumorových markerů (TM) a provádění zobrazovacích vyšetření v intervalech 6 – 12 měsíců podle typu nádoru, stádia, zvolené léčby apod. Současné zobrazovací metody využívané v takovém sledování zahrnují především ultrasonografii (UZ), počítačovou tomografii (CT), magnetickou rezonanci (MR) a v menší míře pozitronovou emisní tomografii (PET) (ABDALLA a kol. 2004). Tato vyšetření jsou však relativně nákladná, mohou pacienty zatěžovat negativními vedlejšími účinky (radiační zátěž u CT, reakce na kontrastní látky u CT a PET apod.) a jejich rozlišovací schopnost, pokud jde o velikost detekovatelných ložisek, je stále na úrovni desítek (UZ) až jednotek (CT, MR, PET) milimetrů (NIEDERAUA a GRENDELL 1995). Výrazně méně nákladná sledování na základě tumorových markerů nemají dostatečnou citlivost ani specifitu (RACEK a kol. 1999).

Jedním z nadějných prostředků pro záchyt případné rekurence onemocnění, monitorování průběhu léčby, případně stanovení prognózy onemocnění je minimálně invazivní vyšetření založené na detekci cirkulující nádorové DNA (ctDNA – circulating tumor DNA). Tato metoda umožňuje sledovat hladiny nádorové DNA volně se vyskytující v periferní krvi, která pochází z primární léze i případných metastáz bez nutnosti invazivního odběru z nádorové tkáně, a proto se pro ni v nedávné době vžilo univerzální označení „tekutá biopsie“ (DIAZ a kol. 2012.).

Vyšetřování hladin ctDNA prošlo v posledních letech značným rozvojem a jeho potenciál uplatnění je veliký. I z tohoto důvodu jsem si jej zvolila jako téma pro svou diplomovou práci, kterou jsem vypracovala v laboratořích výzkumného ústavu Genomac v Praze. Metodice jsem se věnovala již ve své bakalářské práci, která měla formu rešerše a byla následně podkladem pro přehledovou práci v impaktovaném časopise (BENESOVA a kol. 2013). Primárním cílem mé diplomové práce byla optimalizace metodiky pro vyšetřování ctDNA u tří nejčastějších typů nádorových onemocnění a její dovedení do stádia rutinního testování. Dalším cílem bylo ověřit možnosti využití sledování hladin ctDNA u onkologických pacientů v klinické praxi.

2 Přehled a literatura

2.1 Charakteristika a vlastnosti ctDNA

Výzkum v oblasti molekulární onkologie se stále více zaměřuje na nalezení takového biologického markeru, který by byl nápomocen při diagnostice, stanovení prognózy, sledování průběhu a úspěšnosti léčby nádorového onemocnění a včas detekoval jeho návrat či vzniklou rezistenci na podávanou léčbu (DAWSON a kol. 2013, VOLIK a kol. 2016). Momentálně dostupné metody (viz 2.3.2) jsou pro pacienty díky své invazivitě či náročnosti nepříjemné, nebo jsou finančně a personálně nákladné. V posledních letech se vkládají velké naděje do volně cirkulujících elementů vyskytujících se v krevním řečišti onkologicky nemocného pacienta zahrnující cirkulující nádorové buňky (CTCs) nebo cirkulující nádorové nukleové kyseliny typu DNA, RNA a miRNA (BROCK a kol. 2015). V této práci se z uvedeného zaměřuji na nejvíce studovanou - cirkulující nádorovou DNA (ctDNA).

2.1.1 Vlastnosti ctDNA

CtDNA jsou fragmenty dsDNA vyskytující se v krvi pacientů s nádorovým onemocněním. Přítomnost volně cirkulující DNA (nejedná se o ctDNA) označované jako cfDNA (cell free DNA) v plazmě a séru lidí a její klinický význam byl popsán již ve čtyřicátých letech dvacátého století Mandelem a Metaisem (MANDEL a ME'TAIS 1948). Následné výzkumy opírající se o nové metody zjistily vyšší koncentraci cfDNA v séru pacientů s diagnostikovaným karcinomem než u zdravých jedinců. Zajímavostí bylo zjištění, že po aplikaci chemoterapie byl detekován pokles její hladiny (LEON a kol. 1977). Další publikace potvrdily původ cfDNA z karcinomů a její přítomnost u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním (SHAPIRO a kol. 1983, STROUN a ANKER 1989). Díky technologickému pokroku se v devadesátých letech minulého století podařilo detekovat přítomnost genetických alterací v cfDNA. V té době byly provedeny dvě na sobě nezávislé studie, v nichž se potvrdila přítomnost mutovaných fragmentů *RAS* genů (SORENSEN a kol. 1994, VASIOUKHIN a kol. 1994), následovaly další, v nichž se zjistila v cfDNA přítomnost dalších alterací jako mikrosatelitové nestability, ztráty heterozygosity, genové amplifikace, metylace a mutace nacházející se v onkogenech a tumor supresorech a tyto molekulárně biologické změny odpovídaly změnám nalezeným v nádorové tkáni (Tab. 1) (CHEN a kol. 1996, SILVA a kol. 1999a, SILVA a kol. 1999b).

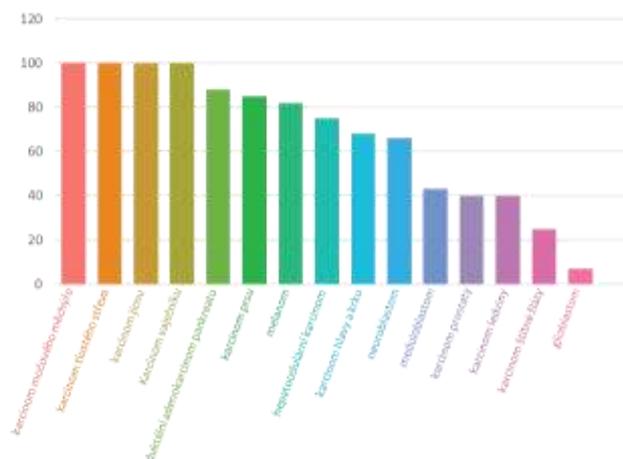
Tab. 1

Detekce volné cirkulující DNA (cfDNA) a jejích alterací u pacientů s různými typy nádorových onemocnění (převzato SCHWARZENBACH a kol. 2011)

Cancer	cfDNA	Diagnostic	Prognostic
Bladder	DNA integrity	✓	✓
	Methylation	✓	
	Microsatellite alterations	✓	
Breast	Methylation	✓	✓
	Microsatellite alterations	✓	✓
	DNA integrity		✓
	Mutation		✓
	Mitochondrial	✓	
Cervical	Methylation	✓	✓
	Viral DNA	✓	
Colorectal	Mutation	✓	✓
	DNA integrity	✓	
	Methylation	✓	✓
Hepatocellular carcinoma	Methylation	✓	✓
	Microsatellite alterations		✓
	Mutation	✓	✓
	DNA integrity	✓	✓
	Viral DNA	✓	
Lung	Mutation		✓
	Methylation	✓	✓
	Microsatellite alterations	✓	✓
Non-Hodgkin's lymphoma	Mutation		✓
	Viral DNA	✓	✓
	Methylation	✓	
	DNA integrity	✓	
Melanoma	Mutation	✓	✓
	Methylation		✓
	Microsatellite alterations	✓	✓
Ovarian	Methylation	✓	✓
	DNA integrity	✓	
	Mutation		✓
	Mitochondrial	✓	
Pancreatic	Methylation	✓	
	DNA integrity	✓	
	Mutation	✓	✓
Prostate	Methylation	✓	✓
	Microsatellite alterations	✓	
	DNA integrity	✓	✓
	Mitochondrial		✓

Z tohoto důvodu se pro vyšetřování ctDNA ujal také výraz „tekutá biopsie,“ (anglický výraz Liquid biopsy) (Diaz, L.A. a kol. 2012). Hlavní výhodou tekuté biopsie ve srovnání s „klasickou“ biopsií nádorové tkáně je minimální invazivita ve formě klasického odběru krve. Navíc ctDNA je do krevního řečiště uvolňována ze všech nádorových ložisek přítomných v těle pacienta, a tak jediný vzorek krve obsahuje kompletní mutační spektrum všech nádorových aberací, které se u daného pacienta vyskytují (Gerlinger a kol. 2012). Nespornou výhodou ctDNA jako molekulárního markeru je také její univerzálnost, tedy že lze detekovat prakticky u všech typů nádorových onemocnění. Dle uvedeného Obr. 2 je vidět, že nejčastěji je ctDNA detekována u karcinomu močového měchýře, kolorektálního karcinomu, jícnu a

vaječníků oproti tomu u mozkových nádorů je ctDNA detekována nejméně, pravděpodobně v důsledku hematoencefalické bariéry (Bettegowda a kol. 2014.).



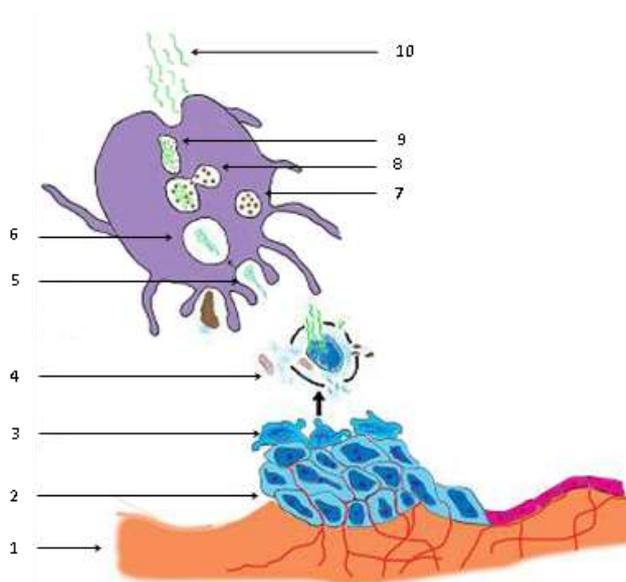
Obr. 2

Graf znázorňující procentuální výskyt ctDNA u různých nádorových onemocnění (upraveno podle BETTEGOWDA a kol. 2014)

2.1.2 Původ ctDNA

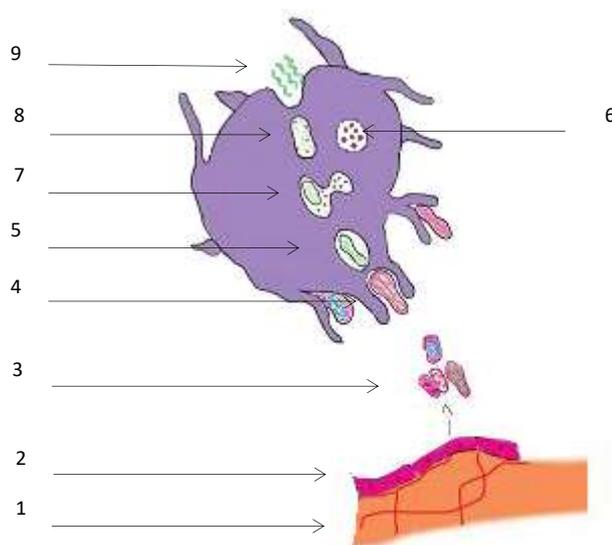
Přestože je studium ctDNA v popředí zájmu mnoha výzkumných týmů, doposud není zcela objasněn přesný mechanismus jejího uvolňování do krevního řečiště. Existují dva potenciální, vzájemně se nevylučující mechanismy - pasivní a aktivní (STROUN a kol. 2001) Dle pasivního mechanismu apoptické a nekrotické buňky uvolňují svojí mitochondriální a jadernou DNA do krevního oběhu v okamžiku jejich destrukce. Díky tomu se i u zdravých jedinců objevuje cfDNA a to zejména při zatížení organismu náročnou fyzickou námahou nebo při probíhající zánětu, kdy dochází k akumulaci „buněčných nečistot“ včetně DNA, která je následně uvolněna do krevního oběhu (BROUCKAERT a kol. 2004, VIORRITTO a kol. 2007). Toto uvolňování nastává buď přímo, nebo častěji prostřednictvím makrofágů, které fagocytují jednak neoplastické, ale i nenádorové (apoptické) buňky a fragmentovanou DNA pak uvolňují do periferní krve (DIEHL a kol. 2005). Nekrotické buňky, hlavní zdroj ctDNA, vznikají u invazivních tumorů nedokrvením tkáně s následnou hypoxií (CHOI a kol. 2005). Nezhoubné nádory touto vlastností nedisponují a množství produkované fragmentované DNA je minimální (LEEK a kol. 1999). To znamená, že čím je tumor agresivnější, tím stoupá i stupeň nekrózy a dochází k odpovídajícímu vzestupu ctDNA. Nekróza ale ovlivňuje i okolní nenádorové buňky, čímž se vyplavuje také nenádorová DNA do krevního oběhu a to vede k tomu, že u pacientů s pokročilým karcinomem se vyskytuje zvýšená koncentrace nádorové

i nenádorové cirkulující DNA v plazmě. To, zda cfDNA pochází z nekrotických tedy především nádorových buněk nebo apoptických, tedy nenádorových buněk, lze odlišit podle velikosti uvolňovaných fragmentů. Fragmenty DNA vznikající nekrotizací mají široké rozpětí délek od 185bp do 926bp, zatímco DNA fragmentovaná přesně regulovanou apoptózou se vyskytuje vždy v poměrně uniformních velikostech od 185bp do 200bp (Obr. 3) (GIACONA a kol. 1998, JAHR a kol. 2001). Z nedávných studií však vyplývá, že velikost fragmentů ctDNA se může u různých typů nádorů i různých pacientů velmi lišit, kdy hlavní frakce se většinou pohybuje ve velikostech 145 bp a méně (HEIDARY 2014, UNDERHILL a kol. 2016).



Obr. 3a – Znárodnění likvidace nekrotické nádorové buňky makrofágem a uvolnění jejích nestejně velkých DNA fragmentů do krevního řečiště

Ve sliznici tlustého střeava (1) vyrůstá nádor (2), který má na svém povrchu vrstvu nekrotických buněk (3). Nekrotická nádorová buňka se uvolní (4) a její fragmenty zachytí makrofág svými panožkami (5). Z pohlceného fragmentu vzniká fagozom (6), se kterým splyne lysozom (7) za vzniku fagolysozomu (8). Poté jsou natrávené částice včetně různě dlouhých fragmentů nádorové DNA (9) uvolněny do svého okolí (10).



Obr. 3b – Znárodnění likvidace apoptické buňky makrofágem a uvolnění jejích stejně dlouhých DNA fragmentů do krevního řečiště

Ve sliznici tlustého střeava (1) se nachází vrstva normálního epitelu (2), z níž se uvolňuje buňka jdoucí do apoptózy. Z té vznikají apoptické částice (3), které zachytí makrofág svými panožkami (4). Z pohlcené částice vzniká fagozom (5), se kterým splyne lysozom (6) za vzniku fagolysozomu (7). Poté jsou natrávené částice apoptických buněk včetně DNA o stejných velikostech (8) uvolněny do svého okolí (9).

Za aktivní mechanismus uvolňování je považována produkce ctDNA živými nádorovými buňkami s cílem ovlivnit transformaci buněk vyskytujících se ve vzdálených oblastech, tedy jev zvaný genometastáza. Tuto hypotézu potvrdil GARCÍA-OLMO a kol. (2010) na experimentu, ve kterém přidali plazmu od pacienta s kolorektálním karcinomem s pozitivní *KRAS* mutací ke kultuře nenádorové buněčné linie NIH-3T3. Po kultivaci detekovali v buňkách NIH-3T3 mutovanou formu *KRAS* genu a poté, co byly tyto buňky injektovány do imunodeficientní myši, se u ní rozvinul nádor s detekovanou lidskou mutovanou sekvencí genu *KRAS*.

2.2 Detekce ctDNA

Aby došlo k úspěšné analýze přítomnosti ctDNA v plazmě, musí být vhodně zvolený metodický postup skládající se ze tří základních kroků. Prvním je zpracování odebrané krve tak, aby nedošlo k hemolýze krevních buněk a následné kontaminaci plazmy DNA pocházející z jejich jader. Dalším krokem je izolace ctDNA s co nejvyšším množstvím kvalitní cfDNA pro následné molekulárně-biologické aplikace. Posledním krokem je amplifikace a vysoce citlivá detekce ctDNA.

2.2.1 Zpracování odebrané krve

Krevní vzorek odebraný do protisrážlivého roztoku se musí zpracovat nejpozději do 2 hodin po odběru, aby nedošlo k poškození jaderných krevních buněk a vyplavení jejich DNA do plazmy (UMETANI a kol. 2006a). V některých studiích byl proveden odběr do heparinizovaných zkumavek (SU a kol. 2008; KUANG a kol. 2009), v jiných do zkumavek obsahujících roztok EDTA (DIEHL a kol. 2008a). Nyní jsou již vyráběny odběrové zkumavky určené přímo pro odběr krve pro analýzu ctDNA (DIAZ a kol. 2016). Byly publikovány studie zvažující využití séra (GAHAN a SWAMINATHAN 2008), ale tento materiál není moc vhodný, protože při vzniku krevního koagula se sérum kontaminuje DNA z leukocytů, což potvrdil UMETANI a kol. (2006a).

Nastavení tíhového zrychlení při centrifugaci krve pro získání plazmy by nemělo dosahovat takových hodnot, při kterých vlivem příliš vysoké odstředivé síly dojde k hemolýze buněk a tím ke znehodnocení vzorku. Po primární centrifugaci se plazma může recentrifugovat (SU a kol. 2008), nebo přefiltrovat přes membrány o velikosti pórů 0,45 μm (DIEHL a kol. 2008a). Takto ošetřená plazma se pak uchovává při -20°C až do doby zpracování.

2.2.2 Izolace ctDNA

Základem pro úspěšnou detekci ctDNA je zvolení izolační metody zaručující získání dostatečného množství kvalitní DNA. Může se užít klasická fenol-chloroformová extrakce (BERÁNEK a kol. 2006), nebo komerční kity na principu membránových kolonek.

PÉREZ-BARRIOS a kol. (2016) srovnávali 3 izolační systémy MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isoaltion Kit I (Roche), Maxwell®RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) a QIAamp Circulating Nucleid Acid kit (Qiagen). Do této studie bylo zařazeno 57 pacientů s diagnózou karcinomu plic a tlustého střeva ve stádiu III-IV, validní výsledky byly získány od 47 pacientů. Koncentrace vyzolované DNA byla měřena fluorometricky a velikost získaných fragmentů pomocí kapilární elektroforézy na přístroji Agilent. Následně byly ve vzorcích detekovány mutace v genech *KRAS* a *EGFR* metodou digital PCR (dPCR) (viz kap. 2.2.3). Dle dosažených výsledků zjistili, že při použití izolačního kitu společnosti Promega získají v průměru nejvyšší koncentrace, ale u jednoho vzorku se objevila falešná negativita v detekci *EGFR* mutace. Po analýze délky fragmentů se ukázalo, že tímto kitem získali velké množství fragmentů o uniformních velikostech 150 – 200bp. Dle tohoto výsledku se zdá, že vyzolovaná DNA pochází většinou z apoptických buněk (UMETANI a kol. 2006b). Zbývající dva kity byly v detekci mutací přesnější s podobnými procentuálními zastoupeními mutantních frakcí.

Další publikace porovnávající izolační kity je z roku 2009, kdy byly taktéž porovnávány 3 izolační kity: NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel) a Wizard (Promega) a QIamp DNA Micro Kit (Qiagen). V této studii použili metodu dle UMETANI a kol. (2006b), která vychází z rozdílných velikostí fragmentů cfDNA na základě svého vzniku (apoptóza vs. nekroza) (GIACONA a kol. 1998). Ve své práci zjišťovali množství obou typů cfDNA pomocí PCR v reálném čase a to tak, že amplifikovali dva různě dlouhé fragmenty Alu sekvence o velikostech 115bp a 247bp. Alu 115 zachycovala koncentraci krátkých fragmentů DNA pocházejících z apoptických, tedy nenádorových buněk, a zároveň i DNA fragmentů pocházejících z buněk nádorových, zatímco Alu 247 zachycovala koncentraci pouze nádorové DNA. Následným poměrem Alu247/Alu115 vypočítali koncentraci DNA pocházející pouze z nádorových buněk. Na základě toho zjistili, že zatímco kitem NucleoSpin Plasma získali největší koncentraci celkové cfDNA, pro získání fragmentů pocházejících z nádorových buněk je vhodnější využít kit QIampDNA Micro Kit (KUANG a kol. 2009). Nicméně na základě nových

skutečností (viz kap 2.1.2) se dá usuzovat, že výsledky z tohoto experimentu nemusí být správné.

2.2.3 Metody analýzy ctDNA

S vývojem vysoce citlivých molekulárně biologických metod nabyla analýza ctDNA nových rozměrů. Původní kvantitativní analýza byla postupně zcela nahrazena analýzou DNA alterací. Kvantitativní analýza je založena na porovnání koncentrace cfDNA v plazmě pacientů a zdravých jedinců (BONI a kol. 2007). Zvýšená hladina u pacientů ukazuje na přítomnost nádorového onemocnění. Celkové množství cfDNA se zjišťuje např. pomocí kvantitativní PCR v reálném čase amplifikací Alu sekvencí nebo jiných markerů jako je β -globin, β -actin (VAN DER VAART a PRETORIUS 2010). Tato metoda může mít vysokou senzitivitu, ale poměrně nízkou specificitu (amplifikovány jsou nádorové i nenádorové fragmenty DNA). Proto se tento způsob průkazu ctDNA již nevyužívá a zcela se přešlo na detekci pomocí nádorových DNA alterací (markerů). Nejjednodušší varianta zahrnuje nalezení markeru v primárním tumoru či metastáze a následované detekcí stejného markeru v izolované cfDNA. Nejčastěji používanými markery jsou aberace typické pro tumorovou DNA - jednobodové mutace či krátké delece protoonkogenů a tumor supresorových genů, rozsáhlé delece a DNA hypermetylace promotorů tumorsupresorových genů (SCHWARZENBACH a kol. 2011).

Detekce rozsáhlých delecí probíhá pomocí analýzy mikrosatelitních markerů metodou LOH (loss of heterozygosity). Tato metoda má značná omezení, především potřebu amplifikace většího množství mikrosatelitních markerů a obtížnou interpretaci výsledků (MÜLLER a kol. 2006).

Analýza hypermetylace je možná několika způsoby, jako je metylačně specifická PCR (WONG a kol. 1999), kvantitativní nebo fluorescenční metylačně specifická PCR (WONG a kol. 2004), metylačně specifická restriční analýza (DELIGEZER a kol. 2003), nebo metylačně specifická MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), jež je díky své jednoduchosti často používaným nástrojem pro analýzu metylací v buněčné DNA (PESEK a kol. 2011, KRAMÁŘ a kol. 2016). Přestože citlivost vyšetření hypermetylací v cfDNA může být poměrně vysoká, specificita bývá nízká. Jedním z důvodů je dynamičnost procesu metylace DNA, která může vést k rozdílnému metylačnímu stavu mezi dvěma DNA pocházejícími ze stejného nádoru, např. primární tumor vs. metastáza (WANG a DAI 2007), nebo primární

nádor vs. cfDNA (FUJIWARA a kol. 2005). Druhým důvodem je možný výskyt stejné hypermetylace v primárním nádoru jako v některých zdravých buňkách, nebo v buňkách jiného nádoru (FLEISCHHACKER a SCHMIDT 2007).

Vyšetřování DNA variací typu jednobodových mutací nebo krátkých delecí spočívá obvykle v úvodní PCR následované detekcí amplifikovaných produktů. To je možno vysoce sensitivními technikami, které jsou schopny detekovat nízké frakce nádorové DNA na pozadí vysoké nenádorové frakce. Jedná se o klasické fluorescenční metody na principu kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí, Denaturant Capillary Electrophoresis (DCE), digital PCR (dPCR), nebo metody vyvinuté přímo pro detekci ctDNA v plazmě jako BEAMing (zkratka pocházející ze základních komponentů: beads emulsion amplification and magnetic) a další citlivé metody typu Next-Generation Sequencing (NGS), které jsou schopny zachytit velké množství změn v celém genomu (QIN a kol. 2016). Všechny tyto metody se kromě vysoké citlivosti vyznačují, při vhodně zvoleném markeru, také vysokou specificitou. Dříve bylo nepostradatelnou součástí nalezení nádorového markeru v nádorové tkáni, nyní mohou být tyto metody využívány i k analýze mutací bez těchto znalostí, zejména v případech, kdy je tumorová DNA nedostupná. Recentní studie porovnávající mutační nález v nádorové tkáni a ctDNA poukazují, že konkordance se pohybuje od 27 % až po 95 % dle použité metodiky (SUN a kol. 2015). Záleží tedy, na kterou z klinických aplikací bychom chtěli ctDNA využívat. Pro zjištění přítomnosti jedné mutace, například pro účely volby vhodné léčby, může postačit pouze krevní vzorek pacienta, ale pro jiné aplikace, jako je například hodnocení celkového množství nádorové masy (tzv. tumor burden) pro sledování účinku terapie nebo včasného záchytu rekurence onemocnění, je vhodné mít k dispozici vzorek nádoru, v němž je možné analyzovat co největší množství mutací pro následné zvýšení citlivosti záchytu ctDNA.

Kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí

Metoda kvantitativní PCR v reálném čase (real-time qPCR), která byla poprvé představena v roce 1991 (HOLLAND a kol. 1991), je první zcela zásadní modifikací klasické PCR amplifikace. Je výsledkem mnohaletého vývoje přístrojové techniky umožňující detekci změny fluorescenčního signálu vyzařovaného v průběhu teplotních PCR cyklů. Základem reakce je krátká DNA sonda (cca 18–30 nt) nesoucí na jednom konci fluorescenční značku a na druhém konci tzv. zhášedlo (quencher), neboli chemickou skupinu, která pohlcuje fotony vyzařované fluorescenční značkou. Tato tzv. duální sonda je navržena tak, aby hybridizovala s PCR fragmentem obsahujícím detekovanou mutaci vzniklým v průběhu amplifikace.

V důsledku 5'–3' exonukleázové aktivity DNA polymerázy, která je ve směsi přítomna, je však takto hybridizovaná sonda ihned hydrolyzována na jednotlivé nukleotidy. Tato hydrolyza způsobí oddělení fluorescenční sondy od zhášedla a vede ke vzniku fluorescenčního signálu. Jelikož je při dostatečném nadbytku duálních sond každý z přítomných DNA fragmentů sondou hybridizován, intenzita fluorescenčního signálu úměrná aktuálnímu počtu PCR fragmentů přítomných v reakci v každém cyklu PCR amplifikace. S využitím fluorescenčního detektoru, který je schopen průběžně zaznamenávat úroveň signálu po celou dobu PCR amplifikace, je tak výsledkem qPCR experimentu křivka zvyšující se fluorescence v důsledku nárůstu koncentrace PCR produktu. A právě tato kvantitativní vlastnost uvedené metodiky, označované jako tzv. TaqMan 5'–3' assay, otevřela zcela nové možnosti využití (HEID a kol. 1996). Největší uplatnění našla v identifikaci a kvantifikaci virových a bakteriálních patogenů v mikrobiologii, sledování minimální reziduální choroby u příjemců transplantátu kostní dřeně, pro rychlou detekci jednotlivých genových mutací apod. Díky své citlivosti nachází své časté využití v detekci ctDNA.

Digital PCR

Za historicky druhou zcela zásadní modifikaci původní metody PCR amplifikace lze považovat tzv. techniku digitální PCR (digital PCR, dPCR). Základem této metody je provádění klasické PCR amplifikace jednoho vzorku rozdělené do velkého množství reakčních směsí ve velmi malých objemech za použití velmi zředěné templátové DNA tak, aby v každé reakční směsi byla maximálně jedna molekula této DNA. Za první zmínku o této metodě je obecně považována publikace P. J. Sykese, ve které autoři detailně popisují provádění PCR amplifikace velmi nízkých výchozích koncentrací templátové DNA (SYKES a kol. 1992). Při limitním zředění má interpretace výsledku digitální (binární) charakter - podle toho zda došlo, nebo nedošlo k amplifikaci lze usoudit, zda v původním vzorku byla, nebo nebyla právě jedna molekula templátové DNA. Pokud je zkoumaný vzorek rozdělen na velké množství jednotlivých digitálních PCR reakcí, lze na základě výsledku „spočítat“ jednotlivé molekuly templátové DNA z původního vzorku.

Jako detekční platforma původně představené metodiky označované jako limitně zředěná PCR (limiting dilution PCR), sloužila klasická gelová elektroforéza, což představovalo určité omezení, především v citlivosti metody. Termín digitální PCR byl poprvé použit v roce 1999 pro metodu, kterou Vogelstein and Kinzler detekovali přítomnost mutantní formy genu KRAS u pacientů s kolorektálním karcinomem. Pro detekci byl použit real-time PCR cyklér

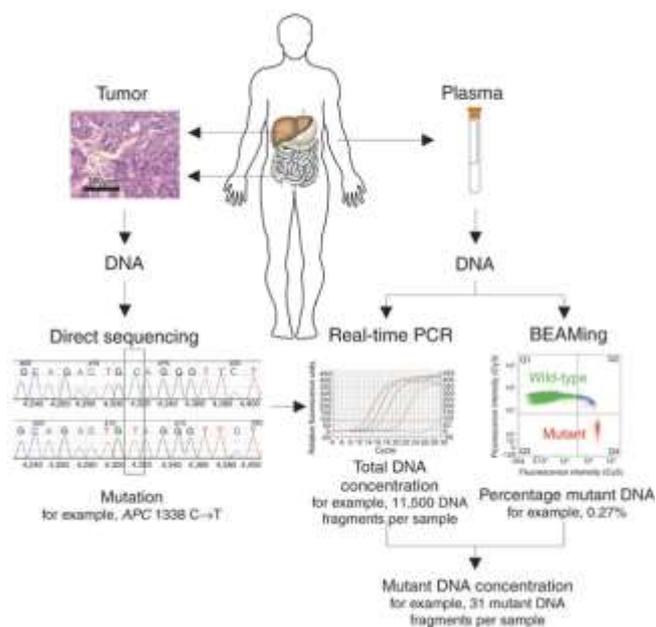
umožňující současnou amplifikaci devadesáti šesti vzorků najednou (VOGELSTEIN a KINZLER 1999). Následný vývoj se ubíral směrem zvyšování počtu jamek v mikrotitračních destičkách PCR termocykléru až do současnosti, kdy jsou vyvinuty specializované digitální termocykléry umožňující amplifikaci až ve 24.000 nanolitrových reaktorech současně (MORRISON a kol. 2006.).

A právě současné provádění amplifikace ve velkém počtu paralelně probíhajících reakcí je základním požadavkem digitální PCR. Z tohoto důvodu byl pro vývoj digitální PCR zásadní pokrok v oblasti přístrojové techniky, především miniaturizované mikrofluidní analýzy, který umožnil paralelně provádět PCR ve stovkách až tisících mikroreaktorů. Navíc zcela novým přístupem k provádění digitální PCR amplifikace se stala tzv. droplet digitální PCR (droplet digital PCR, ddPCR), při které PCR amplifikace probíhá v tisících až desetitisících kapkách emulze (HINDSON a kol. 2011). Ta je předem připravena z reakční PCR směsi tak, aby každá kapka obsahovala maximálně jednu kopii výchozího DNA templátu. Po proběhnutí reakce jsou kapky postupně nasávány a jejich fluorescenční odezva je detekována s využitím mikrofluidního systému obdobně jako v průtokové cytometrii.

Hlavní využití našla technologie digitální PCR především v oblasti kvantifikace velmi nízkých koncentrací výchozí DNA jako např. ultracitlivá detekce patogenů, záchyt nízkých hladin mutací v detekci ctDNA, či analýza mRNA exprese na úrovni jediné buňky.

BEAMing

Zajímavou metodu pro detekci mutací v plazmě vyvinul DIEHL a kol. (2005). PCR produkty vzniklé amplifikací úseku DNA obsahujícího danou mutaci smíchal s magnetickými kuličkami a směs rozptýlil do bilionů mikročástic v emulzi voda-olej. Pak provedl druhou PCR reakci pomocí primerů navázaných na magnetických kuličkách, následně hybridizaci vzniklých PCR produktů s dvěma typy specifických fluorescenčně značených sond (mutovaná a nemutovaná sekvence, z nichž každá byla značená jinou fluorescenční značkou) a nakonec kuličky analyzoval pomocí průtokové cytometrie. Výsledkem byl graf, který znázorňoval koncentraci mutovaných a nemutovaných fragmentů (Obr. 4).



Obr. 4

Schematický přehled postupu detekce cfDNA metodou BEAMing (DIEHL a kol. 2005)

Metodu pak aplikoval na sledování cfDNA u pacientů s kolorektálním karcinomem (KK) před operací a po operaci a výsledky korelovaly s úspěšností chirurgické léčby, nebo případnou progresí onemocnění.

Tato metoda vykazuje zatím nejvyšší senzitivitu ze všech publikovaných prací zabývajících se detekcí ctDNA. V uvedené práci byla prokazatelná nádorová frakce ctDNA zachycena u všech pacientů s pokročilým KK a u většiny pacientů s nemetastazujícím KK, a dokonce i u jednoho pacienta s nezhoubným onemocněním (adenom). I přes vysoké finanční a přístrojové nároky je tato metoda celkem využívána, její omezení spočívá v aplikaci na pouze vybranou skupinu genů, ale při použití se shoda nalezených změn v cfDNA a tkáni pohybuje kolem 90 % (JANKU a kol. 2015).

Next-Generation Sequencing

Od roku 2004 představilo několik společností zcela nové přístupy k DNA sekvenování, které se vyznačují obrovským množstvím osekvenovaných DNA bází blížící se 1 miliardě za den (MARDIS 2013). Z těchto nových technologií, které bývají též označovány termínem masivně-paralelní sekvenování (MPS) jsou nejvýznamnější ty, které využívají princip sekvenování postupnou syntézou řetězce komplementárního k sekvenovanému úseku DNA. Ve vývoji metodiky nastalo několik významných momentů a vstoupilo do ní několik významných společností. V roce 2004 společnost 454 (nyní součást Roche) představila NGS sekvenátor využívající metody tzv. pyrosekvenování (MARGULIES a kol. 2005).

Ještě dále posunul rychlost DNA sekvenování princip společnosti Solexa (nyní Illumina) představený v roce 2008 (BENTLEY a kol. 2008). Znovu se jedná o sekvenaci pomocí syntézy DNA komplementu s tím, že v každém kroku je inkorporována pouze jedna báze ze čtyř nukleotidů, které jsou současně přítomny ve formě fluorescenčně značených reverzibilních terminátorů. V každém kroku je tak identifikována inkorporovaná báze na základě její specifické fluorescenční značky. Následuje uvolnění terminátoru a inkorporace další báze. Reakce probíhá v průtokovém mikrokanálu, ve kterém proudí jednotlivé reakční komponenty přes pevně ukotvené fragmenty sekvenovaných úseků. Současné přístroje Illumina mohou mít i několik takových kanálů, v nichž jsou schopné ukotvit a sekvenovat až stotisíce takových úseků najednou, což vede k výsledné kapacitě několika miliard přečtených bází během jednoho několikahodinového běhu.

Poslední z významných metodik pro sekvenování nové generace je tzv. polovodičové sekvenování, které bylo uvedeno v roce 2010 společností Ion Torrent (nyní součást Thermo Fischer). Je založeno na obdobném principu jako pyrosekvenování – během syntézy komplementu nejsou detekovány přímo inkorporované báze, ale jejich identifikace je provedena na základě monitorování vedlejších produktů inkorporace (ROTHBERG a kol. 2011). Na rozdíl od pyrosekvenování však není sledován vznik pyrofosfátu optickou detekcí generované fluorescence, ale je prováděn záchyt uvolněného protonu H⁺ pomocí nanometrického měření pH miniaturním senzorem, kterých je možno umístit více než milion na jediný čip. Výhodou polovodičového sekvenování je vysoká rychlost čtení na rozdíl od optické detekce v systémech založených na reverzibilních terminátorech. Naopak jistou nevýhodou je nepřesnost v oblastech homopolymerních sekvencí (např. AAAAAATAAAAA, kdy stejně jako v pyrosekvenování je počet opakujících se bází odvozen od celkové intenzity signálu uvolněných reakčních komponent).

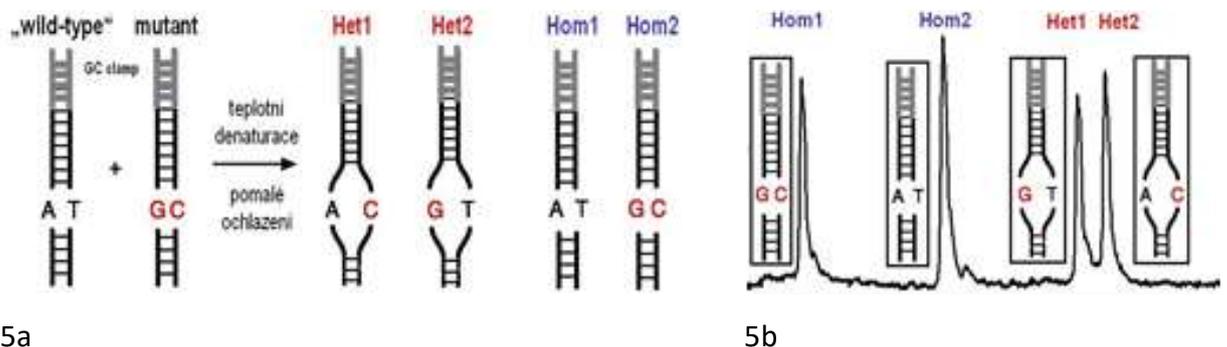
Sekvenování nové generace postupně proniká z oblasti výzkumných projektů do klinické praxe, a to především tam, kde je třeba současné analýzy mnoha cílových sekvencí najednou, jako je mutační analýza více kompletních genů (např. u hypertrofické kardiomyopatie), kde vysoce paralelní přístup vede k výraznému snížení ceny za každý sekvenovaný úsek (MARDIS 2017).

Díky své citlivosti se NGS jeví pro detekci ctDNA jako ideální nástroj, nicméně shoda mezi nalézánými aberacemi v nádorové tkáni a ctDNA není vysoká a některé publikace uvádějí konkordanci pouze kolem 8 % (HAHN a kol. 2017). NGS lze ale využít i cíleně

na vybrané lokusy a nikoli pouze na velké množství genů v genomu. Některé vědecké týmy využívají toho, že pomocí speciálního blokovacího konstruktů potlačí amplifikaci nemutované alely, čímž dojde k obohacení mutantní formy (tzv. mutant enrichment) a následně se tento produkt pomocí NGS osequkuje. Tato aplikace vykazuje analytickou citlivost pohybující se kolem 0,002 % - 0,006 % detekce mutantní frakce (FUJII a kol. 2017). Nevýhodou jsou ale vysoké finanční i přístrojové nároky.

DCE

Poslední z výše uvedených metod patřících mezi vysoce citlivé techniky detekce DNA variací je analýza heteroduplexů za konstantní teploty pomocí denaturační kapilární elektroforézy (DCE). Její princip spočívá v separaci heteroduplexů, neboli párů nekomplementárních bází mezi dvěma řetězci DNA lišícími se v jednom nukleotidu (mutace). Heteroduplexy vzniknou denaturací dvouřetězcových molekul DNA na jednořetězcové a jejich pomalou reasociací, při které vzniká jak původní dvouřetězcová DNA (obsahuje homoduplexy), tak i jejich kombinace (obsahují heteroduplexy) (Obr. 5a). K separaci takto vzniklých DNA molekul pak dochází v důsledku rozdílů v jejich denaturačních teplotách. Při kapilární elektroforéze za teploty specifické pro analyzovanou mutaci se dvouřetězcové fragmenty rozevírají nejprve v místě heteroduplexu a následně v celém zbytku fragmentu a tato postupná denaturace způsobí jejich zbrzdění a následnou separaci v průběhu elektroforézy. U vzorku obsahujícího mutovanou DNA jsou pak výsledkem čtyři píky (Obr. 5b) (MINARIK a kol. 2004).

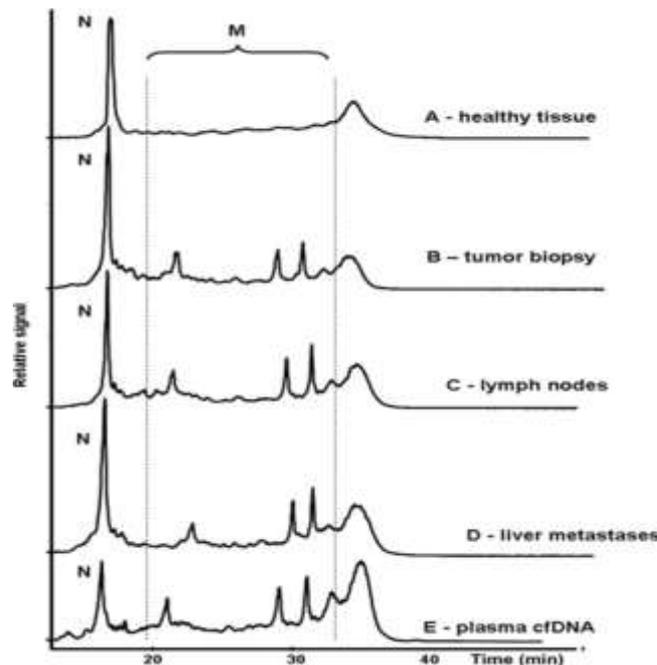


Obr. 5

5a) Tvorba heteroduplexů pro DCE analýzu

5b) Separace heteroduplexů pomocí DCE analýzy (převzato BENEŠOVÁ 2007)

Využití DCE v detekci ctDNA bylo již v minulosti prezentováno na několika nádorových onemocněních např. karcinomu pankreatu (BUNGANIČ a kol. 2016) a kolorektálním karcinomu (MINARIK a kol. 2011, LEVY a kol. 2012). Metoda vykazuje vysokou citlivost dosahující záchytu mutované frakce až 0,1 %. Publikována byla shoda detekce mutace v ložisku nádoru, metastatických ložiscích a ctDNA (Obr. 6) (BENESOVA a kol. 2013). Navíc jednoduchý postup je složen pouze ze dvou kroků – PCR amplifikace a kapilární elektroforézy bez nutnosti speciálního přístrojového vybavení.



Obr. 6

Použití techniky denaturační kapilární elektroforézy (DCE) k detekci somatických mutací (KRAS)

Pík označený jako N odpovídá homoduplexu nemutované DNA, píky označené jako M odpovídají homoduplexu mutované DNA a dvěma heteroduplexům. Normální tkáň obsahuje pouze pík odpovídající nemutované DNA a žádné mutantní píky (A). Elektroferogramy tkáně z biopsie nádoru (B), lymfatických uzlin (C), jaterních metastáz a ctDNA (E) obsahují všechny čtyři píky (převzato BENESOVA a kol. 2013)

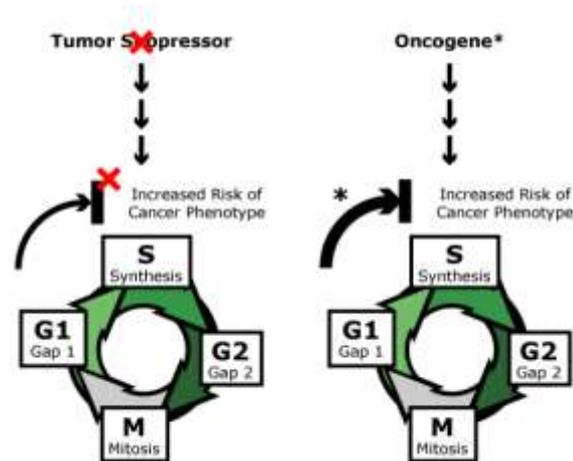
2.3 Využití ctDNA v klinické praxi

2.3.1 Molekulární podstata karcinogeneze

Proto, aby se zdravá buňka zvrhla v buňku nádorovou, musí disponovat šesti charakteristickými znaky: permanentní proliferační aktivita (nepřetržité spuštění některé signální dráhy), únik růstovým supresorům, aktivace invazivity a metastazování, replikační nesmrtnost, indukce angiogeneze a inhibice programované buněčné smrti (apoptózy) (HANAHAN a WEINBERG 2011).

Pro docílení uvedených vlastností je pro buňku nepostradatelná postupná akumulace mutací v genech nezbytných pro vnitrobuněčnou regulaci buňky (KAPRAS a kol. 1996). Tyto

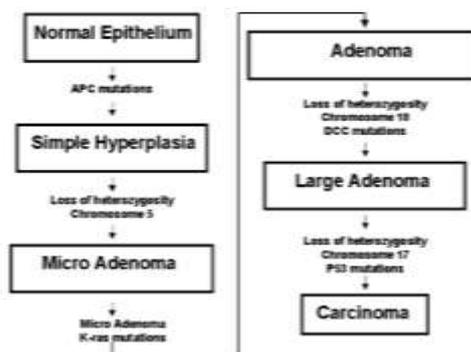
geny kódující mnoho proteinů podílejících se na buněčném růstu a proliferaci se dělí do dvou tříd, na tumor supresorové geny (např. *TP53*) a protoonkogeny (např. *KRAS*) měnící se vlivem mutace na onkogeny (LODISH a kol. 2000). Tumor supresorové geny jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu a jejich hlavní funkcí je pozastavení buňky v G1 fázi nebo inhibice jejího růstu, dále jsou zodpovědné za opravu poškozené DNA, udržení integrity genomu a aktivaci apoptózy. Vniklé mutace způsobují ztrátu jejich funkce. Onkogeny svými proteinovými produkty způsobují transformaci normální buňky na buňku nádorovou. Protoonkogeny kódují proteiny, které lze rozdělit dle svých funkčních vlastností na růstové faktory, receptorové tyrosinkinázy, nerekceptorové tyrosinkinázy, G proteiny, serin-threoninkinázy, transkripční faktory a faktory regulující apoptózu (KOVÁŘ 2005) (Obr. 7).



Obr. 7

Působení mutací v tumor supresorových genech a protoonkogenech na buněčný cyklus (převzato http://missinglink.ucsf.edu/lm/cell_cycle/oncogenes.html)

Při postupné akumulaci mutací dochází ke změnám tkáně od tzv. prekancerózních stádií až po pokročilé karcinomy. Přítomnost konkrétních mutací v nádorové tkáni může být nápomocná při stanovení diagnózy. Například u onemocnění slinivky břišní nemusí být vždy rozlišena chronická pankreatitida od nádorového bujení a v případě pozitivního nálezu mutované formy genu *KRAS* lze s určitostí říci, že se jedná o nádorové onemocnění (SALEK a kol. 2007). Nebo u kolorektálních lézí lze na základě nalezených mutací v typických genech určit, v jakém stádiu se onemocnění nachází (Obr. 8) (FEARON a VOGELSTEIN 1990). Také detekce konkrétních mutací může pomoci s léčebnou strategií, například při detekci mutace V600E v genu *BRAF* u melanomu je indikována cílená biologická léčba (UGUREL a kol. 2017).



Obr. 8

Karcinogeneze kolorektálního karcinomu – Vogelsteinův model (převzato MINARIK a kol. 2004)

2.3.2 Diagnostika onkologických onemocnění

K diagnostice nádorových onemocnění se využívají zejména zobrazovací metody, hodnoty biochemických markerů v krvi či molekulárně genetické vyšetření nádorové tkáně. Definitivní diagnóza se stanovuje tzv. morfologickým nebo histologickým vyšetřením provedeném na vzorku pocházejícím z nádorové tkáně, při němž se potvrdí či vyvrátí přítomnost nádorových buněk. Vzorek pro toto vyšetření se získá pomocí biopsie, popř. v průběhu operace.

2.3.2.1 Zobrazovací metody

Mezi nejčastěji využívané zobrazovací metody patří ultrasonografie (UZ), počítačová tomografie (CT), magnetická rezonance (MR), pozitronová emisní tomografie (PET) a endoskopie. Pomocí těchto vyšetření se určuje lokalizace, velikost nádoru nebo jeho prorůstání do okolních tkání.

Ultrasonografie

Jedná se o vyšetření, kdy se na základě schopnosti odrazet ultrazvukové vlny rozpozná struktura, funkce a změna orgánů jako jsou například cysty, nádory či kameny. Sonografické vyšetření provádí lékař specialista. Samotná příprava není složitá a nezatěžuje pacienta, pouze se na kůži ve sledované oblasti nanese vrstva ultrasonografického gelu. Přednosti ultrazvuku jdou ruku v ruce s vývojem a výzkumem v této oblasti, díky kterému nyní vykazuje tato metoda vysokou diagnostickou spolehlivost a citlivost (LUKÁŠ a kol. 2015). Výhodou vyšetření je cenová dostupnost a nezatížení vyšetřované osoby radiačním zářením. Nevýhodou je nespecifičnost, protože na základě UZ vyšetření nelze s jistotou určit, zda se jedná o maligní, či benigní ložisko. Pod ultrazvukovou kontrolou se často provádí i odběr

bioptického materiálu, například v rámci ultrasonografické endoskopie, která je využívána při diagnostice karcinomu slinivky břišní (NEKULA a kol. 2005).

Skiagrafie

Skiagrafie je diagnostická metoda, která využívá rentgenové záření pro zobrazení tvrdých i měkkých tkání. Principem vyšetření je rozdílná absorpce a rozptyl RTG záření v jednotlivých tkáních těla (NAVRÁTIL a kol. 2005). Výsledkem je digitální snímek. Pro dokonalejší zobrazení tkání je možné využít kontrastní látky. Jedná se většinou o první vyšetřovací metodu v diagnostice maligních onemocnění dýchací soustavy, jejíž výhodou je cena a schopnost zachycení malé změny na měkké či tvrdé tkáni. Nevýhodou je nemožnost zobrazení prostorové orientace chorobného ložiska, nespecifičnost výsledku a zatížení pacienta rentgenovým zářením (NEKULA a kol. 2005).

Počítačová tomografie (CT) a pozitronová emisní tomografie (PET)

Počítačová tomografie je zobrazovací metoda založená na principu průchodu rentgenového záření pacientem. Výsledkem vyšetření je sada tenkých vrstev neboli řezů z vyšetřované oblasti. Nejčastěji se CT využívá k vyloučení či potvrzení nádorových lézí, při diagnostice vzdálených metastáz a hlavně při kontrolách probíhajícího onemocnění. Nevýhodou vyšetření je podání kontrastní látky, na kterou může být pacient alergický, a rentgenové záření se svými potencionálními mutagenními účinky. Některé studie totiž potvrdily zvýšený výskyt nádorových onemocnění u lidí podstupujících častá CT vyšetření (SMITH-BINDMAN a kol. 2009). Další podstatnou nevýhodou CT vyšetření je jeho citlivost. U některých nádorů, např. u karcinomu slinivky, se udává nižší schopnost detekce u útvarů menších než 1,5 cm (NIEDERAU a GRENDELL 1995).

Hybridním řešením pro lepší záchyt nádorových lézí je kombinace CT s pozitronovou emisní tomografií (PET). PET funguje na principu detekce pozitronového zářiče, který je produkován rozpadajícím se radiofarmakem. Nejčastěji využívaným radiofarmakem je izotop ^{18}F podávaný ve formě ^{18}F -fluorodeoxyglukózy. Tato látka se v organismu chová podobně jako glukóza, takže je vychytávána v místech s aktivnějším metabolismem (např. nádorové buňky), následně je metabolizována na glukózu a vyloučena z těla ven (BĚLOHLÁVEK a kol. 2004). Výhodou PET je jeho vysoká diagnostická přesnost. Při použití vhodného radiofarmaka je možné diagnostikovat zhoubné ložisko o velikosti několika milimetrů, nevýhodou je nákladná technická vybavenost a vysoká radiační zátěž pro pacienta (KUPKA a kol. 2007).

Tento systém v kombinaci s CT se využívá pro detekci časných recidiv malignit a při nejednoznačných nálezech z jiných zobrazovacích metod (KABÍČKOVÁ 2011).

Magnetická rezonance (MR)

Jedná se o neinvazivní zobrazovací techniku, která je založena na rozdílných magnetických vlastnostech atomových jader různých prvků. Využívá silné magnetické pole a elektromagnetické vlnění s vysokou frekvencí. Pro lepší zobrazení se používají kontrastní látky měnící magnetické poměry (ZHI-PEI 1999). Nejčastěji se MR využívá při onemocnění mozku, páteře a míchy, u nádorů k průkazu či vyloučení ložiskových lézí a určení pokročilosti onemocnění. Citlivost vyšetření je takřka shodná s CT vyšetřením. Není možné detekovat menší nádorové léze a ve srovnání s CT se častěji vyskytují artefakty, které snižují kvalitu výsledku. Úplnou kontraindikací pro využití MR je implantovaný kardiostimulátor případně další kovové předměty v těle pacienta. MR nezatěžuje nemocného, jelikož je zde nulová radiační zátěž, vyšetření je možné provádět opakovaně, a to i těhotným ženám (VÁLEK a ŽIŽKA 1996). Nevýhodou je možná alergie na podávanou kontrastní látku a zacílení pouze na určitou oblast těla.

Endoskopické metody

Endoskopie je invazivní diagnostická metoda využívaná k prohlédnutí vnitřku dutých orgánů pomocí endoskopu, jenž se zavádí do dutin otvory (ústa, konečník, močová trubice), anebo vstupy pro tento účel chirurgicky vytvořenými (laparoskopie). Podle svého využití může být endoskop tubusový či flexibilní (ŠPIČÁK a kol. 2015). Tubusové endoskopy jsou využívány na vyšetření oblastí v krátkých vzdálenostech, k nimž není přístup zkomplikován záhyby. Pro vyšetření vzdálenějších orgánů se využívají endoskopy flexibilní mající na konci přístroje speciální CCD čip přenášející obraz na monitor počítače. Zde se mohou nacházet speciální kleště, kartáček či aspirační jehla umožňující odběr tkáně z vyšetřovaného orgánu. Endoskopie může mít zobrazovací i kurativní význam, jako je tomu v případě kolonoskopie (endoskopické vyšetření tlustého střeva). Při provedeném vyšetření se mohou rovnou odstranit nalezené polypy či malé nádory. Jedná se o nejsenzitivnější metodu v detekci nádoru tlustého střeva (ZAVORAL a kol. 2011).

Výhodou endoskopie je vysoká citlivost zvyšující se nabytými zkušenostmi lékaře - endoskopisty. Nevýhodou je značná invazivita vyšetření a případná rizika spojená s protržením střeva při kolonoskopii či jícnu při gastrokopii (endoskopické vyšetření

žaludku) (ZAVORAL a kol. 2011). Endoskopie je taktéž využívána v kombinaci s ultrazvukem (viz Ultrasonografie).

2.3.2.2 Biochemické nádorové markery (tumorové markery – TM)

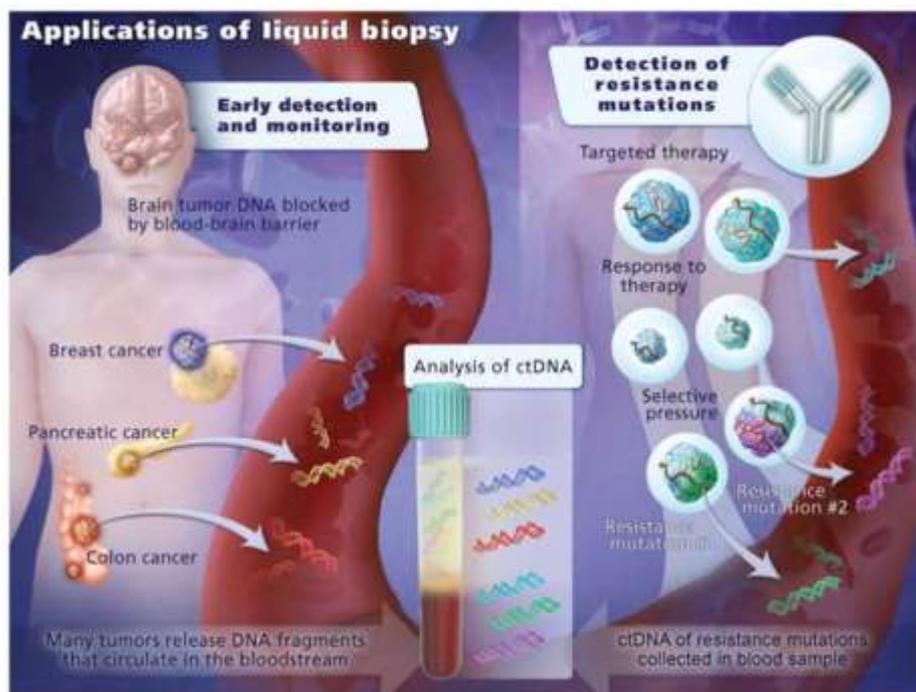
Jedná se o látky přítomné v nádoru, případně látky produkované maligními buňkami nebo organismem jako reakce na nádorové bujení. Tyto substance je možné detekovat kvalitativně, či kvantitativně v tělních tekutinách nebo přímo v nádorové tkáni. Ideální nádorový marker by měl být produkován pouze maligním onemocněním, měl by být orgánově specifický, vyskytovat se ve vysokých koncentracích, jeho množství by mělo odpovídat stupni onemocnění (RACEK a kol. 1999). Mezi nejčastěji využívané onkologické markery patří onkofetální antigeny neboli látky produkované některými nádorovými buňkami (CEA, AFP, hCG, nádorové antigeny označované CA). Dalším stanovovaným produktem tumoru jsou enzymy, a to hlavně ty, které se uplatňují při buněčném dělení a jejich hladiny se zvyšují při nadměrné proliferaci (např. tymidin kináza), a enzymy orgánově specifické, jejichž aktivita se zvyšuje při poškození nebo nádorovém postižení orgánu (PSA, PAP, LD, NSE). Jinými nádorově specifickými markery jsou hormony a hormonální buněčné receptory (estrogenový a progesteronový receptor, receptor pro interleukin 2, HER2/neu a EGF). TM se využívají při diagnostice, stanovení prognózy a predikci onemocnění a sledování odpovědi na léčbu (VALÍK a kol. 2008).

Nevýhodou TM je jejich nízká specificita (zvýšené hodnoty mohou být například spjaty s jiným nádorovým onemocněním, prekancerózou či zánětlivým onemocněním) a citlivost (zvýšené hodnoty nejsou detekovány u všech nemocných, zejména v nižších stádiích). Výhodou je minimální invazivita a nízké finanční nároky (RACEK a kol. 1999).

2.3.3 ctDNA jako nový biochemický marker

V posledních letech se pozornost v oblasti nádorových markerů zaměřuje především na molekulárně genetické změny na úrovni nukleových kyselin pocházejících z nádorové tkáně (VALÍK a kol. 2008). Jedním z těchto markerů, do kterého jsou vkládány velké naděje, je právě ctDNA. Výhodou ctDNA, stejně jako u ostatních krevních markerů, je jednoduše zpracovatelný vzorek, který je možno odebrat v jakémkoliv odběrovém centru v místě bydliště pacienta a to i v krátkých časových intervalech. Další nesporné výhody jsou aplikovatelnost na všechny typy nádorů a možnost detekce všech molekulárně-genetických změn přítomných ve všech ložiskách v rámci jednoho odběru. Bohužel, nižší citlivost

vyšetření doposud nedovoluje její využití v primární diagnostice, ale význam se spatřuje v dlouhodobém monitorování průběhu onemocnění, návratu onemocnění a určení prognózy či volby a směru léčby (Obr. 9) (WIMBERGER a kol. 2011).



Obr. 9

Znázornění potencionálních aplikací využití ctDNA (převzato BETTEGOWDA a kol. 2014).

2.3.3.1 ctDNA a monitorování průběhu léčby (pooperační follow-up a sledování odpovědi na protinádorovou léčbu)

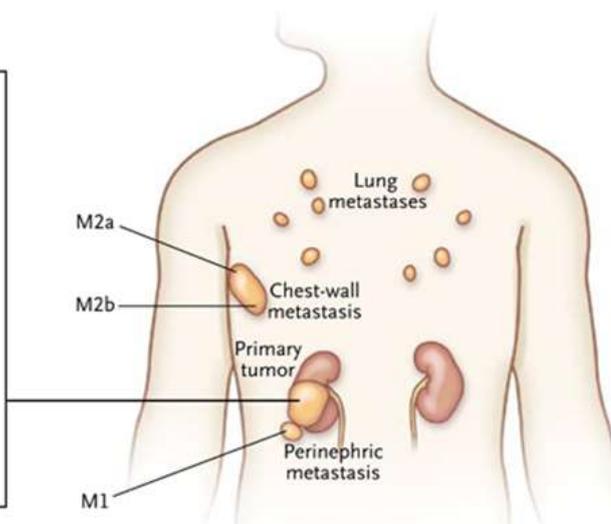
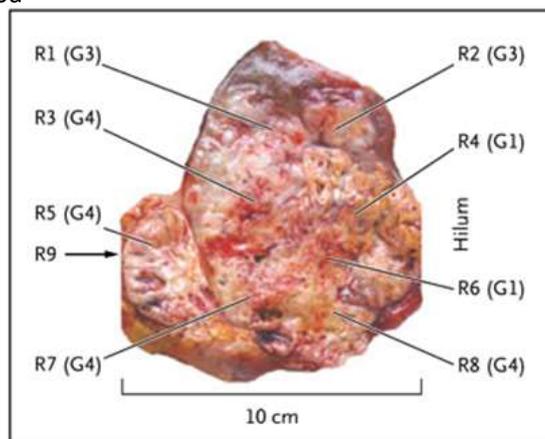
Doposud nejúčinnější terapií nádorového onemocnění je chirurgické odstranění ložiska s následným dlouhodobým sledováním a případným včasným záchytem nových lézí. V současnosti využívané citlivé zobrazovací metody založené na aplikaci kontrastních látek (CT, MR, PET) jsou finančně náročné a kapacitně omezené, časté opakování tedy není možné. Proto se obvykle využívají TM v kombinaci s UZ. Vyšetření ctDNA se dle dostupných poznatků ukazuje jako užitečný doplňkový nástroj, který zvyšuje citlivost včasného záchytu rekurence onemocnění (THIERRY a kol. 2014). Například ve studii Levého a kol. bylo popsáno několik pacientů s kolorektálním karcinomem, u nichž stanovení ctDNA vedlo k odhalení vzdálené metastázy dříve než při použití zobrazovacích metod a díky tomu došlo k prodloužení života pacienta. Také zde byly autory publikovány měnící se hladiny ctDNA u pacientů podstupujících resekční výkon s následnou terapií typu chemoterapie, radioterapie či paliace (LEVY a kol. 2012).

2.3.3.2 CtDNA a předpověď průběhu onemocnění na základě analýzy prognostických markerů

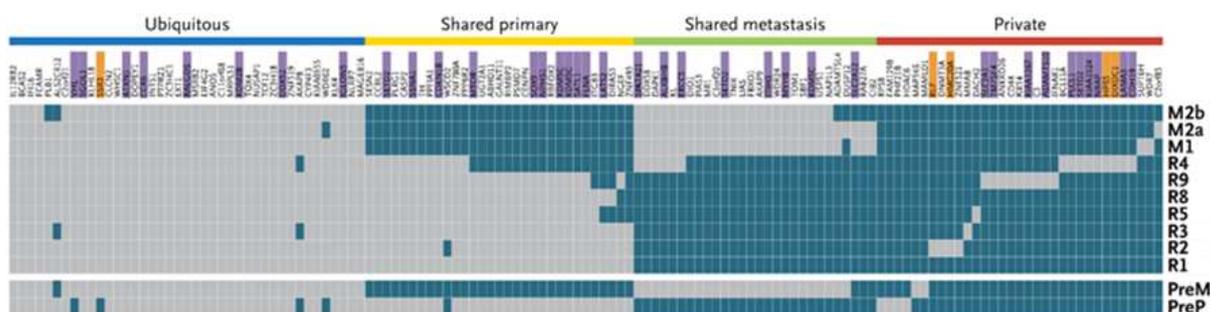
Stanovení prognózy onemocnění pomocí molekulárně-genetických analýz nádorové DNA je využíváno již několik let. Nejčastěji analyzované markery jsou mutace v genech *KRAS*, *BRAF* a *EGFR*, amplifikace *HER2/neu* a mikrosatelitová nestabilita. (VALÍK a kol. 2008). Pro tato vyšetření je však nutné získat vzorek nádoru a to obvykle pomocí invazivních metod jako je biopsie nebo operativní zákrok. V některých případech však takový odběr není možný, například z důvodu nevhodně umístěného ložiska nebo špatného celkového zdravotního stavu pacienta. I přesto, že je vzorek odebrán, nemusí být vyšetření úspěšné a to z toho důvodu, že analyzovaná DNA může být účinkem organických sloučenin používaných při přípravě fixovaného preparátu (parafínového bločku) degradována nebo modifikována díky deaminaci cytosinu a tím dojde k vzniku falešné positivity při mutačním vyšetření (QUACH a kol. 2004).

Zde se tedy opět nabízí vyšetření ctDNA. Kromě minimálního zatížení pacienta bez nutnosti získání nádorové tkáně, je hlavní předností to, že vzorek obsahuje všechny molekulárně biologické alterace obsažené v aktuálně přítomných ložiskách v těle pacienta na rozdíl od bioptického vzorku, kde díky genetické a epigenetické heterogenitě tumoru nemusí odebraná část nádoru obsahovat všechny existující DNA změny (Obr. 10) (GERLINGER a kol. 2012, HILEY a kol. 2014).

10a



10b



Obr. 10

Zobrazení genetické intratumorové heterogenity

Obr. 10a – chirurgicky vyjmutý karcinom rozdělený na několik částí a histologicky zhodnocený (G označuje stadium dysplazie – tzv. grade).

Obr. 10b - zastoupení stanovovaných mutací v jednotlivých částech nádorového ložiska a v metastázách (převzato GERLINGER a kol. 2012).

2.3.3.3 Prediktivní testování citlivosti či rezistence na protinádorovou terapii

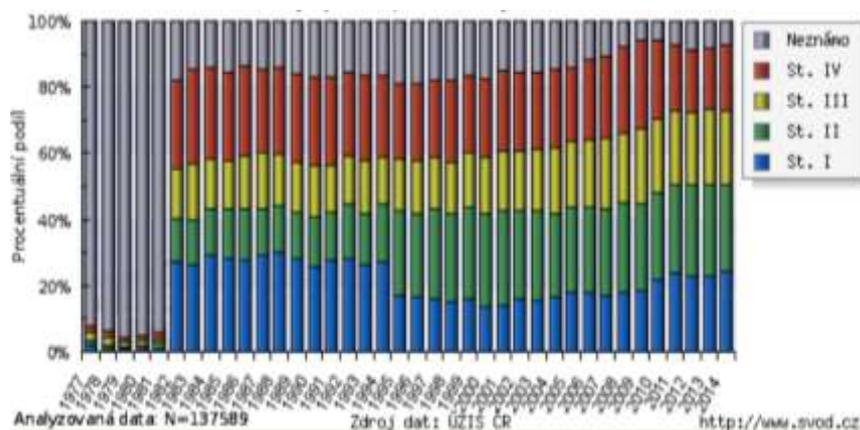
Jak již bylo řečeno, díky ctDNA je možné testovat molekulárně biologické vlastnosti nádoru. Jedním z nich jsou bodové mutace, jejichž detekci lze využít při odhadu odpovědi pacienta na cílenou biologickou léčbu a včasné zachycení rezistence na tuto léčbu, jako je tomu například u NSCLC (viz kap. 2.4.1.2) (HENEBERG 2011). Výhodou vyšetření ctDNA je jednak absence nutnosti získání tkáňového vzorku, který u těchto pacientů bývá často těžko dosažitelný, a jednak možnost opakovaných vyšetření a tedy podrobného sledování odpovědi na léčbu včetně časného záchytu případně vzniklé rezistence (DIEHL a kol. 2008b, MURTAZA a kol. 2013, MISALES a kol. 2012). To pak umožní okamžitou modifikaci léčby a oddálení progresu onemocnění.

2.3.4 Vybraná nádorová onemocnění a využití ctDNA

V této kapitole jsou popsána vybraná nádorová onemocnění, u kterých byla v této práci provedena detekce ctDNA.

2.3.4.1 Kolorektální karcinom (KK)

Kolorektální karcinom představuje celosvětový zdravotní problém, jedná se o nejčastěji diagnostikované nádorové onemocnění a celkově druhou nejčastější malignitu diagnostikovou u obou pohlaví v ČR. I přes zavedení populačního screeningu bezpříznakových jedinců nad 50 let v roce 2000 (ZAVORAL a kol. 2011) je toto onemocnění až v 50 % případů zachyceno ve IV. stádiu (Obr. 11), kdy jsou již přítomny vzdálené metastázy (DUSEK a kol. 2014).



Obr. 11

Vývoj zastoupení klinických stádií u pacientů s KK mezi roky 1977 a 2014 (www.svod.cz)

Jedinou nadějí u metastatického kolorektálního karcinomu na víceleté přežití či úplné vyléčení je kompletní chirurgické odstranění vzdálených metastáz, což je možné přibližně u padesáti procent případů (VAN CUTSEM a kol. 2006). V opačném případě se využívají tzv. lokální ablační metody, zejména radiofrekvenční ablace (RFA), která ale není zdaleka tak účinná (ABDALLA a kol. 2004) nebo systémová chemoterapie a cílená biologická léčba, kdy kombinací těchto dvou léčebných přístupů dojde k průměrnému prodloužení života pacienta o 2 roky (AMADO a kol. 2008).

Diagnostika kolorektálního karcinomu

Nejčastějším příznakem KK je krvácení do střevního traktu a jeho detekce je prvním diagnostickým krokem. Test okultního krvácení je jednoduchý, levný, zcela hrazený pojišťovnou a pacient si jej provádí sám v domácím prostředí. Jeho nevýhodou je nízká specifita i citlivost (FRIČ a ZAVORAL 2010).

Zlatým standardem v diagnostice kolorektálních maligních novotvarů je považována kolonoskopie (viz kap. 2.3.2.1). Ke sledování průběhu onemocnění se využívají TM, zejména glykoprotein produkovaný buňkami střevní sliznice (CEA a CA-19) (ZAVORAL a kol. 2011).

Uplatnění ctDNA u pacientů s kolorektálním karcinomem

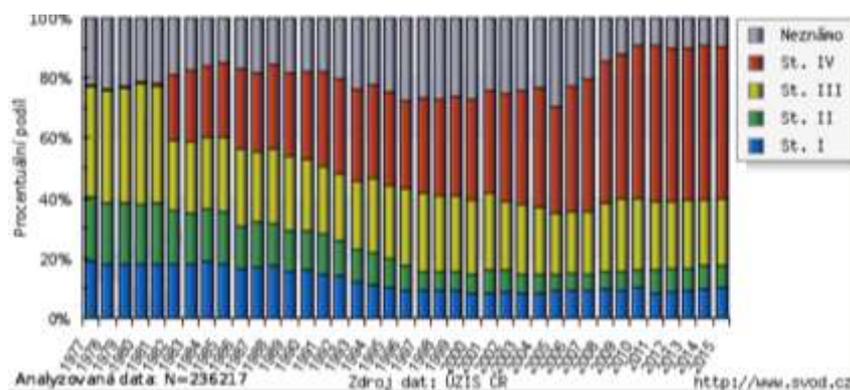
Vzhledem k velkému množství molekulárně biologických alterací vznikajících při vývoji KK (VOGELSTEIN A KINZLER 1999) je detekce ctDNA relativně dostupná a to až u 80 % pacientů, u kterých je přítomna jedna alespoň jedna z mutací v genech *KRAS*, *TP53*, *APC*, *BRAF* a *PIK3CA*. Díky své minimální invazivitě a možnosti častého opakování se ctDNA ukazuje jako slibný nástroj pro dlouhodobé pooperační sledování pacientů s metastatickým KK pro časný záchyt rekurence či progresu (SCHØLER a kol. 2017) nebo určení radikality resekce (úplnost odstranění ložiska) ihned po operaci (LEFEBURE a kol. 2010).

Další možnou aplikací vyšetření ctDNA je molekulárně genetická diagnostika přítomnosti mutací např. v onkogenech *KRAS* či *BRAF* u nedostupných tumorů pro indikaci cílené biologické léčby nebo sledování změn nádoru na molekulární úrovni v průběhu aplikace této terapie, zejména časného záchytu rezistentních mutací (DIEHL a kol. 2008b, MURTAZA a kol. 2013, MISALE a kol. 2012).

2.3.4.2 Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC)

Karcinom plic je třetím nejčastěji diagnostikovaným maligním onemocněním v ČR (www.uzis.cz), NSCLC tvoří osmdesát procent všech plicních karcinomů (SKŘIČKOVÁ a kol. 2012). K záchytu dochází v padesáti procentech případů ve stádiu IV (Obr. 12) (DUSEK a kol. 2014), kdy jsou již přítomny metastatická ložiska nacházející se nejčastěji v centrálním nervovém systému, kostech a játrech. (SKŘIČKOVÁ a kol. 2012).

Většina pacientů v pozdních stádiích je léčena kombinovanou chemoterapií s radioterapií a při pozitivním nálezu mutace v genu *EGFR* je indikována cílená léčba tyrozin kinázovými inhibitory (LYNCH a kol. 2004).



Obr. 12

Vývoj zastoupení klinických stádií u pacientů s karcinomem plic mezi roky 1977 a 2014 (www.svod.cz)

Diagnostika NSCLC

Mezi diagnostické metody patří rentgenový snímek plic doplněný o CT nebo MR, případně PET a bronchoskopie, při níž se odebírá nádorová tkáň a histologicky či cytologicky se definitivně potvrdí diagnóza. Výhodou cytologického vyšetření oproti histologickému je okamžité zpracování a odečtení výsledku v průběhu zákroku. Využívané TM jsou zejména CEA, cytokeratiny nebo neuron specifická enoláza. Jejich vysoké hladiny mohou pomoci odhalit recidivu onemocnění, nebo upozornit na skrytou diseminaci v počátečním stádiu onemocnění. (SKŘIČKOVÁ a kol. 2012)

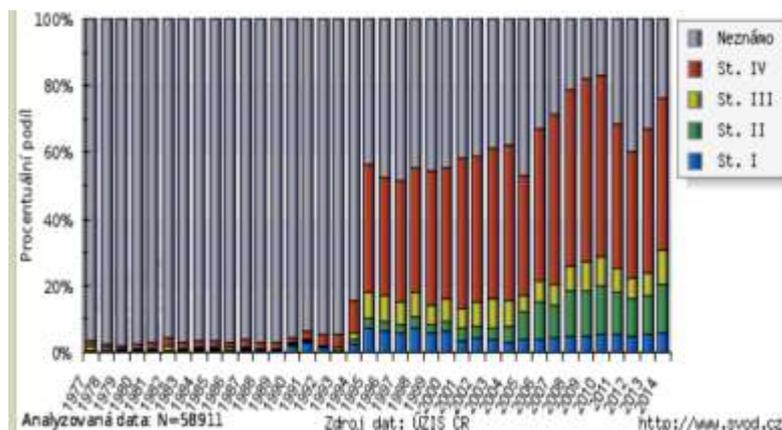
Uplatnění ctDNA u pacientů s NSCLC

U NSCLC lze analýzu ctDNA využít například pro molekulárně genetické vyšetření mutací v genu *EGFR* a na základě získaných výsledků indikovat cílenou biologickou léčbu zejména v případech, kdy nádor není přístupný pro získání bioptického vzorku. Další možnou aplikací je sledování odpovědi na podávanou biologickou léčbu pro včasné odhalení vznikajících rezistentních mutací (MURTAZA a kol. 2013). Hlavním úskalím případného dlouhodobého sledování průběhu onemocnění u pacientů s NSCLC je nízká frekvence výskytu základního panelu mutací v genech *EGFR*, *KRAS*, *TP53* a *BRAF* omezující využití detekce ctDNA pouze na malou část z nich (cca 50 %) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

2.3.4.3 Karcinom pankreatu (PDAC)

Karcinom pankreatu, zejména jeho nejčastější podtyp duktální adenokarcinom pankreatu (PDAC), je jednou z nejzákeřnějších diagnostikovaných malignit spočívající v absenci nebo nejasných příznacích vedoucích k pozdnímu stanovení diagnózy, kdy se onemocnění nachází již v neoperovatelné fázi s přítomností metastáz. Česká republika se v incidenci karcinomu pankreatu řadí na přední světové příčky a podle údajů z Českého

národního onkologického registru je většina pacientů diagnostikována v pozdním stádiu (stádium IV) (Obr. 13) (DUSEK a kol. 2014) .



Obr. 13

Vývoj zastoupení klinických stádií u karcinomu slinivky od roku 1977 do roku 2014 (www.svod.cz)

Život zachraňující řešení v léčbě PDAC je kompletní resekce tumoru s následnou adjuvantní chemoterapií obsahující gemcitabin. Neoperovatelným pacientům se podává taktéž gemcitabin v kombinaci s radioterapií, případně s cílenou biologickou léčbou, pro kterou je vyhrazen inhibitor tyrozin kináz Erlotinib, avšak s velice malým léčebným efektem (VENNELA a kol. 2012).

Diagnostika PDAC

Diagnostika PDAC je prováděna zejména pomocí CT nebo MR a endoskopické ultrasonografie (FNA-EUS), při níž je možné odebrat vzorek tkáně, který je posléze zhodnocen histologicky nebo cytologicky. Výhodou cytologického vyšetření je opět možné získání výsledku při zákroku, čímž se zvyšuje citlivost vyšetření a minimalizuje se počet vpichů nutných k získání validního vzorku (ELOUBEIDI a kol. 2003).

Mezi využívané TM patří antigeny CA19-9, CA242, CA50 a CA272-4, ale jejich citlivost je nízká a orgánově nespecifická. Jedná se spíše o prognostický marker, čemuž nasvědčují výsledky z publikací poukazující na to, že pacienti, u kterých se během neoadjuvantní terapie normalizovaly hodnoty antigenu CA19-9, vykazovali delší dobu přežití než pacienti, u nichž se hodnoty pouze snížily (MICKE a kol. 2003).

Z pohledu molekulárně biologických vlastností karcinomu slinivky bylo zjištěno, že až devadesát tři procent nemocných má v nádorové tkáni detekovanou mutaci v genu *KRAS* (BIANKIN a kol. 2012).

Uplatnění ctDNA u pacientů s PDAC

Jak je výše zmíněno, většina pacientů má přítomnou aktivační mutaci v genu *KRAS* a tento fakt lze využít k aplikaci vyšetření ctDNA. Ne vždy je totiž ložisko přístupné pro odběr reprezentativního vzorku nádorové tkáně. Kvůli tomu bývá histologické či cytologické zhodnocení vzorku velice složité. V tomto případě může přítomnost *KRAS* mutace v plazmě pacienta stoprocentně potvrdit diagnózu karcinomu pankreatu (SALEK a kol. 2007).

Další možné využití ctDNA u PDAC ve spojení s genem *KRAS* je stanovení prognózy, a to na základě nejnovějších studií, které ukazují, že samotná přítomnost ctDNA je prognosticky významná. Existují taktéž práce, které uvádí, že jednotlivé typy mutací *KRAS* odlišně ovlivňují downstream signální dráhy a tím celkové přežití pacientů s PDAC (IHLE a kol. 2012).

2.3.4.4 Přehled nejčastěji mutovaných genů u vybraných nádorových onemocnění

U výše uvedených onemocnění jsou často detekovány mutace v pro ně typických genech. Tato kapitola se věnuje vybraným genům, ve kterých jsem ve své diplomové práci stanovovala přítomnost mutací. V Tab. 2 je shrnuto procentuální zastoupení mutací ve vybraných genech u jednotlivých malignit podle databáze COSMIC.

Tab. 2

(<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)

Procentuální zastoupení mutací					
	KRAS	TP53	APC	BRAF	EGFR
kolorektální karcinom	34 %	43 %	43 %	10 %	-
nemalobuněčný karcinom plic	19 %	25 %	-	2 %	25 %
karcinom pankreatu	69 %	44 %	2 %	-	-

KRAS

Gen *KRAS* leží v oblasti chromozomu 12p12.1. Jeho délka je přibližně 46 kbp a obsahuje 6 exonů (www.genecards.org). Jeho proteinovým produktem je Ras neboli p21 protein o velikosti 189 aminokyselin. Tento malý GTP-vazebný protein lokalizovaný na vnitřní straně plazmatické membrány přenáší prostřednictvím transdukčních drah do jádra signály stimulující buněčný růst nebo inhibující apoptózu. Vyskytuje se ve dvou stavech, a to v inaktivním stavu ve vazbě s GDP a v aktivním stavu ve vazbě s GTP. Ve fyziologických podmínkách je Ras v inaktivním stavu, což zajišťují GAPs proteiny (GTPase Activating Proteins) indukující GTP hydrolýzu a tvorbu inaktivního komplexu Ras/GDP (MU a PENG 2004). Detekované mutace v nádorových buňkách způsobují permanentní aktivaci proteinu díky znemožnění hydrolýzy GTP navázaného na Ras. Na rozdíl od přirozeně aktivovaného Ras

proteinu, který je v krátké době opět inaktivován, zůstává mutovaná forma aktivována permanentně, což vede k rozsáhlé interakci s různými efekty. Tím se role mutovaného Ras proteinu stává v postižených buňkách mnohem komplexnější a kvantitativně rozdílnější než funkce Ras ve zdravých buňkách. Umožňuje nekontrolovaný růst a nádorovou transformaci (CASTAGNOLA a GIARETTI 2005). Ve většině případů jde o jednonukleotidové mutace v kodonech 12 a 13 (exon 2), v kodonech 59, 61 (exon 3) a kodonech 117 a 149 (exon 4). Bylo ukázáno, že konkrétní typ a pozice mutace v genu KRAS může mít vliv na prognózu, průběh onemocnění nebo odpověď na cílenou biologickou léčbu (IHLE a kol. 2012).

TP53

Gen *TP53* je tumor supresorový gen lokalizovaný na krátkém raménku sedmnáctého chromozómu, přesněji 17p13.1, je dlouhý 25 kbp a skládá se z 11 exonů (www.genecards.org). Jedná se o gen kódující protein p53, který odpovídá za regulaci vybraných genů působících např. na zástavu buněčné proliferace, apoptózu, opravy DNA a na změny metabolismu buňky. P53 je vazebný protein obsahující místo transkripční aktivace vazebné místo pro navázání DNA k aktivaci exprese proteinů a oligomerizační domény. Somatické mutace se vyskytují napříč všemi exony, ale nejčastěji se nacházejí v kodónech 175, 245, 248, 273 a 282. Mutace v genu *TP53* se nachází u různých nádorových onemocnění (LEA a kol. 2009). Stále dochází ke spekulacím o vlivu přítomnosti mutované formy *TP53* na účinnost chemoterapie (TCHELEBI a kol. 2014).

APC

Jedná se o gen lokalizovaný v oblasti 5q21-22 skládající se z 15 exonů a jeho přibližná velikost je 138 kbp (www.genecards.org). Kóduje tumor supresorový protein Apc, jehož hlavní funkcí je negativní regulace buněčného cyklu a inhibice buněčné proliferace. Dále působí na procesy související s buněčnou migrací a adhezí, transkripční aktivací a apoptózou (<http://www.genecards.org>). Zárodečný defekt proteinu způsobuje vznik Familiární adenomatózní polypózy (FAP). Somatická forma mutace se vyskytuje především u KK v exonu 15 v oblasti označované MCR (MCR = mutation cluster region) (BEROUD a SOUSSI 1996) a způsobuje vznik adenomu gradujícího až ve zhoubný nádor (VOGELSTEIN a KINZLER 1999). Uvádí se, že aberace genu *APC* se nachází v přibližně padesáti procentech sporadických adenomů a u šedesáti až osmdesáti procent sporadických kolorektálních karcinomů (BOLAND 2002).

BRAF

Onkogen *BRAF* je lokalizovaný v oblasti 7q34, skládá se z 18 exonů a délka dosahuje 208 kbp (www.genecards.org). Kóduje protein Braf, který je součástí rodiny serin-threonin kináz zahrnující Araf, Braf a Craf. Hraje důležitou úlohu v regulaci MAPK/ERK signální kaskády ovlivňující buněčné dělení, diferenciaci a apoptózu buňky. Nejčastěji detekovanou mutací je V600E v patnáctém exonu způsobující konstitutivní kinázovou aktivitu udržující protein B-Raf v permanentně aktivním stavu (DAVIES a kol. 2002). Mutace v genu *BRAF* se podílí na patogenezi velkého množství nádorů. U KK je nález mutace v genu *BRAF* spojován s významně horší prognózou onemocnění a špatnou odpovědí na terapii monoklonálními protilátkami (ROWLAND a kol. 2015), kdežto u melanomu je tato mutace spojována s pozitivní odpovědí na inhibitor kinázy Braf Vemurafenib (ARENBERGEROVÁ a PUZANOV 2012).

EGFR

Gen *EGFR* leží na krátkém raménku sedmého chromozomu, skládá se z 28 exonů a dosahuje délky 192 kbp (<http://www.genecards.org>). Kóduje membránově vázaný receptor pro epidermální růstový faktor (Egfr), který se řadí mezi tyrozin kinázy I a jeho hlavní funkcí je stimulace proliferace, diferenciaci, apoptózy, angiogeneze a pohybu buňky (ETTINGER 2006). Egfr protein se skládá ze tří částí: extracelulární, transmembránové a intracelulární s tyrozin kinázovou aktivitou. Aktivace Egfr nastává po navázání ligandu s následnou konformací a autofosforylací receptoru pomocí vazby ATP, posléze fosforyluje jeden z adaptérových proteinů, a to vede ke spuštění signální kaskády (SALOMON a kol. 1995).

Přítomnost mutace v genu *EGFR* vyskytující se u NSCLC lokalizované v exonech 18 – 21 je pozitivním prediktorem odpovědi na léčbu TK inhibitory (LYNCH a kol. 2004).

3 Cíle práce

Cílem mé diplomové práce bylo v návaznosti na bakalářskou práci dovést výzkum a vývoj metodiky pro vyšetřování ctDNA u tří nejčastějších typů nádorových onemocnění do stádia rutinního klinického testování.

Dílčí cíle:

1. Optimalizovat podmínky pro vyšetření volné nádorové DNA skládající se z:
 - optimalizace podmínek extrakce volné nádorové DNA ze vzorků plazmy
 - optimalizace podmínek analýzy vybraných somatických mutací ve vzorcích DNA izolovaných z plazmy.
2. Vyšetření a/nebo průběžné sledování hladin ctDNA u pacientů s kolorektálním karcinomem, nemalobuněčným karcinomem plic a duktálním adenokarcinomem slinivky a jejich klinické využití (záchyt rekurence, sledování odpovědi na léčbu, odhad prognózy) skládající se z:
 - analýzy panelů nejčastěji se vyskytujících somatických mutací na souboru 150 pacientů s KK, 139 pacientů s NSCLC a 50 pacientů s PDAC
 - detekce a stanovení hladin ctDNA u všech pacientů pozitivních na mutaci ve tkáni
 - korelace výsledků s radikalitou operace, rekurencí, progresí onemocnění či dobou přežití.

4 Materiál a metodika

4.1 Pacienti a vzorky

4.1.1 Pacienti

Do studie bylo zařazeno celkem 339 pacientů složených ze 150 pacientů s diagnózou KK ve stádiu III a IV, 139 pacientů s NSCLC ve stádiu IV a z 50 pacientů PDAC ve stádiu IV (Tab. 3). Uvedení pacienti podstoupili endoskopické vyšetření nebo operační zákrok, při kterých jim byly odebrány vzorky nádoru a následně vzorky periferní krve a to na třech klinických pracovištích: Vojenská fakultní nemocnice Praha (pacienti s KK a PDAC), Thomayerova nemocnice v Praze (pacienti s KK) a Fakultní nemocnice Plzeň (pacienti s NSCLC).

4.1.2 Vzorky

Vzorky nádorové tkáně KK byly získány během operace nebo kolonoskopického vyšetření a následně uchovávány při teplotě - 20°C. V případě nádorové tkáně pacientů s PDAC a NSCLC byly vzorky odebrány při endoskopickém vyšetření (gastroskopie nebo bronchoskopie) tenkojehlovou biopsií a ihned natřeny na cytologická skla. Následně byly fixovány, barveny a zhodnoceny zkušeným cytologem, který u každého z nich popisovačem vyznačil oblasti nádorových buněk. Takto fixované buňky byly uchovávány při teplotě 18 – 25°C.

Z 5 – 10 ml periferní krve byla separována plazma a uchovávána při teplotě - 20°C. Následně byly všechny vzorky transportovány za uvedených podmínek do laboratoře Genomac.

Tab. 3
Soubor pacientů analyzovaných v této práci

Koleorektální karcinom (KK)							Koleorektální karcinom (KK)							Karcinom slinivky břišní (PDAC)						
pořadové číslo pacienta	onačení vzorku	pohlaví	vzorek získaný při:	typ vzorku	stádium onemocnění	počet vzorků plazmy	pořadové číslo pacienta	onačení vzorku	pohlaví	vzorek získaný při:	typ vzorku	stádium onemocnění	počet vzorků plazmy	pořadové číslo pacienta	onačení vzorku	pohlaví	vzorek získaný při:	typ vzorku	stádium onemocnění	počet vzorků plazmy
1	F201	ž	operace	zmražená tkáň	III	4	76	Mc11	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	1	SL19	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
2	F202	m	operace	zmražená tkáň	IV	13	77	Mc16	ž	operace	zmražená tkáň	IV	4	2	SL23	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
3	F203	m	operace	zmražená tkáň	IV	5	78	Mc17	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	3	SL33	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
4	F204	m	operace	zmražená tkáň	IV	11	79	Mc18	m	operace	zmražená tkáň	IV	3	4	SL35	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
5	F212	m	operace	zmražená tkáň	III	1	80	Mc19	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	5	SL38	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
6	F216	ž	operace	zmražená tkáň	IV	7	81	Mc20	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	6	SL39	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
7	F217	m	operace	zmražená tkáň	III	8	82	Mc21	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	7	SL41	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
8	F219	m	operace	zmražená tkáň	IV	10	83	Mc22	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	8	SL43	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
9	F221	ž	operace	zmražená tkáň	IV	5	84	Mc24	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	9	SL51	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
10	F223	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	85	Mc26	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	10	SL54	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
11	F226	ž	operace	zmražená tkáň	III	2	86	Mc27	m	operace	zmražená tkáň	IV	3	11	SL57	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
12	F227	m	operace	zmražená tkáň	III	2	87	Mc28	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	12	SL58	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
13	F229	ž	operace	zmražená tkáň	III	5	88	Mc29	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	13	SL59	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
14	F230	m	operace	zmražená tkáň	III	6	89	Mc30	m	operace	zmražená tkáň	IV	4	14	SL61	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
15	F120	m	operace	zmražená tkáň	IV	3	90	Mc31	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	15	SL62	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
16	F239	m	operace	zmražená tkáň	III	4	91	Mc33	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	16	SL65	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
17	F243	m	operace	zmražená tkáň	IV	5	92	Mc35	m	operace	zmražená tkáň	IV	3	17	SL68	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
18	F244	ž	operace	zmražená tkáň	III	6	93	Mc38	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	18	SL69	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
19	F246	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	94	Mc39	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	19	SL71	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
20	F257	ž	operace	zmražená tkáň	III	4	95	Mc40	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	20	SL73	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
21	F264	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	96	Mc41	ž	operace	zmražená tkáň	IV	4	21	SL74	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
22	F267	m	operace	zmražená tkáň	IV	3	97	Mc43	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	22	SL75	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
23	F269	m	operace	zmražená tkáň	III	3	98	Mc45	m	operace	zmražená tkáň	IV	3	23	SL78	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
24	F276	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	99	Mc46	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	24	SL80	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
25	F278	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	100	Mc47	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	25	SL82	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
26	F283	m	operace	zmražená tkáň	III	4	101	Mc48	m	operace	zmražená tkáň	IV	5	26	SL95	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
27	F287	m	operace	zmražená tkáň	III	4	102	Mc49	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	27	SL102	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
28	F104	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	6	103	Mc52	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	28	SL104	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
29	F105	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	4	104	Mc53	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	29	SL105	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
30	F107	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	105	Mc55	ž	operace	zmražená tkáň	IV	3	30	SL106	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
31	F108	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	4	106	Mc57	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	31	SL111	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
32	F114	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	3	107	Mc58	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	32	SL114	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
33	F115	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	3	108	Mc59	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	33	SL115	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
34	F116	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	109	Mc61	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	34	SL118	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
35	F117	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	3	110	Mc62	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	35	SL119	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
36	F118	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	4	111	Mc63	ž	operace	zmražená tkáň	IV	6	36	SL126	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
37	F122	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	112	Mc65	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	37	SL129	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
38	F124	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	8	113	Mc67	m	operace	zmražená tkáň	IV	3	38	SL131	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
39	F126	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	114	Mc68	ž	operace	zmražená tkáň	IV	9	39	SL133	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
40	F129	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	115	Mc69	m	operace	zmražená tkáň	IV	1	40	SL134	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
41	F130	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	2	116	Mc70	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	41	SL146	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
42	F131	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	117	Mc36	m	operace	zmražená tkáň	IV	7	42	SL156	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
43	F134	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	118	Mc37	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	43	SL157	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
44	F139	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	119	Mc1	m	operace	zmražená tkáň	IV	6	44	SL166	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
45	F144	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	120	Mc23	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	45	SL167	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
46	F145	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	121	Mc74	m	operace	zmražená tkáň	IV	6	46	SL171	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
47	F146	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	2	122	Mc75	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	47	SL174	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
48	F151	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	123	KK1	ž	operace	zmražená tkáň	IV	4	48	SL175	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
49	F152	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	124	KK3	M	operace	zmražená tkáň	IV	2	49	SL178	m	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
50	F153	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	125	KK4	M	operace	zmražená tkáň	IV	4	50	SL182	ž	FNB EUS	cytologické sklo	IV	1
51	F154	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	126	KK5	ž	operace	zmražená tkáň	IV	1	Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC)						
52	F157	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	3	127	KK6	M	operace	zmražená tkáň	III	4	1	PCI1	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
53	F161	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	128	KK7	M	operace	zmražená tkáň	III	4	2	ZB2	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
54	F163	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	129	KK9	ž	operace	zmražená tkáň	III	4	3	M03	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
55	F164	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	130	KK10	M	operace	zmražená tkáň	III	4	4	LO4	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
56	F168	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	131	KK11	M	operace	zmražená tkáň	III	5	5	SE5	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
57	F169	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	132	KK12	M	operace	zmražená tkáň	III	4	6	JH6	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
58	F172	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	133	KK13	ž	operace	zmražená tkáň	III	4	7	ML7	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
59	F173	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	134	KK17	M	operace	zmražená tkáň	IV	2	8	MP8	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
60	F174	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	135	KK18	M	operace	zmražená tkáň	IV	1	9	B19	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
61	F176	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	136	KK20	M	operace	zmražená tkáň	IV	1	10	SV10	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
62	F177	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	137	KK36	M	operace	zmražená tkáň	III	3	11	KV12	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
63	F178	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	138	KK41	M	operace	zmražená tkáň	IV	2	12	KK13	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
64	F179	ž	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	139	KK46	ž	operace	zmražená tkáň	IV	3	13	SA14	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
65	F182	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	140	KK54	M	operace	zmražená tkáň	IV	2	14	KL15	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
66	F184	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	III	1	141	KK55	M	operace	zmražená tkáň	IV	1	15	BK18	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
67	F185	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	142	KK57	ž	operace	zmražená tkáň	IV	3	16	CS19	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
68	F186	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	143	KK58	M	operace	zmražená tkáň	IV	3	17	NJ22	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
69	F188	m	kolonoskopie	zmražená tkáň	IV	1	144	KK59	M	operace	zmražená tkáň	IV	1	18	KH23	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
70	Mc2	ž	operace	zmražená tkáň	IV	3	145	KK62	M	operace	zmražená tkáň	III	3	19	SG24	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
71	Mc3	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	146	KK63	ž	operace	zmražená tkáň	IV	2	20	LR26	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
72	Mc5	m	operace	zmražená tkáň	IV	10	147	KK64	M	operace	zmražená tkáň	IV	3	21	MM27	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
73	Mc6	m	operace	zmražená tkáň	IV	16	148	KK92	ž	operace	zmražená tkáň	IV	4	22	SS28	ž	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
74	Mc7	m	operace	zmražená tkáň	IV	6	149	KK86	ž	operace	zmražená tkáň	IV	4	23	CJ29	m	bronchoskopie	cytologické sklo	IV	1
75	Mc8	m	operace	zmražená tkáň	IV	2	150	KK118	ž	operace										

4.2 Izolace DNA

4.2.1 Izolace DNA ze vzorků nádoru

Přístroje

- Biohazardní box s UV světlem (Merci Biohazard, Francie)
- Inkubační blok s regulací teploty (VWR, USA)
- Minitřepačka UV3 (VWR, USA)
- Centrifuga s regulací času a otáček, 24 x 2 ml mikrozkušavky (Gyrozen, Korea)

Chemikálie:

JETQUICK Tissue DNA Spin Kit (Genomed, Německo)

- proteinase K (proteináza K)
- T1 buffer (lyzační pufr T1)
- T2 buffer (lyzační pufr T1)
- TX buffer (promývací pufr TX)
- T3 buffer (promývací pufr T3)
- Bezvodý ethanol (Penta, Česká republika)
- PCR Ultra H₂O (voda pro molekulárně biologické aplikace) (Top-Bio, Česká republika)

Veškeré práce jsem prováděla ve sterilním biohazardním boxu a s roztoky jsem manipulovala pomocí sterilních špiček s filtrem. V případě, že získaná DNA nebyla ihned použita k potřebným analýzám, skladovala jsem ji při -20°C.

Izolace DNA z tkáňových vzorků pomocí kitu JETQUICK Tissue DNA Spin Kit

Do 1,5 ml zkumavky jsem vložila vzorek tkáně, přidala 200 µl roztoku T1 a 25 µl proteinázy K (20 mg/ml), směs jsem pečlivě promíchala a nechala inkubovat přes noc při 56°C. Druhý den jsem přidala 200 µl roztoku T2, pečlivě promíchala a nechala inkubovat při 70°C 10 minut. Následně jsem přidala 200 µl ledového etanolu a ihned jsem vzorek důkladně protřepala. Po promíchání jsem směs opatrně přenesla na kolonku a centrifugovala (11000xg 1 min). Poté jsem na kolonku napipetovala 500 µl promývacího pufru TX, kolonku vložila opět do centrifugy a za stejných podmínek stočila. Následně jsem přidala 500 µl promývacího pufru T3 a stočila (13000xg 3 min). Nakonec jsem na membránovou kolonku nanasla 200 µl elučního roztoku (ultra čistá PCR voda) a centrifugovala (11000xg 1 min).

Izolace DNA z cytologických sklíček pomocí kitu JETQUICK Tissue (Genomed)

Skříčko jsem si položila na sterilní podložku v biohazardním boxu a pomocí sklápělu jsem uvolnila buňky v označené oblasti ze skla. Do 1,5 ml zkumavky jsem napipetovala 200 µl roztoku T1, z toho jsem odebrala 20 µl a nanesla na sklíčko, promíchala s uvolněným materiálem a špičkou přenesla zpět do zkumavky, ke směsi jsem přidala 25 µl proteinázy K, promíchala a nechala inkubovat 1 hodinu při 56°C. Po inkubaci jsem přidala 200 µl vazebného pufru T2 promíchala a dala inkubovat 10 minut při 70°C. Další postup je shodný s izolací z tkáňového vzorku. DNA jsem eluovala 80 µl ultra čistou PCR vodou.

4.2.2 Optimalizace izolace cfDNA

Přístroje

- Biohazardní box s UV světlem (Merci Biohazard, Francie)
- Inkubační blok s regulací teploty (VWR, USA)
- Minitřepačka UV3 (VWR, USA)
- Centrifuga s regulací času a otáček, 24 x 2 ml mikrozukavky (Gyrozen, Korea)

Před samotnou izolací ctDNA jsem plazmu rozmrazila. Veškeré práce jsem prováděla ve sterilním biohazardním boxu, s roztoky jsem manipulovala pomocí sterilních špiček s filtrem. V případě, že jsem získanou ctDNA ihned nevyužila k potřebným analýzám, skladovala jsem ji při -20°C. Vzhledem k velice nízkým výtěžkům izolované ctDNA a pro zachování dostatečného množství pro následné analýzy jsem neprováděla ověření její koncentrace a kvality.

Izolace cfDNA z plazmy pomocí kolonkového kitu QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit

Chemikálie

QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Německo)

- proteinase K (proteináza K)
- ACB buffer (lyzační pufr ACB)
- ACL buffer (lyzační pufr ACL)
- ACW1 buffer (promývací pufr ACW1)
- ACW2 buffer (promývací pufr ACW2)
- Bezvodý ethanol (Penta, Česká republika)
- Isopropanol 100% (Lach:ner, Česká republika)

- PCR Ultra H₂O (voda pro molekulárně biologické aplikace) (Top-Bio, Česká republika)

Do sterilní 2 ml zkumavky jsem napipetovala 600 µl rozmražené plazmy, posléze jsem přidala 480 µl pufr ACL a 60 µl Proteinázy K. Směs jsem řádně promíchala a inkubovala při 60°C 30 minut. Po inkubaci jsem zkumavku krátce zcentrifugovala a přidala 1080 µl pufru ACL, promíchala a inkubovala 5 minut na ledu. Následně jsem lysát přenesla na membránovou kolonku a centrifugovala (8600xg 1 min.), tento krok jsem opakovala, dokud nebyl celý přefiltrován. Po kompletním přefiltrování lyzátu jsem na kolonku nanasla 600 µl promývacího pufru ACW1 a centrifugovala (8600xg 1 min.), posléze jsem přidala 750 µl promývacího pufru ACW2 a opět centrifugovala za stejných podmínek jako u roztoku ACW1. Posledním roztokem byl bezvodý etanol a to v objemu 750 µl, opět jsem kolonku centrifugovala (8600xg 1 min), následně jsem provedla opětovnou centrifugaci (14 000xg 3min.). Na konec jsem přesunula kolonku do čisté, řádně označené 1,5 ml zkumavky a na membránu kolonky napipetovala 30 µl elučního roztoku a centrifugovala (14000xg 1 min).

Izolace cfDNA z plazmy pomocí kolonkového kitu NucleoSpin® Plasma XS

Chemikálie

NucleoSpin® Plasma XS (Machery Nagel, Německo)

- proteinase K (proteináza K)
- Binding buffer BB (vazebný pufr BB)
- Wash buffer WB (promývací pufr WB)
- Proteinase buffer PB (ředící pufr PB pro proteinázu K)
- PCR Ultra H₂O (voda pro molekulárně biologické aplikace) (Top-Bio, Česká republika)

Do sterilní 2 ml zkumavky jsem napipetovala 600 µl rozmražené plazmy a 30 µl proteinázy K, směs jsem důkladně promíchala a nechala inkubovat při 37°C 10 minut. Poté jsem ke směsi přidala 900 µl pufru BB, zkumavku jsem 3x přetočila, důkladně promíchala na vortexu a krátce zcentrifugovala. Následně jsem přenesla lysát na kolonku a centrifugovala (4600xg 30 s), poté jsem otáčky na centrifuze přenastavila a centrifugovala (10700xg 5 s), tento krok jsem opakovala, dokud nebyl lysát kompletně přefiltrován. Poté jsem napipetovala 500 µl promývacího pufru WB a centrifugovala (10700xg 30 s), opět jsem přidala 250 µl promývacího pufru WB a centrifugovala (10700xg 3 min). Po centrifugaci jsem kolonku vložila do sterilní 1,5ml zkumavky, na membránu jsem napipetovala 30 µl elučního

roztoku a centrifugovala (10700xg 30 s). Aby došlo k odstranění přebytečného etanolu, nechala jsem eluční frakci inkubovat 8 min při 90°C, poté jsem doplnila frakci elučním roztokem do původního objemu 30 µl.

Izolace ctDNA z plazmy pomocí cobas® cfDNA Sample Preparation Ki)

Chemikálie

Cobas® cfDNA Sample Preparation Kit (Roche, Německo)

- proteinase K (proteináza K)
- pufr DNA PBB
- Izopropanol 100% (Lach:ner, Česká republika)
- pracovní roztok WB I
- pracovní roztok WB II
- PCR Ultra H₂O (voda pro molekulárně biologické aplikace) (Top-Bio, Česká republika)

Do 15 ml zkumavky jsem napipetovala 2 ml plazmy, 250 µl Proteinázy K a 2 ml pufru DNA PBB a inkubovala 30 min při laboratorní teplotě. Poté jsem ke směsi přidala 500 µl isopropanolu přenesla lyzát do označené jednotky HPEA FT (50 ml kónická zkumavka se zabudovanou kolonkou) a centrifugovala (4000xg 5 min). Po dokončení centrifugace jsem vyjmula kolonku a vložila do sběrné zkumavky. Následně jsem přidala 500 µl pracovního roztoku WB I a centrifugovala (8000xg 1 min), poté napipetovala 500 µl roztoku WB II a centrifugovala (8000xg 1 min). Po výměně sběrné zkumavky jsem kolonku opět centrifugovala (20000xg 1 min), aby došlo k vysušení membrány kolonky. Nakonec jsem přesunula kolonku do čisté, řádně označené 1,5 ml zkumavky a napipetovala na membránu 100 µl elučního roztoku a zcentrifugovala (8000xg 1 min).

Izolace ctDNA z plazmy pomocí kolonkového kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit

Chemikálie

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Německo)

- proteinase K (proteináza K)
- AL buffer (lyzační pufr AL)
- AW1 buffer (promývací pufr AW1)
- AW2 buffer (promývací pufr ACW2)
- Bezvodý ethanol (Penta, Česká republika)

- PCR Ultra H₂O (voda pro molekulárně biologické aplikace) (Top-Bio, Česká republika)

Do sterilní 2 ml zkumavky jsem napipetovala 600 µl rozmražené plazmy, 600 µl pufru AL a 50 µl Proteinázy K. Směs jsem řádně promíchala a inkubovala 10 min 56°C. Poté jsem zkumavku krátce centrifugovala a přidala 600 µl ledového etanolu, směs jsem promíchala a krátce centrifugovala, lyzát přenesla na membránovou kolonku a opět centrifugovala (8000xg 1 min), tento krok jsem opakovala, dokud nebyl kompletně přefiltrován. Následně jsem na kolonku nanesla 500 µl promývacího pufru AW1 a centrifugovala (8000xg 1 min), posléze jsem přidala 500 µl promývacího pufru AW2 a opětovně centrifugovala (14000xg 3 min). Nakonec jsem kolonku vložila do sterilní, řádně označené 1,5 ml zkumavky a na membránu nanesla 30 µl elučního roztoku a centrifugovala (8000xg 1 min).

4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přístroje

- Sterilní box PCR Cabinet (ESCO, Rakousko)
- Minitřepačka UV3 (VWR, USA)
- Minicentrifuga Mini Star (VWR, USA)
- Termocyklér C1000™ Touch a C1000™ (Bio-Rad, USA)

Chemikálie

- PPP Master Mix + Mg²⁺ (Top-Bio, Česká republika)
- Primer left (Sigma Aldrich, Německo)
- Primer right (Sigma Aldrich, Německo)
- PCR Ultra H₂O (voda pro molekulárně biologické aplikace) (Top-Bio, Česká republika)

Připravila jsem si PCR reakční směs sestávající se ze směsi fluorescenčně značeného primeru, neznačeného primeru, Master Mixu obsahujícího hořčík, Taq DNA polymerázy, dATP, dCTP, dGTP a dTTP a rozpipetovala do 0,2 ml mikrozkušavek pomocí sterilních špiček s filtrem. Stanovené množství DNA jsem přidávala za použití sterilních špiček s filtrem ve sterilním boxu. Při každé reakci jsem kromě neznámých vzorků amplifikovala i tři kontrolní produkty, kde jsem jako templát použila DNA neobsahující mutaci ve sledovaném úseku (tzv. negativní kontrola), DNA se známou mutací (tzv. mutantní, neboli pozitivní kontrola) a PCR H₂O (tzv. blank kontrola). Připravenou PCR směs jsem opatrně promíchala, krátce

zcentrifugovala, vložila do termocykléru a spustila příslušný program. Výsledné PCR produkty jsem detekovala pomocí DCE.

4.3.1 PCR z nádorové DNA

Při PCR nádorové DNA jsem amplifikovala vybrané úseky protoonkogenů a tumor supresorových genů, ve kterých se u daného nádorového onemocnění nejčastěji vyskytují somatické mutace (tzv. markery) (Tab. 4). PCR podmínky pro jednotlivé markery jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 4

Vybrané úseky genů pro jednotlivá nádorová onemocnění

gen	exon	marker	analyzované kodóny	nádorová onemocnění
<i>KRAS</i>	2	KRAS	18-20	KK, PDAC
<i>TP53</i>	5	APC1	170-187	KK
	6	APC2	187-224	
	7	APC3	225-261	
	8	APC4	262-307	
<i>APC</i>	15	TP53-ex5	854-896	KK
		TP53-ex6	1275-1308	
		TP53-ex7	1290-1335	
		TP53-ex8	1389-1446	
<i>BRAF</i>	15	BRAF	583-612	KK
<i>EGFR</i>	19	EGFR-ex19	729-761	NSCLC
	21	EGFR-ex20	824-875	

Tab. 5

Primery a amplifikační podmínky pro jednotlivé markery

marker	sekvence primerů		složky amplifikační směs		podmínky teplotního cyklování				
	levý primer (na 5' obsahuje značku FI nebo Tamra)	pravý primer	složka	objem	Teplota	čas	počet cyklů	teplota annealingu	
KRAS	ATGACTGAATATAAACTTGTG	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCCGCCGTA CCTCGCTTAGTGCTCCCT	PPP Master Mix + Mg2+ Primer levý (5μmol) Primer pravý (5μmol) PCR ultra H2O DNA templát	5 μl				54°C	
APC1	CAGCCTCAAAGGCTGCCACT	CGGGCGGGGGCGGGGACGGGCGGGGGCGCGCGGGCGTTTATTTCTGCTATTTGCAAGG						54°C	
APC2	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCCGCCCGCTGTTCAAGAGACCCCACTCATGT	TCTCTTTTCAAGTAGGTGCTT						54°C	
APC3	CAGACGACACAGGAAGCAGA	CGGGCGGGGGCGGGGACGGGCGGGGGCGCGCGGGCGTCTGGATTTGGTTCTAGGG			1 μl	95°C	5 min	1x	62°C
APC4	TCTGTCACTTCACTTATAGTTTGA	CGGGCGGGGGCGGGGACGGGCGGGGGCGCGCGGGCGAGCTGTTGAGGAGGTGGTG			1 μl	94°C	30 s	35x	62°C
TP53-ex5	CTCTGTCTCCTCTCTCC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCCGCCCGTGCAGCTGTGGTTGATT			1 μl	viz teplota annealingu	30 s		66°C
TP53-ex6	GGCCTCTGATTCCTCACTGA	CGGGCGGGGGCGGGGACGGGCGGGGGCGCGCGGGCGCCA GAGACCCAGTTGCAAA			2 μl	72°C	1 min	61°C	
TP53-ex7	TTGGGCTGTGTTATCTCT	CGGGCGGGGGCGGGGACGGGCGGGGGCGCGCGGGCGTGTGCAAGGTGGCAAGT			1 μl	72°C	10 min	1x	61°C
TP53-ex8	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCCGCCCGGTGAGGCTCCCTTTCTTG	ATCCTGAGTAGTGGTAATCT				15°C	∞	1x	61°C
BRAF	TTCATGAAGACCTCACAGTAAAA	CGGGCGGGGGCGGGGACGGGCGGGGGCGCGCGGGCGCCA AAAATGGATCCA GACA							59°C
EGFR-ex19	CATGTGGACCACTCACACA	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCCGCCCGCCATGGCCATCTACAAG							60°C
EGFR-ex21	TGCCTCTTGTGATGGTAT	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCCGCCCGAGCCAAGAACTACTGGTGA							60°C

4.3.2 Optimalizace amplifikačních podmínek pro cfDNA

Při optimalizaci amplifikace ctDNA jsem měnila vstupní objemy templátové DNA a celkový objem PCR reakce (Tab. 6).

Tab. 6

Přehled objemů reagensů

reagencie	objem			
	10 μ l		20 μ l	
PPP Master Mix + Mg ²⁺	5 μ l	5 μ l	10 μ l	10 μ l
Primer levý	1 μ l	1 μ l	2 μ l	2 μ l
Primer pravý	1 μ l	1 μ l	2 μ l	2 μ l
PCR Ultra H ₂ O	2 μ l	0 μ l	4 μ l	0 μ l
DNA templát (ctDNA)	1 μ l	3 μ l	2 μ l	6 μ l

4.3.3 PCR za použití cfDNA jako templátu

Amplifikaci cfDNA jsem u každého pacienta prováděla pouze u toho markeru, ve kterém jsem detekovala mutaci v DNA z nádorové tkáně. Tu jsem použila jako pozitivní kontrolu se značeným primerem fluorescenční značkou TAMRA.

4.4 Tvorba heteroduplexů s následnou separací pomocí denaturační kapilární elektroforézy (DCE)

Přístroje

- Teplotní cyklér C1000™ Touch a C1000™ (Bio-Rad, USA)
- DNA analyzátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA)
- Minicentrifuga Mini Star (VWR, USA) Centrifuga Universal 32 s regulací času a otáček (Hettich, Německo)

Chemikálie

- Demineralizovaná voda (Watrex, Česká republika)
- Kontrolní PCR produkty (Genomac, Česká republika) (Tabulka 4.7)
- CE Running Pufr (Carolina Biosystems, Česká republika)
- POP-7™ polymer (Carolina Biosystems, Česká republika)

Počítačový program

- Data Collection Version 2.0 (Applied Biosystems, USA)

Po skončení amplifikačního programu jsem na teplotním cykléru nastavila parametry pro tvorbu heteroduplexů (Tab. 7) a spustila. Za těchto podmínek dochází k denuraci dvouřetězcových molekul a k jejich následné pomalé reasociaci a to buď za tvorby původních molekul (tzv. homoduplexů) a nebo tvorby tzv. heteroduplexů, tedy molekul složených ze dvou různých jednořetězců (s mutací a bez mutace) (viz Obr. 5b kap. 2.2.3).

Tab. 7

Teplotní profil heteroduplexního programu

teplotní profil heteroduplexního programu			
Teplota	čas	ramp	počet cyklů
95°C	8 min		1x
65°C	30 min	0,10°C/s	
15°C	∞		

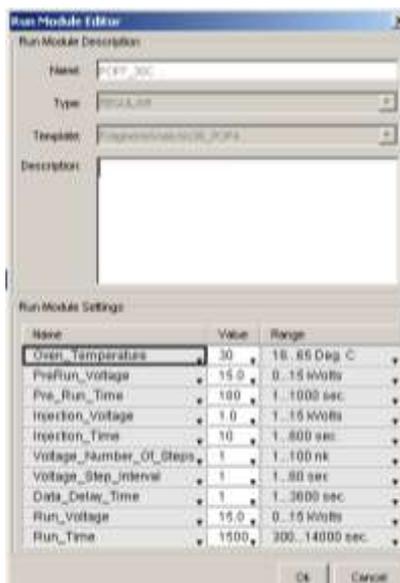
4.4.1 DCE analýza PCR produktů z nádorové DNA

PCR amplifikáty neznámých vzorků, pozitivních, negativní kontrol a blank kontrol jsem 10x naředila do jednotlivých jamek v 96-ti jamkové destičce za pomoci deionizované vody do celkového objemu 10 µl. Do všech jamek obsahujících naředěné PCR produkty jsem přidala 1 ul standardní příslušné pozitivní kontroly značené Tamrou a pomocí špičky promíchala. Následně jsem destičku krátce zcentrifugovala, aby došlo k odstranění případných bublin a dávkovala na DNA analyzátor dle parametrů uvedených na Obr. 14., kdy každý marker má své specifické teplotní podmínky (Tab. 8).

Tab. 8

Nastavení teploty pro jednotlivé markery na DNA analyzátoru

název markeru	teplota
KRAS	51°C
APC1	48°C
APC2	48°C
APC3	52°C
APC4	48°C
TP53-ex5	58°C
TP53-ex6	52°C
TP53-ex7	52°C
TP53-ex8	56°C
BRAF	48°C
EGFR-ex19	53°C
EGFR-ex21	56°C



Obr. 14

Nastavení DNA analyzátoru vyjma teploty (Oven Temperature) uvedené v Tab. 8

4.4.2 Optimalizace DCE analýzy PCR produktů z cfDNA

Optimalizaci DCE jsem prováděla na PCR amplifikátu genu KRAS z cfDNA a to za měnících se podmínek dávkování, konkrétně času (injection time) a napětí (injection voltage) (Tab. 9). Ostatní parametry separačních podmínek zůstaly zachovány (Obr. 14).

Tab. 9

Přehled testovaných nastavení na DNA analyzátoru

parametry přístroje													
injection voltage	3kV	3kV	4kV	4kV	4kV	4kV	5kV	5kV	5kV	6kV	6kV	8kV	10kV
injection time	10s	20s	20s	30s	40s	50s	30s	40s	50s	50s	70s	80s	100s
teplota	51°C												

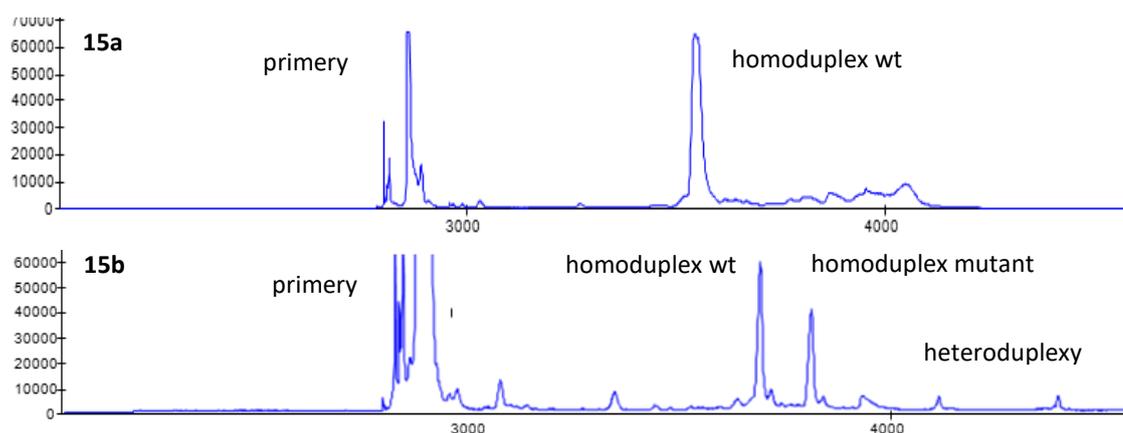
4.5 Vyhodnocení výsledků

4.5.1 Vyhodnocení elektroferogramů

Počítačový program

- Gene Marker[®], verze 4.2.2 (SoftGenetics, USA)

V případě, že elektroferogram ukazoval přítomnost pouze jednoho píku (homoduplex wt), vzorek jsem vyhodnotila jako negativní, to znamená, že nebyla přítomna mutace v detekovaném úseku daného genu. V případě, že byly na elektroferogramu viditelné čtyři píky (homoduplex wt, homoduplex mutant, 2 x heteroduplex), vzorek jsem vyhodnotila jako pozitivní. (Obr. 15)



Obr. 15

Ukázka výsledku elektroferogramy genu KRAS

15a – negativní výsledek

15b – přítomnost mutace v genu KRAS = pozitivní výsledek

4.5.2 Stanovení citlivosti záchytu mutantní alely

Pomocí tohoto stanovení jsem zjišťovala, jaké nejnižší procento mutantní alely ve vzorku jsem schopna detekovat optimalizovanými postupy. Prováděla jsem to na komerčně dodávaných kontrolních vzorcích o známém procentuálním podílu mutované frakce (Tab. 10). Test byl proveden na třech vybraných markerech (KRAS, EGFR exon 19 a 21).

Tab. 10
Použité standardy

KRAS		EGFR exon 19		EGFR exon 21	
mutantní frakce	název vzorku (dodavatel)	mutantní frakce	název vzorku (dodavatel)	mutantní frakce	název vzorku (dodavatel)
25%	standard KRAS (Horizont)	25%	delEGFR 19 (Biocept)	25%	standard L858R (Horizont)
10%		10%		10%	
5%		5%		5%	
1%		1%		1%	
		0,60%			
		0,20%			

4.5.3 Stanovení procentuálního zastoupení mutantní frakce (PMF)

Počítačový program

- Gene Marker[®], verze 4.2.2 (SoftGenetics, USA)

Na základě výsledků DCE jsem zhodnotila procentuální zastoupení mutantní frakce (PMF), pro tento krok jsem použila vzorec zohledňující plochy detekovaných píků (Rovnice 1).

Rovnice 1

Výpočet procentuálního zastoupení mutované frakce (PMF)

Výpočet PMF je založen na odečtu plochy píku z elektroferogramu. A_{homMUT} odpovídá detekovanému mutovanému homoduplexu a A_{homWT} homoduplexu nemutovanému. A_{het1} a A_{het2} zastupují detekované heteroduplexy. Celá rovnice je vynásobena číslicí 100, aby výsledek odpovídal procentům.

$$\text{PMF} = \frac{A_{\text{homMUT}} + \frac{A_{\text{het1}} + A_{\text{het2}}}{2}}{A_{\text{homMUT}} + A_{\text{homWT}} + A_{\text{het1}} + A_{\text{het2}}} * 100$$

4.5.4 Zhodnocení radikality resekce

Radikalita operace byla určena patologem na základě zhodnocení resekčních okrajů histologického preparátu. Jako R0 byla označena úplná resekce bez přítomnosti makroskopického či mikroskopického zbytku tumoru. Minimální vzdálenost nádorových buněk od resekční linie byla v případě R0 resekce > 0 mm. Makroskopicky neúplné resekce byly označeny jako R2 (LEFEBURE a kol. 2010). Radikalita resekce byla korelována s přítomností ctDNA před operací a po operaci u pacientů s diagnózou KK, u kterých byly operovány jaterní metastáze.

4.5.5 Zhodnocení přežití

Počítačový program

- MedCalc® Statistical software v 12.1.4

Prognózu onemocnění jsem analyzovala u pacientů s diagnózou PDAC s pozitivním nálezem mutace v genu *KRAS* v ctDNA. Abych mohla tuto analýzu provést, bylo nutné získat informace o přežití, na základě dostupných dat jsem vytvořila skupiny 21 pacientů s pozitivní *KRAS* mutací v ctDNA a 22 pacientů s negativním nálezem *KRAS* v ctDNA. Pomocí Kaplan-Meierovy metody jsem sestrojila křivky přežití a porovnála pomocí log-rank testu za využití softwaru MedCalc. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0.05$.

5 Výsledky

5.1 Optimalizace metodiky

Optimalizací metodiky analýzy ctDNA jsem chtěla docílit co nejcitlivějšího záchytu mutantní frakce ve vzorku plazmy. Prvním krokem bylo vybrat jednu ze čtyř izolačních souprav s co nejvyšším výtěžkem cfDNA a zároveň i co nejvyšším zastoupením ctDNA (mutované alely). Následně jsem optimalizovala amplifikační podmínky vybraných úseků protoonkogenů a tumor supresorových genů, a to modifikací objemů templátové DNA a celé reakční směsi. Dále jsem optimalizovala detekci PCR produktů pomocí DCE. V tomto případě jsem změnila nastavení parametrů přístroje pro zvýšení citlivosti analýzy. Nakonec jsem provedla test citlivosti celé metodiky na vzorcích o známých zastoupeních mutantní frakce.

5.1.1 Optimalizace izolace ctDNA

Optimalizaci jsem prováděla na čtyřech vzorcích plazmy pacientů s pokročilým KK, jejichž tkáňový vzorek byl pozitivní na přítomnost mutace v genu *KRAS*. Čtyřmi komerčně dodávanými soupravami jsem vyizolovala cfDNA, provedla analýzu genu *KRAS* exonu 2 a vyhodnotila zastoupení mutantní frakce DNA. Izolační kit, pomocí kterého byla získána DNA s nejvyšším zastoupením mutantní frakce, byl hodnocen jako nejlepší (Tab. 11).

Tab. 11
Výsledky optimalizace izolačních kitů

název izolačního kitu	označení izolačního kitu	procentuální zastoupení mutantní frakce			
		vzorek č. 1	vzorek č. 2	vzorek č. 3	vzorek č. 4
QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit	K1	29%	30%	19%	0%
NucleoSpin® Plasma XS	K2	25%	27%	14%	0%
Cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	K3	27%	28%	19%	0%
QIAamp DNA Blood Mini Kit	K4	0%	0%	0%	0%

Nejvyšší zastoupení mutantní frakce bylo dosaženo pomocí izolačního kitu K1. V případě kitu K4 nebyla detekována nádorová frakce vůbec a u kitu K2 a K3 bylo sice získáno celkové množství DNA srovnatelné s kitem K1, ale poměr mutantní DNA byl nižší. Pro další postupy jsem vybrala kit K1.

5.1.2 Optimalizace amplifikačních podmínek

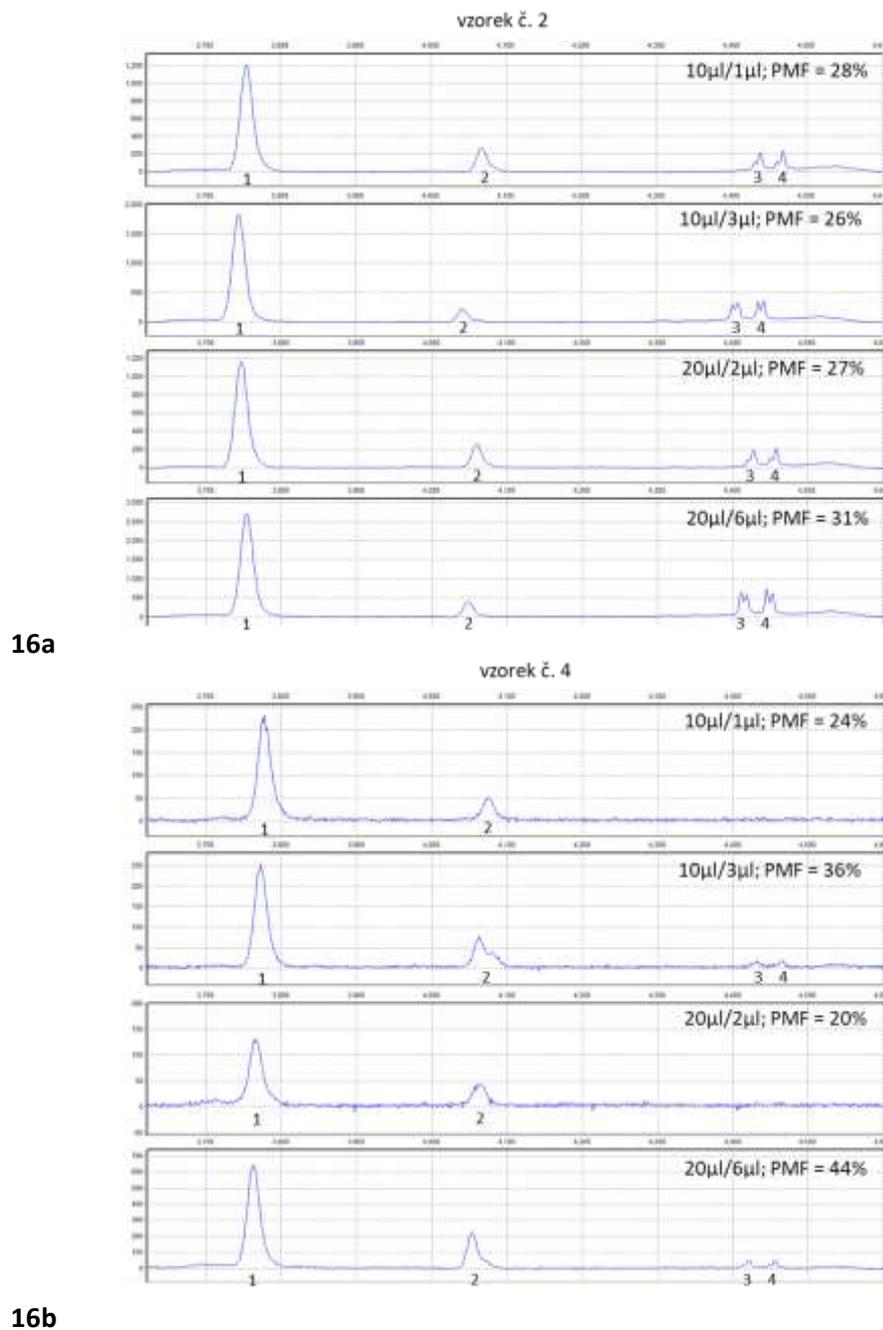
Vzhledem k obecně velmi nízkým výtěžkům izolované cfDNA z hlediska koncentrace i celkového objemu bylo třeba nalézt takové podmínky, při kterých dochází k amplifikaci produktu a zároveň je spotřeba vzorku co nejnižší. Při optimalizaci jsem tedy použila dva různé objemy reakční směsi (10 a 20 μl) a dva objemy templátové DNA pro každou reakční směs – 1 a 3 μl a 3 a 6 μl . Test jsem provedla na šesti vzorcích cfDNA izolovaných kitem K1. Výsledky jsem vyhodnotila opět na základě poměru mutované frakce (Tab. 12 a Obr. 16).

Tab. 12

Výsledky optimalizace amplifikačních podmínek

objem PCR	Procentuální zastoupení mutantní frakce			
	10 μl		20 μl	
objem ctDNA do reakce	1 μl	3 μl	2 μl	6 μl
vzorek č. 1	37%	37%	36%	36%
vzorek č. 2	26%	35%	30%	41%
vzorek č. 3	28%	26%	27%	31%
vzorek č. 4	24%	36%	20%	44%
vzorek č. 5	18%	25%	25%	29%
vzorek č. 6	16%	18%	16%	25%

Na základně vypočtené mutantní frakce jsem vyhodnotila jako optimální reakční objem 20 μl a objem templátové DNA 6 μl .



Obr. 16

Ukázka elektroferogramů dvou vybraných vzorků s rozdílnými výtěžky cfDNA za různých amplifikačních podmínek (objem reakční směsi/objem templátové DNA), 1- homoduplex wild type, 2 – homoduplex mutant, 3, 4 – heteroduplexy.

16a vzorek č. 2 (vyšší výtěžek cfDNA)

16b vzorek č. 4 (nižší výtěžek cfDNA)

5.1.3 Optimalizace podmínek DCE

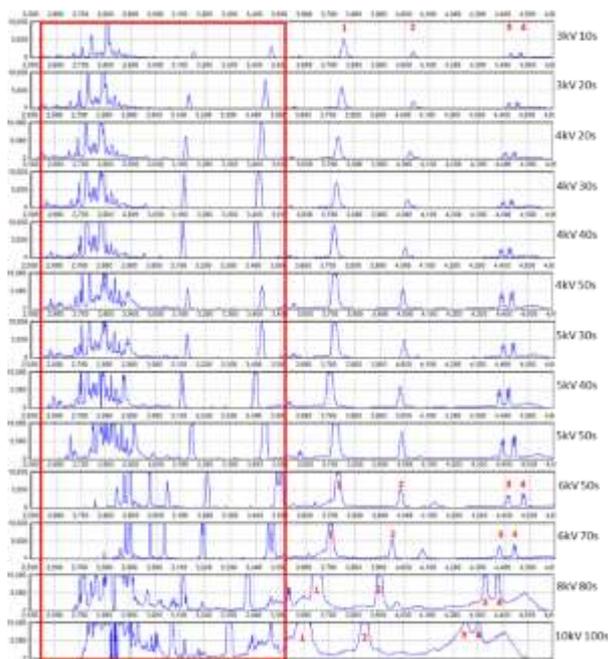
Pro co nejvyšší záchyt ctDNA, která se ve vzorku z plazmy vyskytuje v naprosto minoritním zastoupení oproti ostatní cfDNA a buněčné DNA, bylo potřeba docílit co nejvyšší citlivosti detekční metody. Toho jsem docílila zvýšením dvou dávkovacích parametrů na DNA analyzátoru, kterými byly čas a napětí. Optimalizaci jsem provedla na šesti vzorcích cfDNA pozitivních na přítomnost mutace a jednom vzorku bez mutace izolovaných za výše vybraných podmínek. V tomto případě jsem při výběru optimálních podmínek kromě zastoupení mutantní frakce zohlednila také čitelnost elektroferogramu, která se při vysokých hodnotách vybraných parametrů zhoršovala (Tab. 13 a Obr. 17).

Tab. 13

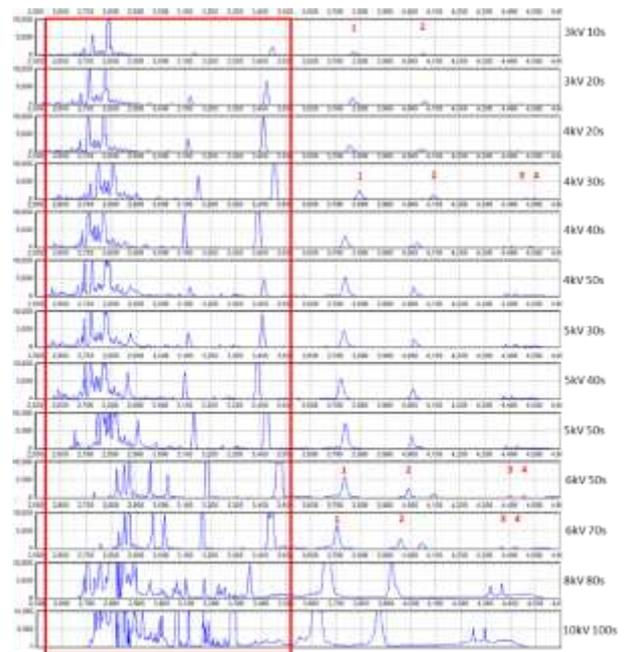
Výsledky optimalizace dávkovacích parametrů DNA analyzátoru

název vzorku	procentuální zastoupení mutantní frakce											
	3kV 10s	3kV 20s	4kV 20s	4kV 30s	4kV 40s	4kV 50s	5kV 30s	5kV 40s	5kV 50s	6kV 50s	6kV 70s	8kV 80s
vzorek č. 1	33,20%	33,92%	33,86%	34,38%	38,35%	44,76%	43,09%	46,12%	47,89%	40,32%	39,60%	nevyhodnotitelné
vzorek č. 2	30,90%	31,08%	31,04%	31,77%	32,18%	40,84%	38,08%	42,32%	45,67%	49,82%	39,61%	nevyhodnotitelné
vzorek č. 3	20,19%	21,55%	21,34%	21,14%	24,78%	26,65%	25,65%	29,40%	32,04%	24,03%	24,01%	nevyhodnotitelné
vzorek č. 4	34,73%	36,40%	35,23%	38,02%	34,43%	35,17%	35,59%	35,48%	34,79%	32,82%	32,88%	nevyhodnotitelné
vzorek č. 5	28,33%	33,21%	33,91%	33,97%	33,04%	28,14%	27,57%	30,07%	28,05%	26,04%	26,15%	nevyhodnotitelné
vzorek č. 6	17,47%	18,43%	18,15%	18,97%	20,73%	17,41%	17,18%	18,37%	17,84%	16,41%	15,48%	nevyhodnotitelné

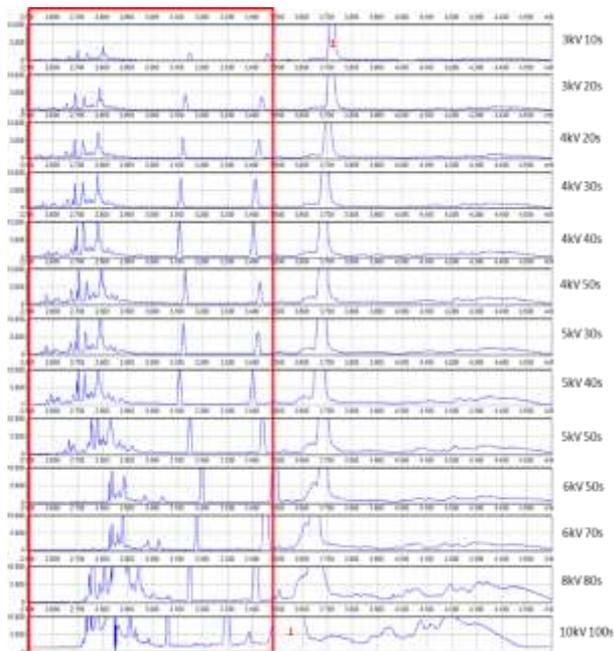
Na základně vypočtených hodnot mutantní frakce a zhodnocení elektroferogramů jsem jako optimální dávkovací parametry zvolila 5kV a 50s.



17a



17b



17c

Obr. 17

Ukázka elektroferogramů tří vzorků o rozdílné koncentraci cfDNA.

1-homoduplex wild type, 2-homoduplex mutant, 3, 4-heteroduplexy

17a vzorek č. 2 (vyšší koncentrace), červený rámeček ohraničuje oblast, kde se nacházejí primery, při vyšších hodnotách dávkovacích parametrů tato oblast zasahuje do oblasti amplifikačních produktů

17b vzorek č. 4 (nižší koncentrace)

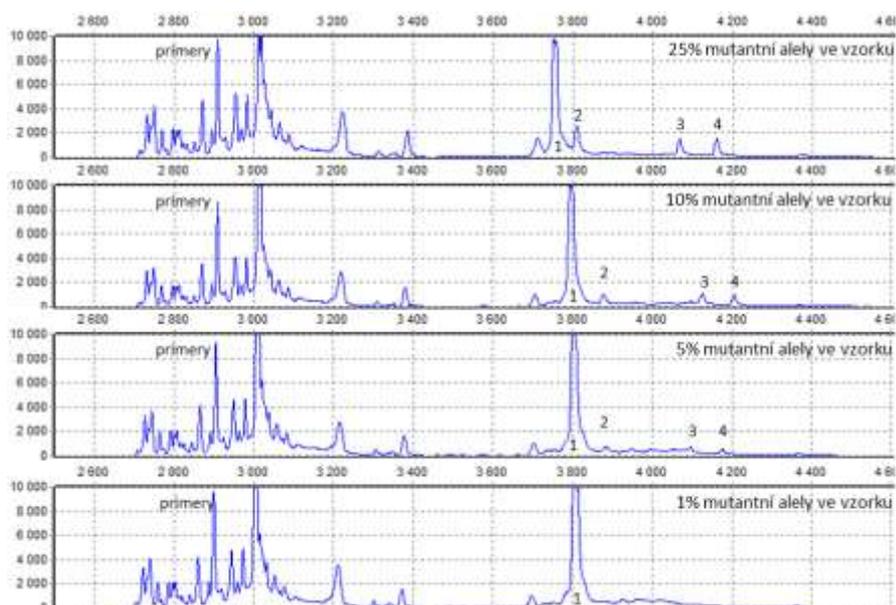
17c vzorek č. 7 (vyšší koncentrace, bez mutace)

5.1.4 Test citlivosti záchytu mutantní alely

Citlivost záchytu mutantní alely jsem provedla na třech markerech (KRAS exon 2, EGFR exon 19 a 21) a různých vzorcích se zastoupením mutantní frakce 25 % – 0,2 %. U genu *KRAS* exonu 2 a *EGFR* exonu 21 jsem jako nejnižší mutantní frakci detekovala 5 % a u genu *EGFR* exonu 19 frakci 0,6 %. Výsledky shrnuje Tab. 14 a ukázka výsledku je na Obr. 18.

Tab. 14
Výsledek citlivosti záchytu mutantní alely

KRAS exon 2		EGFR exon 19		EGFR exon 21	
mutantní frakce	VÝSLEDEK	mutantní frakce	VÝSLEDEK	mutantní frakce	VÝSLEDEK
25%	detekovaná mutace	25%	detekovaná mutace	25%	detekovaná mutace
10%	detekovaná mutace	10%	detekovaná mutace	10%	detekovaná mutace
5%	detekovaná mutace	5%	detekovaná mutace	5%	detekovaná mutace
1%	nedetekovaná mutace	1%	detekovaná mutace	1%	nedetekovaná mutace
		0,60%	detekovaná mutace		
		0,20%	nedetekovaná mutace		



Obr. 18
Ukázka elektroferogramu citlivosti záchytu mutantní alely v genu *KRAS* exonu 2.
1- homoduplex wild type, 2 – homoduplex mutant, 3, 4 - heteroduplexy

5.2 Analýza ctDNA ve vzorcích pacientů

Při analýze klinických vzorků jsem nejprve stanovila mutační profil DNA izolované z nádorové tkáně pacienta a následně jsem nalezenou mutaci analyzovala ve vzorcích plazmy. K detekci mutací u nádorových vzorků pocházejících od pacientů s KK jsem využila panel nejčastěji mutovaných lokusů v genech *KRAS*, *TP53*, *APC* a *BRAF*, pro vzorky z PDAC gen *KRAS* exon 2 a na vzorcích od nemocných s diagnózou NSCLC gen *EGFR*, exony 19 a 21. Detekci mutací jsem prováděla pomocí PCR s tvorbou heteroduplexů a následnou DCE separací za konstantní teploty optimální pro konkrétní PCR produkty. Záchyt ctDNA jsem korelovala se stádiem onemocnění a hladinami tumorových markerů a radikalitou chirurgického výkonu. Dále jsem ověřila možnost využití detekce ctDNA v plazmě v časném záchytu návratu (rekurence) či odhadu prognózy onemocnění.

5.2.1 Analýza ctDNA u kolorektálního karcinomu

Mutace v nádorové DNA a cfDNA

U všech vzorků nádoru (150) se mi podařilo získat dostatečné množství DNA pro následné analýzy. Alespoň v jednom markeru byla mutace u 122 vzorků (81 %), u 70 pacientů byla detekována mutace v genu *KRAS* (47 %), u 39 v genu *APC* (26 %), u 54 v genu *TP53* (36 %) a u 6 v genu *BRAF* (4 %). U pacientů pozitivních na přítomnost mutace ve vzorku nádoru jsem vyšetřila ctDNA v dostupných vzorcích plazmy a získala 115 validních výsledků, které jsou shrnuty v Tab. 15.

Tab. 15

Výsledky analyzovaných pacientů

pacienti s KK	počet vzorků	pozitivní ctDNA počet / %
všichni analyzovaní pacienti (III. i IV. stádium)	115	57 / 49 %
pacienti III. stádium onemocnění	34	11 / 32 %
pacienti IV. stádium onemocnění	81	46 / 57 %

CtDNA a radikalita resekce

Abych mohla porovnat výsledky ctDNA s radikalitou resekce nádoru, musela jsem analyzovat dostupné pooperační odběry, které byly k dispozici od 21 pacientů s pozitivním nálezem ctDNA před operací. Z 15 pacientů s R0 resekcí byla u 14 vyhodnocena pooperační ctDNA negativita (93 %) a z 6 pacientů s R2 resekcí byla zaznamenána pooperační ctDNA pozitivita u všech (100 %). Přehled výsledků je zobrazen v Tab. 16.

Tab. 16

Korelace ctDNA s radikalitou resekce

Pozitivní nález v ctDNA je značen jako X negativní jako O

číslo pacienta	radikalita resekce	pozitivita či negativita ctDNA
F 168	R0	o
F 204 a	R0	o
F 204 b	R0	o
F 216	R0	o
F 223	R0	o
F 243	R0	o
KK 86	R0	x
Mc 6 a	R0	o
Mc 6 b	R0	o
Mc 21	R0	o
Mc 36	R0	o
Mc 37	R0	o
Mc 39	R0	o
Mc 68	R0	o
Mc 70	R0	o
F 120	R2	x
F 124	R2	x
F 201	R2	x
F 202	R2	x
F 246	R2	x
F 276	R2	x

Návrat onemocnění – porovnání zobrazovacích metod, tumorových markerů a ctDNA

U 20 případů, ke kterým se mi podařilo získat potřebná data, jsem sledovala návrat onemocnění. Jednalo se opět o soubor operovaných pacientů, kdy jsem mezi sebou porovnávala účinnost zobrazovacích metod (ZM), hladiny tumorových markerů (TM) a zjištěnou pozitivitu ctDNA. V 10 případech (50 %) byla rekurence zachycena všemi třemi metodami. Samotná pozitivita ctDNA byla zaznamenána ve dvou případech (10 %), pozitivita ctDNA a jedné ze dvou dalších metod (ZM nebo TM) v 6 případech (33 %). CtDNA negativita při pozitivních ZM a TM byla zaznamenána pouze 1 x (5 %). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 17.

Tab. 17

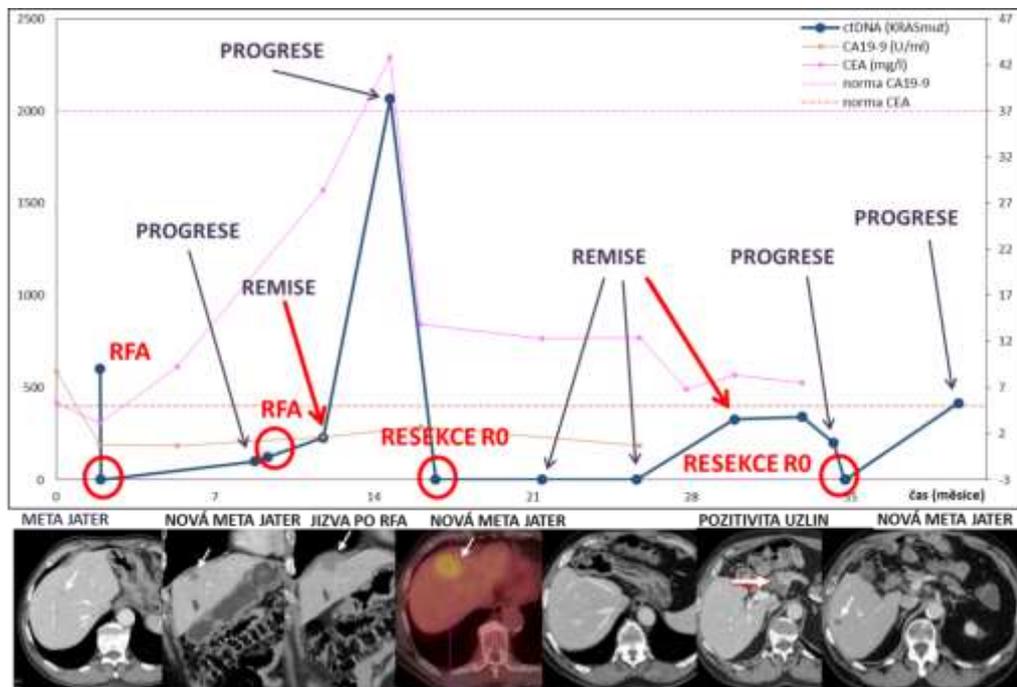
Přehled výsledků porovnání 3 metod v diagnostice recurence onemocnění

Pozitivní nález je označen +, negativní -. U některých pacientů došlo k návratu onemocnění vícekrát za sebou, v tabulce je tedy uvedené pořadové číslo recurence.

číslo pacienta	pořadové číslo recurence	ctDNA	zobrazovací metody	pozitivita tumorových markerů
Mc 75	1	+	+	+
Mc 74	1	+	+	-
Mc 74	2	+	+	+
Mc 70	1	+	+	+
Mc 68	1	+	+	-
Mc 68	2	+	+	+
Mc 6	1	+	+	-
Mc 6	4	+	+	+
Mc 2	1	+	+	+
Mc 19	1	+	+	+
Mc 1	1	+	+	+
F 243	1	+	+	+
F 202	1	+	+	-
F 168	1	+	+	+
Mc 63	1	+	-	-
Mc 6	2	+	-	+
Mc 6	3	+	-	+
Mc 31	1	+	-	-
Mc 7	1	-	+	-
Mc 23	1	-	+	+

Dlouhodobé sledování stavu pacienta (tzv. follow-up)

U jednoho pacienta jsem provedla podrobný follow-up s pravidelným zaznamenáváním hladin ctDNA, TM a výsledků zobrazovacích metod (Obr. 19).



Obr. 19

Znázornění průběhu detekce ctDNA u dlouhodobě sledovaného pacienta.

Červené šipky vyznačují situace, kdy byla detekována pozitivní ctDNA zatímco zobrazovací metody žádné ložisko zatím neodhalily, červené kroužky znázorňují chirurgický nebo RFA výkon.

U tohoto pacienta došlo během více než tříletého sledování celkem ke čtyřem recurencím, které byly pomocí ctDNA zachyceny ve všech případech, dvakrát za negativitu zobrazovacích metod.

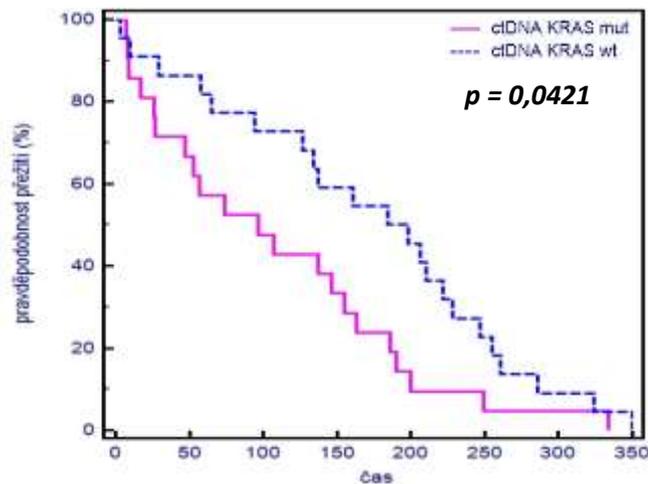
5.2.2 Analýza ctDNA u karcinomu pankreatu

Mutace nádorové DNA a cfDNA

U všech cytologických nátěrů (50) se mi podařilo získat dostatečné množství DNA pro následnou amplifikaci genu *KRAS* exonu 2, kdy pozitivitu na mutaci jsem zaznamenala u 45 vzorků (90 %). U všech pacientů jsem provedla vyšetření na přítomnost ctDNA ve vzorcích plazmy a získala 100 % validních výsledků, kdy pozitivita ctDNA byla detekována ve 22 vzorcích (48 %).

CtDNA a prognóza onemocnění

Porovnáním celkového přežití pacientů pozitivních na přítomnost ctDNA (ctDNA *KRAS* mut) a negativních na přítomnost ctDNA (ctDNA *KRAS* wt) bylo dosaženo statisticky významného rozdílu ($p=0,0421$, Obr. 20). Přežití pacientů s pozitivitou ctDNA signifikantně koreluje s horší prognózou a to bez ohledu na způsob léčby pacientů.



Obr. 20

Kaplan-Maierova analýza přežití u pacientů s pozitivním a negativním nálezem ctDNA v plazmě.

5.2.3 Analýza ctDNA u nemalobuněčného karcinomu plic

Ze 139 analyzovaných pacientů byla pozitivita v genu *EGFR* exonech 19 či 21 zachycena v 17 případech (12 %). Plazmu jsem získala od 30 pacientů, na kterých jsem provedla analýzu ctDNA nezávisle na výsledku z nádorové DNA. Pozitivitu na ctDNA jsem zaznamenala u 7 vzorků (23 %) z čehož 2 pozitivní výsledky jsem prokázala u pacientů bez dostupného vzorku tumoru.

6 Diskuze

V této práci jsem chtěla prokázat přínos analýzy ctDNA u onkologických pacientů. Aby toto vyšetření mohlo být klinicky využitelné, museli jsme zavést a standardizovat postup, který by byl jednoduše aplikovatelný na klinická i laboratorní pracoviště, využitelný pro většinu nádorových onemocnění a nebyl by finančně nákladný.

Optimalizace podmínek pro vyšetření ctDNA

Prvním a podstatným krokem bylo vybrat izolační soupravu, pomocí které by bylo možno z plazmy vyextrahovat co nejvíce volných nádorových DNA fragmentů na pozadí vysoké koncentrace nenádorové DNA. V tomto kroku jsem porovnávala čtyři komerčně dodávané izolační soupravy, kdy tři z nich byly přímo určeny pro izolaci cfDNA a jedna, standardně v naší laboratoři využívána, na izolaci genomové DNA. Nebylo nijak překvapivé, že při použití poslední z testovaných souprav nedošlo k izolaci ctDNA, jelikož se jedná především o krátké fragmenty, na které tento izolační kit, na rozdíl od těch určených přímo na cfDNA, není koncipován. Stěžejními parametry těchto kitů jsou optimální vlastnosti silikagelové membrány na kolonce a vazebného pufru, který zajišťuje navázání preferovaných fragmentů DNA na tuto membránu (KUMAR 2006). Nejlepší tyto vlastnosti pravděpodobně dosahují soupravy označené jako K1 a K3. Nepatrný rozdíl mezi výtěžky mutantní frakce mezi těmito dvěma soupravami by mohl vést k zamyšlení, zda nedošlo k chybě při hodnocení výsledku, ale přednost kitu K1 jsem dala zejména kvůli požadovanému množství vstupního objemu plazmy, který je u K1 3x nižší než u K3. Nižší vstupní objem plazmy je výhodný proto, že ne vždy je možné od onkologicky nemocného pacienta získat potřebné množství plazmy odpovídající více než pěti mililitrům.

Optimalizace amplifikace produktů v cfDNA byla založena na modifikaci objemů templátové DNA a celkového reakčního objemu. Z výsledků, kde největší výtěžek mutantní frakce byl při obou nejvyšších objemech, odpovídá tomu, že čím vyšší celkové množství určité minoritní alely v PCR směsi je, tím je nižší pravděpodobnost, že dojde k jevu zvanému allelic drop-out, neboli preferenční amplifikaci majoritní alely. Vyšší objem reakční směsi napomáhá k celkově lepší amplifikaci, tedy i minoritní alely (GAINES a kol. 2002). Pro zvýšení detekční citlivosti jsem měnila podmínky na DNA analyzátoru. Dalo by se říci, že výhodné by bylo použít maximální možný čas i napětí, ale vzorek neobsahující mutaci při příliš vysokých hodnotách obou parametrů již nebyl dostatečně jasně zhodnotitelný z důvodu překryvu píků

představujících homoduplex nemutované alely a primery. Za použití vybraných parametrů lze při jedné analýze ve více kapilárách analyzovat vzorky o různých koncentracích cfDNA včetně těch, které obsahují pouze nemutovanou alelu, a případné nejasné vzorky znovu analyzovat s nastavením vyšších parametrů.

Na závěr jsem otestovala citlivost detekce mutantní alely. U markeru EGFR 21 a KRAS, jsem detekovala přítomnost 5% mutantní alely ve vzorku, ale u markeru EGFR 19 jsem byla schopna zachytit mutantní alelu v zastoupení až 0,6 %. To by mohlo být kromě rozdílných vlastností amplifikovaných oblastí zapříčiněno druhem použitých standardních DNA. V případě prvních dvou markerů jsem použila komerčně dodávaný uměle připravených DNA standard, který nemusí splňovat veškeré vlastnosti přirozené cfDNA. Naproti tomu citlivost u markeru EGFR 19, kterou jsem testovala na genomové DNA pocházející z nádorové tkáně, ve které byl počet mutantních kopií ověřen pomocí NGS, odpovídala očekávaným hodnotám nižším než 1 %, tedy srovnatelným s citlivostí komerčních IVD CE souprav (například Cobas® EGFR Mutation Test od společnosti Roche) (THRESS a kol. 2015).

V porovnání s běžně využívanými metodami pro detekci ctDNA jsou výhodou naší metodiky jednak velmi nízké nároky na vstupní množství templátové DNA (0,06 ng), oproti jiným (10 – 50 ng) (VOLIK a kol. 2016, FUJII a kol. 2017) a jednak samotný princip detekce mutací. U většiny metod, kromě NGS, je postup založen na alelicky specifické amplifikaci, kdy jeden amplikon odpovídá jedné mutaci. To předpokládá přesnou znalost detekované mutace, což není vždy možné, zejména u tumor supresorových genů, kde se může vyskytovat velké množství různých neznámých mutací. V naší metodice není třeba znát sekvenci mutace, amplifikuje se celý exon nebo jeho část a detekuje se jakákoliv mutace, která je přítomna v amplifikovaném úseku. Další velkou výhodou této metodiky je minimální časová, přístrojová i finanční náročnost. Celý postup kromě izolace cfDNA zahrnuje pouze PCR a následnou detekci pomocí standardního kapilárního analyzátoru. Například ve srovnání s metodami BEAMing nebo ddPCR, které sice vykazují vyšší citlivost zachytu ctDNA, ale vyžadují speciální velice nákladné přístrojové vybavení (přístroj pro vytvoření emulsní suspenze a průtokový cytometr) (www.sysmex-inostics.com, HINDSON a kol. 2011), jsou veškeré nároky na provedení DCE analýzy minimálně o řád nižší. To je pro využití v rutinní klinické praxi zcela zásadní a umožňuje to tak zařazení vyšetření ctDNA touto metodou jako doplňkového vyšetření.

Vyšetření klinických vzorků

U vzorků nádoru jsem vyšetřila panel genů, kde zjištěné procentuální zastoupení genových variací odpovídá hodnotám uvedeným v databázích a publikacích (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). U pacientů s KK ve III. a IV. stádiu s tkáněmi pozitivními na některou z testovaných mutací jsem analyzovala vzorky plazmy, kdy záchyt ctDNA dosahoval 49 %. To je sice o něco nižší než průměrné hodnoty uváděné v literatuře, které se pohybují od 30 % - 95 % dle použité metody (THIERRY a kol. 2014, VENDRELL a kol. 2017) , ale tento fakt může být způsoben tím, že ve většině prací se analyzuje pouze protoonkogen *KRAS*. Já jsem v této práci vyšetřovala i hůře detekovatelné mutace v tumor supresorových genech (*TP53*, *APC*). V případě, že bych počítala pouze pozitivní nález v genu *KRAS*, zvýšil by se záchyt na 57 % a v případě pacientů ve IV. stádiu onemocnění až na 70 %. U pacientů s PDAC byl záchyt ctDNA 48 %, což odpovídá údajům z literatury (HADANO a kol. 2016) a u pacientů s NSCLC jsem detekovala ctDNA v 23 %, kdy shodný výsledek mezi vzorkem nádoru a plazmou byl nalezen pouze v pěti případech ze 17. To je ve srovnání s literaturou, která uvádí rozmezí 36 % – 97 % (NORMANNO a kol. 2017), velice nízká hodnota a pravděpodobně souvisí s nízkým počtem vyšetřených pacientů.

Klinická aplikace

Při porovnání positivity ctDNA s radikalitou operace, zobrazovacími metodami a tumorovými markery se dá na základě získaných výsledků usoudit, že ctDNA by mohla být využita jako vhodné doplňkové vyšetření k uvedeným metodám a to obzvláště u těch pacientů, u kterých byla zjištěna pozitivita ctDNA v době diagnózy. V takovém případě, jak jsem ukázala na příkladu dlouhodobého sledování jednoho z pacientů s pokročilým KK, lze pomocí detekce hladiny ctDNA nejen ověřit, zda bylo ložisko zcela odstraněno, ale také včas zachytit rekurenci nádoru nebo progresi onemocnění a to i v případě, kdy zobrazovací metody nebo tumorové markery dávají negativní výsledky.

Vzhledem k 93 % přítomnosti mutované formy genu *KRAS* u PDAC, lze ctDNA vyšetřovat téměř u všech pacientů. Dříve bylo popisováno, že mutace v genu *KRAS* je negativním prediktorem u tohoto onemocnění (TADA a kol. 1991), ale později byly tyto výsledky vyvráceny (BOECK a kol. 2013, KINUGASA a kol. 2015), k čemuž zřejmě přispěl vliv zvýšení citlivosti dostupných molekulárně biologických technik a průkaz, že se mutace v tomto genu vyskytuje téměř u všech pacientů (BIANKIN a kol. 2012). Otázka ale byla, zda se na našem souboru pacientů potvrdí prognostická role přítomnosti ctDNA v plazmě pacientů s PDAC, jak

bylo publikováno EARLEM a kol. (2015). Pomocí Kaplan-Meierovy metody, kdy medián celkového přežití pacientů s pozitivní ctDNA byl 97 dní, zatímco u pacientů s negativní ctDNA až o 100 dní delší, jsem prognostickou roli u našich pacientů zaznamenala také. Zdá se tedy, že pozitivita ctDNA by mohla sloužit jako pomocný prognostický marker v managementu racionálního lékařského přístupu zajišťujícího co nejdelší dobu přežití pacienta při zachování dobré kvality života.

Poslední aplikací klinického využití detekce ctDNA byla predikce odpovědi na cílenou biologickou léčbu u nemocných s NSCLC. Z výsledků korelace nálezů mutací v nádorové tkáni a plazmy, která dosahovala pouhých 23 %, vyplývá, že toto vyšetření nemůže nahradit vyšetření tkáně, ale má své významné místo tehdy, kdy tkáň není dostupná. To jsem ukázala na případech dvou pacientů s nedostupným tkáňovým vzorkem, kdy byla v plazmě prokázána mutace v genu *EGFR* a tento nález umožnil indikovat cílenou biologickou léčbu tyrozín kinázovými inhibitory již v 1. linii léčby, což by bez tohoto nálezu nebylo možné (VYZULA a kol. 2017).

7 Souhrn

Optimalizovala jsem laboratorní postup pro detekci ctDNA za účelem rutinního využití v laboratoři s následným ověřením postupu na klinických vzorcích. Ty pocházely od pacientů, u nichž bylo diagnostikováno jedno ze tří nádorových onemocnění (kolorektální karcinom, karcinom pankreatu, nemalobuněčný karcinom plic).

1. Pro optimalizaci izolace ctDNA jsem využila 4 komerčně dodávané soupravy a na základě vyhodnocených parametrů jsem vybrala soupravu od společnosti Qiagen QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit.

Amplifikaci cfDNA jsem uskutečnila pomocí PCR s tvorbou heteroduplexů s následnou detekcí na DCE. Reakční objem PCR byl 20 μ l s 6 μ l vyizolované templátové cfDNA a nastavení DNA analyzátoru pro zvýšení citlivosti detekce jsem zhodnotila jako nejlepší 5kV 50s.

2. U 339 pacientů jsem analyzovala nejčastěji se vyskytující somatické mutace, tento soubor se skládal ze 150 pacientů s diagnózou KK, 139 pacientů s NSCLC a z 50 pacientů s PDAC. U pacientů pozitivních na přítomnost mutace ve vzorku nádoru jsem vyšetřila dostupné vzorky plazem. Pozitivita ctDNA byla zaznamenána u 57 pacientů s diagnózou KK (49 %), u 22 s PDAC (48 %) a u 7 s NSCLC (23 %).

Na 15 vzorcích jsem porovnávala radikalitu resekce metastatického KK s přítomností ctDNA. U 20 případů jsem porovnávala přítomnost ctDNA se zobrazovacími metodami a hladinou tumorových markerů a u jednoho pacienta jsem sledovala dlouhodobý vývoj metastatického KK s hladinami ctDNA.

U PDAC jsem pomocí Kaplan-Meierovy analýzy zjistila vztah přítomnosti ctDNA a prognózy onemocnění a u NSCLC jsem stanovovala přítomnost mutací v genu *EGFR* v ctDNA.

Na základě získaných výsledků se mi podařilo optimalizovat finančně nenákladný postup pro rutinní analýzu ctDNA v laboratoři.

8 Literatura

1. Abdalla, E.K., Vauthey, J.N., Ellis, L.M., Ellis, V., Pollock, R., Broglio, K.R., Hess, K., Curley, S.A. (2004): Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann. Surg.* 236: 818-827.
2. Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S.D., Chang, D.D. (2008): Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26: 1626-1634
3. Arenbergerová, M., Puzanov, I. (2012): Mutace BRAF: nový přístup k cílené léčbě melanomu. *Klin. Onkol.* 25: 323–328.
4. Bělohávek, O., Jarůšková, M., Šimonová, K., Kantorová, I. (2004): Atlas pozitronové emsiní tomografie. 2. vydání. Lacoméd spol. s.r.o., Praha.
5. Benešová, L. (2007): Využití moderních molekulárně-genetických metod v prevenci, časně diagnóze, predikci léčby a prognóze nádorových onemocnění. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
6. Benesova, L., Belsanova, B., Suchanek, S., Kopeckova, M., Minarikova, P., Lipska, L., Levy, M., Visokai, V., Zavoral, M., Minarik, M. (2013): Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal. Biochem.* 433: 227-234.
7. Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boultell, J.M., Bryant, J., Carter R.J., Keira Cheetham, R., and others. (2008): Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456: 53-59.
8. Beránek, M., Vlčková, J., Hypiusová, V., Živný, P., Palička, V. (2006): Comparison of various methods used for extraction of cell-free genomic DNA from human plasma. *Klin. Biochem. Metab.* 14: 21-24.
9. Beroud C., Soussi T. (1996): APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 24: 121-4.
10. Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Luber, B., Alani, R.M., Antonarakis, E.S., Azad, N.S., Bardelli, A., and others. (2014): Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *J. Clin. Oncol.* 6: 579–586.
11. Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch AM, Wu J, Chang DK, Cowley MJ, Gardiner BB, Song S, Harliwong I, Idrisoglu S, Nourse C, and others. (2012) Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491: 399-405.
12. Boeck, S., Jung, A., Laubender, R.P., Neumann, J., Egg, R., Goritschan, C., Ormanns, S., Haas, M., Modest, D.P., Kirchner, T., Heinemann, V. (2013): KRAS mutation status is not predictive for objective response to anti-EGFR treatment with erlotinib in patients with advanced pancreatic cancer. *J. Gastroenterol.* 48: 544-548.
13. Boland C.R. (2002): Molecular Basis fo Stool-Based DNA Tests for Colorectal Cancer: A primer for Clinicians. *Reviews in Gastroenterological disorders* 2: 12-19.
14. Boni, L., Cassinotti, E., Canziani, M., Dionigi, G., Rovera, F., Dionigi, R. (2007): Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surgical Oncology*19: 29-31.
15. Brock, G., Castellanos-Rizaldos, E., Hu, L., Coticchia, Ch., Skog, J., (2015): Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Transl. Cancer Res.* 4: 280-290.
16. Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D.V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, M., Haegeman, M.X., D’Herde, K., Vandenabeele, P. (2004): Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages Is

Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production. *Mol. Biol. Cell* 15: 1089–1100.

17. Bunganič, B., Hálková, T., Benešová, L., Belšánová, B., Laclav, M., Hružová, M., Traboulsi, E., Frič, P., Suchánek, Š., Minárik, M., Zavoral, M. (2016): KRAS mutation assay on EUS-FNA specimens from patients with pancreatic mass. *Cas. Lek. Cesk.* 155: 48-51. [Article in Czech]
18. Castagnola, P., Giaretti, W. (2005): Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1756: 115-125.
19. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., and others. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.
20. Dawson, S.J., Tsui, D.W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O.M., Chin, S.F., Dunning, M.J., Gale, D., Forshew, T., Mahler-Araujo, B., Rajan, S., Humphray, S., Becq, J., Halsall, D., Wallis, M., Bentley, D., Caldas, C., Rosenfeld, N. (2013): Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 28: 1199-1209.
21. Deligezer, U., Yaman, F., Erten, N., Dalay, N. (2003): Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients. *Clin. Chim. Acta* 335: 89–94.
22. Diaz, I.M., Nocon, A., Mehnert, D. H., Fredebohm, J., Diehl, F., Holtrup, F. (2016) Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PLoS One* 10: 1-18
23. Diaz, L.A., Williams, R.T., Wu, J., Kinde, I., Hecht, J.R., Berlin, J., Allen, B., Bozic, I., Reiter, J.G., Nowak, M.A., Kinzler, K.W., Oliner, K.S., Vogelstein, B. (2012). The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 28: 537-540.
24. Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L.A., Goodman, S.N., David, K.A., Juhl, H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2005): Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 16368-16373.
25. Diehl, F., Schmidt, K., Durkee, K.H., Moore, K.J., Goodman, S.N., Shuber, A.P., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2008a): Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 135: 489-98.
26. Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Diaz, L.A. (2008b): Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* 14: 985-990.
27. Dusek, L., Muzik, J., Maluskova, D., Májek, O., Pavlík, T., Koptíková, J., Melichar, B., Büchler, T., Fínek, J., Cibula, D., Babjuk, M., Svoboda, M., Vyzula, R., Ryska, A., Ryska, M., Petera, J., Abrahámová, J. (2014): Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin. Onkol.* 27: 406-423.
28. Earl, J., Garcia-Nieto, S., Martinez-Avila, J.C., Montans, J., Sanjuanbenito, A., Rodríguez-Garrote, M., Lisa, E., Mendía, E., Lobo, E., Malats, N., Carrato, A., Guillen-Ponce, C. (2015): Circulating tumor cells (Ctc) and kras mutant circulating free Dna (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer* 15: 797-807.
29. Eloubeidi, M.A., Chen, V.K., Eltoun, I.A., Jhala, D., Chhieng, D.C., Jhala, N., Vickers, S.M., Wilcox, C.M. (2003): Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy of patients with suspected pancreatic cancer: diagnostic accuracy and acute and 30-day complications. *Am. J. Gastroenterol.* 98: 2663-2668.
30. Ettinger, D.S. (2006): Clinical implication of EGFR expression in the development an progression of solid tumors: focus on non-small cell lung cancer. *Oncologist* 11:358-373.
31. Fearon, E.R. a Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

32. Fleischhacker, M. a Schmidt, B. (2007): Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* 1775: 181–232.
33. Frič, P. a Zavoral, M. (2010): Sekundární prevence kolorektálního karcinomu se zřetelem k vysoko rizikovým skupinám. *Interní klinika 1. Lékařské fakulty UK a Ústřední vojenské nemocnice, subkatedra gastroenterologie IPVZ, Praha.*
34. Fujii, T., Barzi, A., Sartore-Bianchi, A., Cassingena, A., Siravegna, G., Karp, D., Piha-Paul, S., Subbiah, V., Tsimberidou, A.M., Huang, H., Veronese, S., Di Nicolantonio, F., Pingle, S.C, Vibat, C.R.T., Hancock, S., Berz, D., Melnikova, V.O., Erlander, M.G., Luthra, R., Kopetz, S., Meric-Bernstam, F., Siena, S., Lenz, H.J., Bardelli, A., Janku, F. (2017): Mutation-Enrichment Next-Generation Sequencing for Quantitative Detection of KRAS Mutations in Urine Cell-Free DNA from Patients with Advanced Cancers. *Clin. Cancer Res.* 10: 1140-1157.
35. Fujiwara, K., Fujimoto, N., Tabata, M., Nishii, K., Matsuo, K., Hotta, K., Kozuki, T., Aoe, M., Kiura, K., Ueoka, H., Tanimoto, M. (2005): Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 11: 1219–1225.
36. Gahan, B.G. a Swaminathan, R. (2008): Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137: 1-6.
37. Gaines, M.L., Wojtkiewicz, P.W., Valentine, J.A., Brown, C.L. (2002): Reduced volume PCR amplification reactions using the AmpFISTR Profiler Plus kit. *J. Forensic Sci.* 47:1224-1237.
38. García-Olmo, D.C., Domínguez, C., García-Arranz, M., Anker, P., Stroun, M., García-Verdugo, J.M., García-Olmo, D. (2010): Cell-Free Nucleic Acids Circulating in the Plasma of Colorectal Cancer Patients Induce the Oncogenic Transformation of Susceptible Cultured Cells. *Cancer Res.* 70: 560–567.
39. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.Q., Butler, A., and others. (2012): Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366: 883-892.
40. Giacona, M.B., Ruben, G.C., Iczkowski, K.A., Roos, T.B., Porter, D.M., Sorensen, G.D. (1998): Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 17: 89–97.
41. Hadano, N., Murakami, Y., Uemura, K., Hashimoto, Y., Kondo, N., Nakagawa, N., Sueda, T., Hiyama, E. (2016): Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 115: 59-65.
42. Hahn, A.W., Gill, D.M., Maughan, B., Agarwal, A., Arjyal, L., Gupta, S., Streeter, J., Bailey, E., Pal, S.K., Agarwal, N. (2017): Correlation of genomic alterations assessed by next-generation sequencing (NGS) of tumor tissue DNA and circulating tumor DNA (ctDNA) in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): potential clinical implications. *Oncotarget* 16: 33614-33620.
43. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
44. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
45. Heidary, M., Auer, M., Ulz, P., Heitzer, E., Petru, E., Gasch, C., Riethdorf, S., Mauermann, O., Lafer, I., Pristauz, G., Lax, S., Pantel, K., Geigl, J.B., Speicher, M.R. (2014): The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 16: 421-451
46. Heneberg, P. (2011): Zpřesněme indikaci podávání inhibitorů kinázové aktivity EGFR. *Klinická Onkologie* 24: 87– 93.

47. Hiley, Cm, de Bruin, E.C., McGranahan, N., Swanton, C. (2014): Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol.* 15: 453-463.
48. Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., and others. (2011): High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 15: 8604-8610.
49. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991): 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.* 88: 7276–7280.
50. Chen, X.Q., Stroun, M., Magnenat, J.L., Nicod, L.P., Kurt, A.M., Lyautey, J., Lederrey, C., Anker, P. (1996): Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat. Med.* 9: 1033-1035.
51. Choi, J.J., Reich, C.F., Pisetsky, D.S. (2005): The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* 115: 55–62.
52. Ihle, N.T., Byers, L.A., Kim, E.S., Saintigny, P., Lee, J.J., Blumenschein, G.R., Tsao, A., Liu, S., Larsen, J.E., Wang, J., Diao, L., Coombes, K.R., Chen, L., Zhang, S., Abdelmelek, M.F., Tang, X., Papadimitrakopoulou, V., Minna, J.D., Lippman, S.M., Hong, W.K., Herbst, R.S., Wistuba, I.I., Heymach, J.V., Powis, G. (2012): Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J. Natl. Cancer Inst.* 104: 228-239
53. Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R.D., Knippers, R. (2001): DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res.* 61: 1659–1665.
54. Janku, F., Angenendt, P., Tsimberidou, A.M., Fu, S., Naing, A., Falchook, G.S., Hong, D.S., Holley, V.R., Cabrilo, G., Wheler, J.J., Piha-Paul, S.A., Zinner, R.G., Bedikian, A.Y., Overman, M.J., Kee, B.K., Kim, K.B., Kopetz, E.S., Luthra, R., Diehl, F., Meric-Bernstam, F., Kurzrock, R. (2015): Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget* 20: 12809-12821.
55. Kabíčková, E. (2011): Pozitronová emisní tomografie a její využití v dětské onkologii. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
56. Kapras, J., Kohoutová, M., Otová, B. (1996): Kapitoly z lékařské biologie a genetiky I. Karolinum. Praha.
57. Kinugasa, H., Nouse, K., Miyahara, K., Morimoto, Y., Dohi, C., Tsutsumi, K., Kato, H., Matsubara, T., Okada, H., Yamamoto, K. (2015): Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer* 121: 2271-2280.
58. Kovář, J. (2005), Buněčná proliferace a mechanismy její regulace. Karolinum, Praha.
59. Kramář, F., Minárik, M., Benešová, L., Halková, T., Netuka, D., Bradáč, O., Beneš, V. (2016): IDH1/2 Mutation and MGMT Promoter Methylation - the Relevant Survival Predictors in Czech Patients with Brain Gliomas. *Folia Biol.* 62: 194-202.
60. Kuang, Y., Rogers, A., Yeap, B.Y., Wang, L., Makrigiorgos, M., Vetrand, K., Thiede, S., Distel, R.J., Jänne, P.A. (2009): Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 15: 2630-2636.
61. Kumar, A. (2006): Genetic Engineering. Nova Science Publishers, New York
62. Kupka, K. a kol. (2007): Nukleární medicína. P3K, Příbram.

63. Lea, I.A., Jackson, A.M., Dunnick, J.K. (2009): Genetic pathways to colorectal cancer. *Mutat. Res.* 670: 96-98.
64. Leek, R.D., Landers, R.J., Harris, A.L., Lewis, C.E. (1999): Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 79: 991-995.
65. Lefebure, B., Charbonnier, F., Di Fiore, F., Tuech, J.J., Le Pessot, F., Michot, F., Michel, P., Frebourg, T. (2010). Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann. Surg.* 251: 275-280.
66. Leon S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., Yaros, M.J. (1977): Free DNA in the serum of cancer patients and the effects of therapy. *Cancer Res.* 37: 646-650.
67. Levy, M1., Benesova, L., Lipska, L., Belsanova, B., Minarikova, P., Veprekova, G., Zavoral, M., Minarik, M. (2012): Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 32: 1621-1626.
68. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L. (2000): *Molecular Cell Biology*. 4. vydání. W. H. Freeman and Company, New York.
69. Lukáš, K., Žák, A. a kol. (2015): *Chorobné znaky a příznaky: Diferenciální diagnostika*. Grada Publishing a.s., Praha.
70. Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J., Haber, D.A. (2004): Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350: 2129-2139.
71. Mandel P. a Me'tais P. (1948). Citováno podle Gal S., Fidler C., Lo Y.M.D., Taylor M., Han C., Moore J., Harris A.L., Wainscoat J.S. (2004): Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br. J. Cancer* 22: 1211-1215.
72. Mardis, E.R. (2013): Next-generation sequencing platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 6: 287-303.
73. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., and others. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
74. Micke, O., Bruns, F., Kurowski, R., Horst, E., deVries, A.F., Hausler, J.W., Willich, N., Schäfer, U. (2003): Predictive value of carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer treated with radiochemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* 57: 90-97.
75. Minarik, M., Belsanova B., Minarikova P., Lipska L., Levy, L., Veprekova, G., Visokai, V., Zavoral, M., Benesova, L. (2011): Circulating free tumor DNA in patient plasma is a near-perfect marker for metastatic spread of colorectal cancer: a study on 165 patients undergoing surgical treatment. *Digestive Disease Week (DDW) 2011, Chicago, Illinois, 7.-10.5.2011, Book of abstracts*, 343.
76. Minarik, M., Minarikova, L., Hrabikova, M., Minarikova, P., Hrabal, P., Zavoral, M. (2004): Application of Cycling Gradient Capillary Electrophoresis (CGCE) to Clinical Screening of APC, K-ras and DCC Point Mutations in Patients with Sporadic Colorectal Tumors. *Electrophoresis* 25: 1016-1021.
77. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A (2012): Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486: 532-536.

78. Morrison, T., Hurley, J., Garcia, J., Yoder, K., Katz, A., Roberts, D., Cho, J., Kanigan, T., Ilyin, S.E., Horowitz, D., Dixon, J.M., Brenan, C.J. (2006): Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 34: 123-132.
79. Mu, D.Q., Peng, Y.S., Xu, Q.J. (2004): Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J. Gastroenterol.* 10: 471-475.
80. Müller, I., Urban, K., Pantel, K., Schwarzenbach, H. (2006): Comparison of genetic alterations detected in circulating microsatellite DNA in blood plasma samples of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1075: 222–229.
81. Murtaza, M., Dawson, S.J., Tsui, D.W., Gale, D., Forshew, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.F., Kingsbury, Z., Wong, A.S., Marass, F., Humphray, S., Hadfield, J., Bentley, D., Chin, T.M., Brenton, J.D., Caldas, C. (2013): Rosenfeld N: Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 497: 108-112.
82. Navrátil, L. a Rosina, J. a kol. (2005): *Medicínská biofyzika.* Grada, Praha.
83. Nekula, J. a kol. (2005): *Radiologie.* Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
84. Niederau, C., Grendell, J.H. (1995): Diagnosis of pancreatic carcinoma. Imaging techniques and tumor markers. *Pancreas* 10: 66-86.
85. Normanno, N., Denis, M.G., Thress, K.S., Ratcliffe, M., Reck, M. (2017): Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* (8): 12501-12516.
86. Pérez-Barrios, C., Nieto-Alcolado, I., Torrente, M., Jiménez-Sánchez, C., Calvo, V., Gutierrez-Sanz, L., Palka, M., Donoso-Navarro, E., Provencio, M., Romero, A. (2016): Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl. Lung Cancer Res.* 5: 665-672.
87. Pesek, M., Kopeckova, M., Benesova, L., Meszarosova, A., Mukensnabl, P., Bruha, F., Minarik, M. (2011): Clinical significance of hypermethylation status in NSCLC: evaluation of a 30-gene panel in patients with advanced disease. *Anticancer Res.* 31: 4647-4652.
88. Qin, Z., Ljubimov, V. A., Zhou, C., Tong, Y., Liang, J. (2016): Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin. J. Cancer* 35: 1-9.
89. Quach, N., Goodman, M.F., Shibata, D. (2004): In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin. Pathol.* 12: 1.
90. Racek J a kol. (1999): *Klinická Biochemie.* Galén a Karolinum, Praha.
91. Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J.F., Marran, D., Myers, J.W., Davidson, J.F., Branting, A., Nobile, J.R., Puc, B.P., Light, D., Clark, T.A., Huber, M., and others. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475:348-352.
92. Rowland, A., Dias, M.M., Wiese, M.D., Kichenadasse, G., McKinnon, R.A., Karapetis, C.S., Sorich, M.J. (2015): Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 112: 1888–1894.
93. Salek, C., Benesova, L., Zavoral, M., Nosek, V., Kasperova, L., Ryska, M., Strnad, R., Traboulsi, E., Minarik, M. (2007): Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 13:3714-3720.

94. Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N. (1995): Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical reviews in oncology hematology* 19: 183-232.
95. Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. (1983): Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51: 2116–2120.
96. Schmoll, H.J., Stein, A. (2014): Colorectal cancer in 2013: Towards improved drugs, combinations and patient selection. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11: 79-80.
97. Schøler, L.V., Reinert, T., Ørntoft, M.W., Kassentoft, C.G., Árnadóttir, S.S., Vang, S., Nordentoft, I., Knudsen, M., Lamy, P., Andreasen, D., Mortensen, F.V., Knudsen, A.R., Stribolt, K., Sivesgaard, K., Mouritzen, P., Nielsen, H.J., Laurberg, S., Ørntoft, T.F., Andersen, C.L. (2017): Clinical implications of monitoring circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 21.
98. Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B., Pantel, K. (2011): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* 11: 426-437.
99. Silva, J.M., Dominguez, G., Villanueva, M.J., Gonzalez, R., Garcia, J.M., Corbacho, C., Provencio, M., España, P., Bonilla, F. (1999a): Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 80: 1262-1264.
100. Silva, J.M., Gonzalez, R., Dominguez, G., Garcia, J.M., España, P., Bonilla, F. (1999b): TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes, Chromosomes Cancer* 24: 160-161.
101. Skříčková, J., Bortlíček, Z., Hejduk, K., Pešek, M., Zatloukal, P., Kolek, V., Salajka, F., Koubková, L., Tomíšková, M., Grygárková, I., Havel, L., Hrnčiarik, M., Zemanová, M., Sixtová, D., Roubec, J., Čoupková, H., Košatová, K. (2012): Nové Možnosti nákladné pneumoonkologické léčby, pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) v první linii dle morfologické a molekulárně genetické diagnostiky v České republice. *Onkologie* 6: 79-82.
102. Smith-Bindman, R., Lipson, J., Marcus, R., Kim, K.P., Mahesh, M., Gould, R., Berrington de González, A., Miglioretti, D.L. (2009): Radiation dose associated with common computed tomography examinations and the associated lifetime attributable risk of cancer. *Arch. Intern. Med.* 169: 2078-2086.
103. Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, F.H., Memoli, V.A., Bzik, D.J., Yao, S.L. (1994): Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 3: 67–71.
104. Stroun M. a Anker P. (1989): Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46: 318-322.
105. Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., Anker, P. (2001): About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta* 313: 139-142.
106. Su, Y.H., Wang, M., Brenner, D.E., Norton, P.A., Block, T.M. (2008): Detection of mutated K-ras DNA in urine, plasma, and serum of patients with colorectal carcinoma or adenomatous polyps. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1137: 197-206.
107. Sun, W., Yuan, X., Tian, Y., Wu, H., Xu, H., Hu, G., Wu, K. (2015): Non-invasive approaches to monitor EGFR-TKI treatment in non-small-cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* 8: 95-104.
108. Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J., Morley, A.A. (1992): Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* 13: 444–449.
109. Špičák, J., Urban, O. a kol. (2015): *Novinky v digestivní endoskopii*. Grada Publishing a.s., Praha.
110. Tada, M., Omata, M., Ohto, M. (1991): Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 100: 233–238.

111. Thierry, A.R., Mouliere, F., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., Gillet, B., Gongora, C., Dechelotte, P., Robert, B., Del Rio, M., Lamy, P.J., Bibeau, F., Nouaille, M., Lorient, V., Jarrousse, A.S., Molina, F., Mathonnet, M., Pezet, D., Ychou, M. (2014): Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 20: 430-435.
112. Thress, K.S., Brant, R., Carr, T.H., Dearden, S., Jenkins, S., Brown, H., Hammett, T., Cantarini, M., Barrett, J.C. (2015): EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer* 90: 509-5015
113. Tchelebi, L., Ashamalla, H., Graves, P.R. (2014): Mutant p53 and the response to chemotherapy and radiation. *Subcell. Biochem.* 85: 133-159.
114. Ugurel, S., Röhmel, J., Ascierto, P.A., Flaherty, K.T., Grob, J.J., Hauschild, A., Larkin, J., Long, G.V., Lorigan, P., McArthur, G.A., Ribas, A., Robert, C., Schadendorf, D., Garbe, C.(2017): Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *Eur. J. Cancer* 83: 247-257.
115. Umetani, N., Hiramatsu, S., Hoon, D.S.B. (2006a): Higher Amount of Free Circulating DNA in Serum than in Plasma Is Not Mainly Caused by Contaminated Extraneous DNA during Separation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1075: 299-307.
116. Umetani, N., Kim, J., Hiramatsu, S., Reber, H.A., Hines, O.J., Bilchik, A.J., Hoon, D.S.. (2006b): Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin. Chem.* 52: 1062–1069.
117. Underhill, H.R., Kitzman, J.O., Hellwig, S., Welker, N.C., Daza, R., Baker, D.N., Gligorich, K.M., Rostomily, R.C., Bronner, M.P., Shendure, J. (2016): Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet.* 12: e1006162.
118. Válek, V. a Žižka, J. (1996): *Moderní diagnostické metody.* Idivp, Brno.
119. Valík, D., Nekulová, M., Dubská, L., (2008): Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP) České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP) České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) -sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi.
120. Van Cutsem, E., Nordlinger, B., Adam, R., Köhne, C.H., Pozzo, C., Poston, G., Ychou, M., Rougier, P. (2006): European Colorectal Metastases Treatment Group. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur. J. Cancer* 42: 2212-2221.
121. Van der Vaart, M., Pretorius P.J. (2010): Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? *Clin. Biochem.* 43: 26-36.
122. Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., Stroun, M. (1994): Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* 4: 774-779.
123. Vendrell, J.A., Mau-Them, F.T., Béganton, B., Godreuil, S., Coopman, P., Solassol, J. (2017): Circulating Cell Free Tumor DNA Detection as a Routine Tool for Lung Cancer Patient Management. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 264-283.
124. Vennela, B., Shirisha, V., Babu Rao, Ch., Gullapalli, V., Batsala, M. (2012): Current and future strategies for therapy of pancreatic cancer. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 2: 728-740.
125. Viorritto, I.C., Nikolov, N.P., Siegel, R M. (2007): Autoimmunity versus tolerance: can dying cells tip the balance? *Clin. Immunol.* 122: 125–134.
126. Vogelstein, B. a Kinzler, K.W. (1999): P.C.R. Digital. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 9236-9241.
127. Volik, S., Alcaide, M., Morin, R. D, Collins, C. (2016): Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol. Cancer Res.* 14: 898-908.

128. Vyzula, R. a kol. (2017): Modrá kniha české onkologické společnosti. 23. aktualizace. Masarykův onkologický ústav, Brno.
129. Wang, J.F. a Dai, D.Q. (2007): Metastatic suppressor genes inactivated by aberrant methylation in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 13: 5692-5698.
130. Wimberger, P., Roth, C., Pantel, K., Kasimir-Bauer, S., Kimmig, R., Schwarzenbach, H. (2011): Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer.* 128: 2572-2580.
131. Wong, I.H., Lo, Y.M., Zhang, J., Liew, C.T., Ng, M.H., Wong, N., Lai, P.B., Lau, W.Y., Hjelm, N.M., Johnson, P.J. (1999): Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* 59: 71-73.
132. Wong, T.S., Kwong, D.L., Sham, J.S., Wei, W.I., Kwong, Y.L., Yuen, A.P. (2004): Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 2401–2406.
133. Zavoral, M., Suchánek, Š, Vepřeková, G., Májek, O., Gregor, J., Dušek, L. (2011): Screening a včasný záchyt kolorektálního karcinomu – současný stav v jednotlivých krajích České republiky. *Onkologie* 5: 210–214.
134. Zhi-Pei, L. (1999): Principles of Magnetic Resonance Imaging: A Signal Processing Perspective, Wiley.
135. Mardis, E.R. (2017) DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nat. Protoc* 12: 213-218.