

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Katedra antropologie a genetiky člověka



**Bc. Veronika Grünveigová**

Využitie molekulárno-biologických metód (QRT-PCR) a imunocytologických metód (prietoková cytometria a imunocytochémia) pre detekciu minimálne reziduálnej choroby u neuroblastómu

The use of molecular-biology methods (QRT-PCR) and immunocytological methods (flow cytometry and immunocytochemistry) for the detection of minimal residual disease in neuroblastoma

Diplomová práce

Školiteľ: MUDr. Aleš Vícha, Ph.D.

Praha 2017

## Prehlásenie

Týmto prehlasujem, že som diplomovú prácu na tému Využitie molekulárno biologických metód (QRT-PCR) a imunocytologických metód (prietoková cytometria a imunocytochémia) pre detekciu minimálne reziduálnej choroby u neuroblastómu vypracovala samostatne, pod vedením MUDr. Aleša Víchu, Ph.D., a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca a ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe dňa.....

Podpis.....

Veronika Grünveigová

## Podakovanie

Rada by som sa poďakovala svojmu školiteľovi MUDr. Alešovi Víchovi, Ph.D. za venovaný čas, odborné vedenie, ochotu a trpezlivosť v priebehu celého spracovania diplomovej práce. Ďalej by som sa rada poďakovala všetkým pracovníkom laboratória solídnych nádorov 2.LF UK a FN Motol za pomoc a spoluprácu.

V neposlednej rade ďakujem svojej rodine a blízkym priateľom za podporu počas celého štúdia.

## Abstrakt

S rozvojom molekulárno-biologických metód sa pozornosť sústreďuje aj na možnosti detekcie minimálne reziduálnej choroby (minimal residual disease, MRD) u solídnych nádorov. V našej práci sa sústreďíme na dôkaz prítomnosti MRD u neuroblastómov. Neuroblastóm je nádor periférneho sympatického nervového systému, ktorý zahŕňa až desatinu všetkých detských solídnych nádorov. Otázkou zostáva, či prítomnosť MRD v kostnej dreni bude možné využiť ako nezávislý prognostický znak. S tým je spojená aj ďalšia otázka, akú techniku je k jej preukázaniu najvhodnejšie použiť, prípadne aký znak vyšetrovať.

K detekcií MRD u neuroblastómov je možné využiť niekoľko metodických prístupov, ktoré sa odlišujú nielen nákladnosťou a pracnosťou ale najmä senzitivitou a špecificitou. Detekujú sa nádorové bunky v periférnej krvi alebo v kostnej dreni. Kostná dreň je veľmi častým miestom metastatického postihnutia u neuroblastómov. Pri vstupnom vyšetrení kostnej drene pomocou štandardného cytomorfológického vyšetrenia je pozitívita zachytená u viac ako 85% prípadov neuroblastómu vysokého rizika. Koncentrácia nádorových buniek je však často v kostnej dreni alebo periférnej krvi v hodnotách (predovšetkým v priebehu terapie alebo po jej ukončení), ktoré sú hlboko pod detekčným limitom štandardných vyšetrovacích metód: cytomorfológické vyšetrenie, zobrazovacie metódy (MRI, CT, UZ), izotopové metódy (MIBG). V našej práci boli preto použité citlivejšie metódy: reverzne transkriptázová polymerázová reakcia v reálnom čase (QRT-PCR), prietoková cytometria a imunocytochemická metóda. Tieto metódy sme následne porovnanli s cytomorfológickým vyšetrením, ktoré je schopné preukázať 1 nádorovú bunku medzi 200 bunkami kostnej drene.

Naše štúdium je zamerané ako retrospektívne prospektívne, v ktorom boli vyšetrené vzorky od pacientov s neuroblastómom. Do štúdie bolo zaradených 46 pacientov od ktorých sme získali 132 vzoriek kostnej drene. Porovnali sme výsledky z jednotlivých vyšetrení medzi sebou a u QRT-PCR aj korelácie sledovaných génov medzi sebou. V našom prípade sme dokazovali expresiu mRNA troch génov *TH*, *PHOX2B*, *DCX*, ktoré sú stabilne exprimované u neuroblastómov, ale nie sú exprimované bunkami kostnej drene.. Podobnú senzitivitu ako pri RT-PCR je možné dosiahnuť pomocou imunocytochémie. V našom prípade dokazujeme antigén GD2, ktorý je prítomný na povrchu neuroblastómových buniek, nie však buniek kostnej drene. Senzitivita vyšetrení pomocou prietokového cytometra je závislá na zvolenom postupe a počte vyšetrovaných znakov

v kombinácií. Stanovili sme kombináciu  $CD45^-/CD81^+/CD56^+$ . Pri tomto postupe sme schopní dosiahnuť senzitivitu 1 nádorovej bunky medzi 100-1000 bunkami kostnej drene. Senzitivita a špecificita týchto vyšetrení bola overená už v in vitro modeloch.

Tieto vyšetrenia sme porovnali s cytomorfologickým vyšetrením. V našej štúdií sme preukázali, že QRT-PCR a imunocytochémia sú citlivejšími technikami pri detekcii MRD než prietoková cytometria a cytomorfologické vyšetrenie.

Výsledky vyšetrenia by mohli pomôcť pri stanovení vhodnej metódy a vyšetrovaného znaku MRD u neuroblastómov. Na základe nami zistených výsledkov sme sa pokúsili stanoviť diagnostickú schému pre diagnostiku MRD u neuroblastómu.

**Kľúčové slová:** neuroblastóm, QRT-PCR, prietoková cytometria, imunocytochémia, morfológia, kostná dreň, periférna krv

## Abstract

With a continuous development of molecular-biology methods more attention has been paid to molecular detection of minimal residual diseases in solid tumors. In our study we focused on detection of MRD in neuroblastoma. Neuroblastoma is one of the peripheral neuroblastic tumors (pNTs) that accounts approximately for 10 percent of all childhood cancers. The question raised however not answered until this day is whether evidence of MRD in bone marrow may be used as independent prognostic factor in diagnosis of neuroblastoma. Furthermore, it is important to establish what kind of testing technique should be used and what values to look at.

There exist various methodologies in detection of MRD evidence in neuroblastoma. These methods differ in cost and complexity, but mainly some of them are more specific and sensitive than the other. Cancer cells may be detected in the blood as well as in the bone marrow. Very often it is the bone marrow that is affected by the metastasis in neuroblastoma, therefore 85% of all high risk neuroblastomas show positive results in the standard cytomorphology tests of bone marrow. Low numbers of cancer cells in bone marrow or peripheral blood (especially during or after the end of treatment) are below the standard values of detection limit in most of the classic methodologies used: cytomorphology testing, imaging techniques (MRI, CT, UZ), isothopic exchange methods (MIBG). Because of this reason we chose more sensitive techniques in our study: real-time reverse transcription polymerase chain reaction, flow cytometry and immunocytochemistry. Then these methods were compared with a cytomorphological examination demonstrating 1 tumor cell between 200 bone marrow cells.

Our study is aimed retrospectively in prospective examinations of samples from patients with neuroblastoma. The study included 46 patients from whom 132 bone marrow samples were obtained.

We used retrospective prospective study design to assess bone marrow in patients diagnosed with neuroblastoma. The samples were taken from two locations and several samples were assessed at different timepoints of patient's treatment. We compared the results between each others and the amount of gene expression at by using QRT-PCR. In our case we wanted to prove the evidence of expression of three mRNA genes *TH*, *PHOX2B* and *DCX* which are normally expressed in neuroblastoma, but are not expressed by bone marrow. We expected similar sensitivity that is known by RT/PCR also to be

found in immunocytochemistry. We proved that antigen GD2 was present on the cells of neuroblastoma however was not present in bone marrow cells. The sensitivity of diagnosis by flow cytometry depended on the technique which was being used and also on the number of diagnostic characters in combination. In our study we used combination of CD45<sup>-</sup>/CD81<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>. In this procedure we are able to achieve a tumor cell sensitivity of 1 to 100-1000 bone marrow cells. The sensitivity and specificity these investigations as already validated in *in vitro* models. We compared these examinations with cytomorphological examination. In our study we have shown that QRT-PCR and immunocytochemistry are more sensitive techniques for MRD detection than flow cytometry and cytomorphology.

The results could be helpful in establishment of suitable method and in understanding and in understanding diagnostic character of MRD in neuroblastoma. On the basis of our results we tried to establish the diagnostic scheme for diagnosis of MDR in neuroblastoma.

**Key words:** neuroblastoma, QRT-PCR, flow cytometry, immunocytochemistry, morphology, bone marrow, peripheral blood

## Obsah

1 Literárny prehľad.....	9
1.1 Neuroblastóm.....	9
1.1.1 Incidencia neuroblastómu.....	9
1.1.2 Prognostické znaky neuroblastómu .....	10
1.1.3 Klinické štádiá neuroblastómu .....	11
1.1.4 Diagnostika neuroblastómu .....	11
1.2 Minimálna reziduálna choroba.....	13
1.2.1 Význam sledovania MRD .....	13
1.2.2 Detekcia MRD .....	14
1.2.2.1 Vhodné metódy a podmienky detekcie MRD .....	14
1.3 Techniky detekcie MRD .....	18
1.3.1 Cytomorfológia neuroblastómu .....	19
1.3.2 Prietoková cytometria .....	21
1.3.2.1 Využitie prietokovej cytometrie pri stanovení MRD .....	22
1.3.3 Imunocytochémia.....	25
1.3.3.1 Využitie Imunocytochémie pri stanovení MRD .....	26
1.3.4 QRT-PCR .....	28
1.3.4.1 Využitie QRT-PCR pri stanovení MRD u NBL .....	31
2 Hypotézy a ciele práce.....	34
3 Materiál a metódy.....	35
3.1 Imunocytologická analýza neuroblastómových buniek v KD .....	35
3.2 QRT-PCR génov <i>TH</i> , <i>PHOX2B</i> a <i>DCX</i> s kontrolným génom <i><math>\beta</math>2M</i> .....	39
4 Výsledky .....	44
4.1 Vyhodnotenie výsledkov .....	44
5 Diskusia .....	58
6 Záver.....	64
7 Zoznam skratiek .....	65
8 Zoznam použitej literatúry.....	68
9 Prílohy .....	77



# 1 Literárny prehľad

## 1.1 Neuroblastóm

Neuroblastóm (NBL) je maligný embryonálny nádor detského veku odvodený z nezrelých a nediferencovaných buniek neurálnej lišty, osídľujúcich paravertebrálne sympatické gangliá, dreň nadobličiek a paragangliá. Príčina jeho vzniku nie je známa. Je to najčastejší extrakraniálny solídny nádor detského veku s incidenciou, ktorá sa udáva v rozmedzí 7-10%. Priemerný vek v dobe stanovenia diagnózy sa pohybuje okolo dvoch rokov (36% pacientov je mladších než 1 rok, 79% mladších než 4 roky a 97% pacientov ochorenie do 10. roku života), veľmi vzácne sa neuroblastóm vyskytne i u dospelých (Brodeur et al., 2002). Vek v dobe stanovenia ochorenia je významným prognostickým faktorom (Breslow, 1971). Asi 70% primárnych nádorov vzniká v dutine brušnej, z nich polovica vychádza z drene nadobličky a polovica z paraganglií a sympatických ganglií v brušnej oblasti, 5% je lokalizovaných do panvovej oblasti a zvyšných 25% vyrastá z ganglií krčnej a hrudnej oblasti (Brodeur et al., 2002). Pre NBL je charakteristická značná biologická variabilita. Nádory nízkeho rizika často samovoľne regredujú, prípadne sa spontánne, či pri liečbe diferencujú v ganglioneuroblastóm a dokonca i v benigný ganglioneuróm. Vysoko maligná forma sa vyznačuje mimoriadne agresívnym priebehom s neovplyvniteľnou progresiou, nádor rýchlo rastie a včasne metastázuje predovšetkým do kostí, kostnej drene, lymfatických uzlín a u najmenších detí do koži a pečene (Weinstein et al., 2003). NBL vzniká väčšinou de novo, familiárny pôvod s autozomálne dominantným typom dedičnosti je predpokladaný len asi u 1 až 1,4% prípadov (Schell et al., 2013).

### 1.1.1 Incidencia neuroblastómu

V Európe a severnej Amerike je nádor ročne diagnostikovaný u 8-9 detí na jeden milión detí mladších než pätnásť rokov (Brodeur et al., 2002). V Českej republike je NBL ročne diagnostikovaný asi u 20-25 nových pacientov. Polovica prípadov sa zachytí do dvoch rokov, 70% do štyroch a 90% do desiatich rokov veku (Štěrba et al., 2004). U detí mladších než jeden rok je najčastejšie sa vyskytujúcim nádorom. Je považovaný za hlavnú príčinu úmrtia u kojencov, ktorí predstavujú 40% postihnutých. Väčšina prípadov (50%) sú

deti do jedného až dvoch rokov veku, vzácne sa toto ochorenie objavuje u starších než šesť rokov (10%) (Schwab, 1999).

### 1.1.2 Prognostické znaky neuroblastómu

Vzhľadom k rozdielnemu biologickému chovaniu nádoru je zrejmé, že existujú prognostické znaky, ktoré umožňujú zaradenie pacientov do rizikových skupín. Prognostický význam veku pacienta v dobe stanovenia diagnózy (u kojencov je priaznivejší priebeh), klinického štádia a tradičná histopatologická klasifikácia (ganglioneuróm, ganglioneuroblastóm a neuroblastóm) bola známa už v sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia. V súčasnosti sú identifikované ďalšie prognostické znaky:

1. markery detekovateľné v periférnej krvi, kostnej dreni alebo v moči: pomer hladiny kyseliny vanilmandľovej k homovanilovej v moči (pomer pod 1 je známkou horšej prognózy), sérová hladina ferritínu, laktátdehydrogenázy a neurónšpecifickej enolázy - vysoké hodnoty korešponujú s nepriaznivou prognózou (Pritchard and Hickman, 1994) prítomnosť *CD10*<sup>+</sup> bunecnej populácie v kostnej dreni je priaznivým prognostickým faktorom (Riley et al., 2004), znížený počet lymfocytov v periférnej krvi je známkou menej priaznivej prognózy (Eckschlager, 1992)
2. histopatologická klasifikácia (stupeň diferenciácie, prítomnosť alebo absencia strómatu a kalcifikácií, počet mitóz, karyorektický a vaskulárny index, expresia *CD44* a iné)- najvyužívanejšie sú hodnotenie podľa Shimady alebo Joshiho, ktoré rozlišujú neuroblastóm vysokého a nízkeho rizika (Peuchmaur et al., 2003; Shimada et al., 1999)
3. genetické faktory nádoru: DNA index, počet kópií onkogénu *N-myc*, delécia krátkého ramienka 1. chromozómu, index proliferačného nukleárneho antigénu (PCNA), expresia P-glykoproteínu, expresia niektorých neurotrofných faktorov NGF (Nerve Growth Factor) a receptorov pre NGF (*trkA*, *trkB*, *trkC*) (Goto et al., 2001).

### 1.1.3 Klinické štádiá neuroblastómu

V súčasnosti sa aplikuje INRG (International Neuroblastoma Risk Group) staging systém, ktorý je založený na rozsahu tumoru, prítomnosti metastáz a tzv. rizikových faktoroch na základe zobrazovacích vyšetrení IDRF (Image Defined Risk Factors), spravidla CT/ MRI a MIBG. Tieto faktory charakterizujú rast tumoru proti vitálne dôležitým štruktúram a cievam (Monclair et al., 2009).

Podľa spomenutého stagingového systému INRG rozlišujeme štyri štádiá NBL:

L1: Lokalizovaný nádor bez vrastania do vitálnych štruktúr, ktoré sú definované v zozname IDRF. Nádor je lokalizovaný do jedného kompartmentu – napríklad krk, hrudník alebo retroperitoneum

L2: Lokoregionálny nádor s prítomnosťou jedného alebo viacerých IDRF

M: Nádor s prítomnosťou vzdialených metastáz, okrem štádia Ms

Ms: Metastatický nádor u detí do veku 18 mesiacov veku s metastázami do kože, pečene a/alebo do kostnej drene.

V zásade možno povedať, že INSS (International Neuroblastoma Staging System) štádium 1 zodpovedá zaradeniu do INRG L1, INSS 2 a 3 do INRG L2, INSS 4 do štádia INRG M a INSS 4S do štádia Ms (Monclair et al., 2009).

### 1.1.4 Diagnostika neuroblastómu

Neoddeliteľnou súčasťou diagnostiky je bioptické vyšetrenie chirurgickou cestou. Dôležité je získať reprezentatívnu vzorku tkaniva, ktoré sa následne vyšetruje histopatologicky, imunohistochemicky a takisto geneticky na prítomnosť charakteristických chromozomálnych aberácií s prognostickým významom (*N-myc*, del 1p, del 11q, gain 17q). Pri tomto chirurgickom zákroku by sa mala súčasne realizovať i trepanobiopsia kostnej drene z dvoch rozličných miest bedrovej kosti (spravidla *crista iliaca anterior/ posterior*) na detekciu postihnutia kostnej drene pomocou uvedených metód (Jenčo, 2014). Z pohľadu patológie sa tumor hodnotí v súlade s kritériami

klasifikácie INPC (International Neuroblastoma Pathology Classification), ktorá vychádza z takzvanej Shimadovej klasifikácie. Dôkazom pre diagnózu NBL je jeho jednoznačné patologické určenie a zároveň zvýšené hodnoty katecholamínov v sére a v moči, prípadne jednoznačný nález buniek neuroblastómu v kostnej dreni – s nálezom neuroblastómových roziet. Štandardné klinické a patologické vyšetrenie však nie vždy dokáže rozlíšiť medzi jednotlivými nádorovými podtypmi, preto stále dôležitejšiu úlohu zohrávajú genetické vlastnosti tumorových buniek. Ich poznanie nám pomáha odhaliť biologické vlastnosti nádoru (Brodeur, 2003).

Mechanizmus vedúci k charakteristickej klinickej variabilite NBL nie je celkom objasnený. Prognostický význam jednotlivých znakov, či už klinických alebo cytogenetických je charakterizovaný najčastejšie vplyvom na EFS (Event Free Survival), či celkové prežívanie OS (Overall Survival). EFS udáva čas od začiatku liečby do akejkoľvek udalosti podľa typu štúdie – progresia, rekurencia. OS – do analýzy sú zahrnutí všetci pacienti v súbore. Udáva sa najčastejšie od začiatku liečby a trvá do dátumu úmrtia pacienta z akejkoľvek príčiny alebo poslednej kontroly. Smrť z akejkoľvek príčiny sa považuje za udalosť (Rečková, Mego, 2007).

## 1.2 Minimálna reziduálna choroba

Minimálna reziduálna choroba (minimal residual disease, MRD) je definovaná ako subklinická úroveň ochorenia, kedy v priebehu terapie už maligné bunky nie je možné detekovať konvenčnými postupmi (cytomorfológia). V tejto situácii sa pacienti nachádzajú v kompletnej klinickej remisii, no napriek tomu sa v ich tele môže vyskytovať až  $10^{10}$  maligných elementov. Pátrame po nich v kompartmentoch, ktoré sú ľahko dostupné k vyšetreniu a zároveň do nich nádory často metastázujú. Detekujú sa izolované nádorové bunky z periférnej krvi (PK), kostnej drene (KD), lymfatického systému a mozgomiešneho moku pacienta. Tieto izolované nádorové bunky je na základe súčasných znalostí možné považovať za prekuzory mikrometastáz. MRD je taktiež charakterizovaná prítomnosťou menej než 5% blastov v kostnej drene (KD), čo zodpovedá reziduálnej nádorovej mase  $10^6$ - $10^7$  buniek (Kubisz, 2006).

### 1.2.1 Význam sledovania MRD

MRD vyšetrujeme pred zahájením protinádorovej liečby (k upresneniu rozsahu ochorenia = staging), v priebehu liečby (sledovanie odpovedi na liečbu) a po jej ukončení (včasná známka nového vzplanutia ochorenia = recidíva, relaps). Práve zvyšné bunky, ktoré unikli liečbe, môžu spôsobiť relaps ochorenia (Campana and Pui, 1995). Sledovanie MRD tak poskytuje významný prognostický faktor v liečbe niektorých maligných hematologických ochorení ako sú akútna lymfoblastická leukémia (ALM), chronická myeloidná leukémia (CML) či solídnych nádorových ochorení ako je napr. neuroblastóm, rabdomyosarkóm, Ewingov sarkóm, meduloblastóm a iné. Predovšetkým u štepov progenitorových hematopoetických buniek, získaných z periférnych kmeňových buniek (PBSC) alebo KD pacientov s neuroblastómom sa javí vyšetrenie MRD ako nevyhnutné (Campana and Pui, 1995). Brenner a Rill jasne preukázali, že niektoré relapsy u ALL a NBL sú spôsobené kontamináciou autológnych štepov nádorovými bunkami, a nie prítomnosťou nádorových buniek, ktoré unikli megachemoterapií organizmu (Brenner et al., 1993, Rill et al., 1992). Celoeurópsky protokol pre liečbu NBL vysokého rizika (HR-NBL-1/ESIOP) skúma význam MRD v PK, KD a PBSC. Vzorok sa odoberajú v presne stanovených okamžikoch v priebehu liečby a detekuje sa dvoma nezávislými metódami (RT-PCR a imunocytochémia). Zatiaľ sa zdá, že bude nutné posudzovať metódy oddelene,

prípadne znaky použité k detekcii MRD a jednotlivé typy nádorových ochorení. Je však zrejmé, že v štepe určenom k autológnej transplantácii by nádorové bunky nemali byť prítomné vôbec, alebo len v minimálnom množstve. Moderné liečebné protokoly usilujú o dosiahnutie kompletnej remisie u pacientov s týmito ochoreniami, viac-menej často dochádza k relapsu ochorenia u takto liečených pacientov.

Sledovanie MRD je významné pre presnejšiu stratifikáciu pacientov pri začlenení do liečebných protokolov. Rozdelenie pacientov je zamerané predovšetkým na účinnejšiu terapiu u pacientov s vysokým rizikom relapsu a redukcii liečby u pacientov s nízkym rizikom relapsu, ktorým by mohli následne hroziť sekundárne malignity vyvolané terapiou. Ostáva nedoriešenou otázkou, či je za relaps ochorenia možné považovať izolovaný pozitívny nález, či je lepšie počkať na opakovaný záchyt, alebo ešte lepšie na stúpajúce množstvo nádorových buniek (Fields et al., 1996).

### **1.2.2 Detekcia MRD**

V súčasnosti sa MRD preukazuje radou spôsobov. Pre hodnotenie dynamiky MRD alebo vývoja nádorovej infiltrácie po zahájení protinádorovej liečby stúpa význam kvantitatívnych metód. Tie určujú nie len prítomnosť, ale aj množstvo nádorových buniek vo vyšetrovanom materiáli (Burchill et al., 2001; Cheung et al., 2003; Nagai et al., 2000). Princípom sledovania MRD je nájsť na nádorovej bunke taký znak, ktorý bude niest' celý nádorový klon a bude sa ním odlišovať od buniek zdravých. Týmto znakom môže byť napríklad zmenená génová expresia, translokácia, či klonálna prestavba. S využitím molekulárnej analýzy tohto nádorovo špecifického znaku je možné sledovať ochorenie na molekulárnej úrovni (Campana and Coustan-Smith, 1999).

#### **1.2.2.1 Vhodné metódy a podmienky detekcie MRD**

Metóda vhodná k vyšetreniu MRD musí spĺňať nasledujúce požiadavky:

1. Detekcia subklinického relapsu ochorenia po ukončení liečby
2. Monitorovanie odpovede na protinádorovú liečbu
3. Minimálna záťaž pacienta (množstvo vzorky, bolesť, celková anestézia, atď.)
4. Vysoká špecificita

## 5. Technická a finančná dostupnosť

Molekulárno-biologickými metódami najčastejšie detekujeme štrukturálne alebo numerické aberácie chromozómov alebo expresiu mRNA špecifického génu. Imunologickými metódami detekujeme prítomnosť pre nádor špecifický proteínový antigén, alebo skôr nefyziologicky špecifickú kombináciu antigénov (aberantná expresia antigénov). U imunologickej a molekulárno-biologickej detekcii sa často jedná o relatívnu špecificitu- daný imunofenotyp alebo špecifická mRNA sa v skúmanom tkanive nevyskytuje, pokiaľ v nej nie sú prítomné nádorové bunky. Príkladom takejto relatívnej špecificity sú monoklonálne protilátky proti NBL 6-19, 6-3, a 5-5, ktoré reagujú s mozgovým tkanivom a nadobličkami zdravého fétu, ale neviažu sa na žiadnu z buniek KD alebo PK (Frantz et al., 1985). Tieto protilátky teda nereagujú špecificky s NBL bunkami, ale ich pozitivita v KD pacienta s NBL je celkom nepochybným dôkazom nádorovej infiltrácie. Ako veľmi perspektívny sa u NBL javí imunocytochemický alebo imunoflorescenný dôkaz prítomnosti antigénu disialoglosidu GD2 protilátkou (*14G2a*) (Mehes et al., 2003). Ďalším vhodným príkladom je dôkaz prítomnosti buniek *TdT*<sup>+</sup> a *cCD3*<sup>+</sup> v KD pri jej infiltrácií ALL alebo lymfoblastickým T non-Hodgkinovým lymfómom. Bunky tohto imunofenotypu sa fyziologicky vyskytujú v kôre týmusu, ale nikdy nie v KD alebo PK (Campana et al., 1991). Inou možnosťou môže byť vyšetrenie trojkombinácie *CD45*/*CD81*<sup>+</sup>/*CD56*<sup>+</sup> na bunkách neuroblastómu prietokovým cytometrom. Vylúčením buniek nesúcich panmyelocytárny znak *CD45* a zároveň dôkazom znaku *CD81* a *CD56* môžeme selektovať NBL bunky. Tento postup je možné použiť k detekcií MRD v KD (Nagai et al., 2000). V molekulárno-biologickej diagnostike sa táto „relatívna špecificita“ uplatňuje okrem iného pri detekcií MRD u NBL, kde s úspechom využívame dôkaz transkriptu mRNA génu pre tyrozín hydroylázu (*TH*, enzým podieľajúci sa na tvorbe nonadrenalinu a adrenalinu), neuroendokrinného proteínu 9.5 (*PGP 9.5*) a iné. Všetky tieto znaky sú prítomne vo vysokom percente v bunkách NBL, ale nikdy nie v bunkách KD alebo PK. V súčasnej dobe nie je známa žiadna konštantná translokácia, ktorú by bolo možné využiť k priamemu, špecifickému dôkazu NBL (Cheung et al., 2003; Mattano et al., 1992; Naito et al., 1991).

Citlivosť metódy by však nemala byť jediným kritériom výberu. V určitých situáciách ďaleko viac záleží na voľbe vhodného znaku alebo skúseností pracovníkov- menej citlivá metóda môže byť prínosnejšia (Eckschlager and McClain, 1996). Vyššiu

citlivosť je možné dosiahnuť buď separáciou buniek nesúcich vybraný znak (imunomagnetickými partikulami, podľa imunofenotypu či prítomnosti pre nádor špecifického proteínového antigénu prietokovým cytometrom- sorterom) alebo kultiváciou (po krátkodobej kultivácii sa nádorové bunky množia rýchlejšie a na úkor buniek normálnych). V oboch prípadoch je následne použitá imunologická alebo molekulárno-biologická metóda detekcie MRD (Berois et al., 1997; Kasimir-Bauer et al., 2001; YerlyMotta et al., 1996). Nespornou výhodou kultivačných metód je dôkaz len proliferácie schopných a teda vitálnych buniek. Ostatné metódy môžu detekovať i nevitálne bunky a PCR dokonca DNA z rozpadnutých buniek. U FISH a RT-PCR je riziko dôkazu nevitálnych buniek menšie, pretože v priebehu apoptózy alebo nekrózy nastáva zmena jadra, ktorú je možné behom vyšetrenia FISH zistiť. Pri RT-PCR je nutná prítomnosť mRNA, ktorá je však v poškodených bunkách rýchlo enzymaticky degradovaná. Z vyššie uvedeného vyplýva, že hlavným predpokladom úspešnej detekcie MRD je voľba pre nádor špecifického znaku (resp. kombinácie znakov) unikátneho pre nádorové bunky a výber vhodnej, teda dostatočnej citlivej metódy k jej preukázaniu.



Metóda	Citlivosť metódy	Podstata metódy
Morfológia	1:10 <sup>2</sup>	morfologická odlišnosť nádorovej bunky
Konvenčná cytogenetika	1:10 <sup>2</sup>	dôkaz špecifickej chromozomálnej aberácie
Southern blot	1:10 <sup>2</sup>	dôkaz špecifickej sekvencie DNA- chromozomálna aberácia alebo mutácia
FISH	1:10 <sup>3</sup>	dôkaz špecifickej sekvencie DNA- chromozomálna aberácia
Imunologické metódy	1:10 <sup>4</sup>	dôkaz prítomnosti nádor špecifického antigénu alebo kombinácie antigénov
PCR	1:10 <sup>5</sup>	dôkaz špecifickej sekvencie DNA- chromozomálna aberácia alebo mutácia
Nested RT-PCR	1:10 <sup>6</sup>	dôkaz špecifickej sekvencie RNA- chromozomálna aberácia alebo mutácia

**Tabuľka 1** Porovnanie citlivosti metód používaných k detekcii MRD

Zásadným problémom s ktorým sa pri stanovení MRD stretávame, je veľmi nízke zastúpenie nádorových buniek vo vyšetrovaných kompartmentoch, čo je často komplikované samotnou odlišnosťou nádorových buniek od fyziologickej populácie. Riešením je nutnosť použitia veľmi senzitívnych a špecifických diagnostických metód.

### 1.3 Techniky detekcie MRD

Cytologický i histologický screening vzoriek kostnej drene je stále akceptovaný ako zlatý štandard pre počiatočné určenie štádia u pacientov s neuroblastómom, no tieto metódy sú však nedostatočné počas alebo po terapií, pretože nie je vždy možné detekovať infiltráciu nádorových buniek pod 1% len samotným cytomorfológickým vyšetrením. Pre tento účel boli stanovené nové metódy v posledných dvoch desaťročiach, založené na expresii biologických (napr. imunologických, cytogenetických a molekulárno-genetických) markerov cirkulujúcich nádorových buniek. Väčšina týchto techník preukázala značne vyššiu senzitivitu než cytomorfológia. Využívame pri tom spomenuté metódy molekulárnej biológie, kam zaraďujeme polymerázovú reťazovú reakciu (Polymerase Chain Reaction, PCR,) a jej modifikácie: reverzne transkriptázovú polymerázovú reťazovú reakciu (RT-PCR, Reverse Transcription PCR), kvantitatívnu reverzne transkriptázovú polymerázovú reťazovú reakciu v reálnom čase (QRT-PCR, Reverse Transcription quantitative PCR). Ďalšími metódami detekcie sú prietoková cytometria (FC, Flow cytometry) a imunocytochémia (IC, Immunocytochemistry).

### 1.3.1 Cytomorfológia neuroblastómu

Počiatkové cytomorfológické vyšetrenie s využitím farbiva Wright-Giemsa a následným ofarbením nádorových buniek je zahrnuté v odporúčaní INSS (International Neuroblastoma Staging System). Najčastejšie sa MRD vyšetruje v KD. Avšak bunky NBL môžu uniknúť ich mikroskopickej detekcii, kvôli ich relatívne nešpecifickej morfológii najmä, keď sú prezentované ako samostatné bunky. Navyše detekcia diseminovaného ochorenia je navyše komplikovaná nerovnomernou distribúciou nádorových buniek v tele, čo môže viesť k falošne negatívnemu výsledku pri využití klasickej cytologie a histologie. Z toho dôvodu bola pre precíznejšie posúdenie infiltrácie KD vyzdvihnutá analýza odberu aspoň dvoch punkátov bedrovej kosti (Mehes et al., 2003). Náter KD je považovaný za reprezentatívny a vhodný pre kvantitatívne vykávanie ochorenia keď je infiltrácia nádorových buniek >5%. V čase stanovenia diagnózy sa odporúča bilaterálna jadrová ihlová biopsia pre histológiu a IHC a bilaterálna aspirácia KD pre cytológiu, IC, QRT-PCR u všetkých detí v dobe stanovenia diagnózy a v skupine detí vysokého rizika v čase vyhodnocovania odozvy na konci indukčnej terapie. Ďalšie časové body môžu byť špecifikované podľa liečebných protokolov.

U mladších alebo menších kojencov sa jadrová ihlová biopsia neodporúča, pretože veľkosť a kvalita biopsie nie je dostatočná pre tak robustnú analýzu.

Cytomorfológická detekcia okulturných nádorových buniek je teda limitovaná určitými faktormi (morfológiou malých modrých guľatých buniek nádoru, nedostatočným množstvom nádorových ložísk, nedostatočnou kvantifikáciou) (Mehes et al., 2003). Bunky s okrúhlymi jadrami, často, no nie vždy väčšie než malé lymfocyty zobrazujúce granulóznu štruktúru chromatinu a vzácne množstvo cytoplazmy považujeme za pozitívne. Nádor je tak tvorený malými uniformnými bunkami s hyperchromatickým jadrom. Nádorové bunky majú minimálny lem cytoplazmy a tendenciou vytvárať rozety. Bunky zobrazujúce nízke množstvo jadrového alebo cytoplazmatického podielu alebo s typickými morfológickými rysmi hematopoetických buniek sú hodnotené ako negatívne. Bunky nachádzajúce sa mimo alebo na hranici cytoplazmatického ohraničenia sú vylúčené. Diferenciálna diagnostika závisí na lokalizácii primárneho nádoru a na klinickom štádiu. Histologicky je nevyhnutné odlišiť ostatné detské nádory zo skupiny nádorov z „malých tmavých guľatých buniek“. Tam patria okrem NBL ešte maligné nonhodgkinské lymfómy, Ewingov sarkóm, rabdomyosaróm a niektoré ďalšie vzácnejšie.

Klasickým cytomorfoloickým vyšetrením náteru KD nepreukážeme menej ako 2-5% nádorových buniek. To odpovedá približne  $10^{10}$  nedetekovateľných nádorových buniek v celom organizme. Cytomorfologické vyšetrenie väčšinou nie je schopné preukázať infiltráciu menšiu než 1-0,1%. Toto vyšetrenie preukáže jednu nádorovú bunku medzi 200 bunkami kostnej drene. Cytocentrifugáciou alebo separáciou vyšetrovanej vzorky je možné citlivosť metódy zvýšiť až na 1% (Janossy et al., 1988).

Metóda	Citlivosť	Rýchlosť	Náročnosť	Náklady
<b>Morfológia</b>	1:10 <sup>2</sup>	1 deň	***	nízke
<b>Prietoková cytometria</b>	1:10 <sup>4</sup>	1 deň	**	nízke
<b>RT-PCR</b>	1:10 <sup>5</sup>	2-3 dni	**	stredné
<b>QRT-PCR</b>	1:10 <sup>5-6</sup>	2-3 dni	**	vysoké

**Tabuľka 2** Porovnanie techník v závislosti od citlivosti, rýchlosti, náročnosti a nákladnosti (\* označuje náročnosť na pracovníkov)

### 1.3.2 Prietoková cytometria

Prietoková cytometria (Flow Cytometry, FC) je založená na analýze mikroskopických častíc (bunky, chromozómy), ktoré prechádzajú detekčným systémom v prúde roztoku. Umožňuje to simultánnu analýzu viacerých parametrov a charakterizáciu tisícov častíc za sekundu. Detekčný systém sa obvykle skladá z jedného alebo viacerých laserov, ktoré spôsobujú excitáciu fluorochrómov naviazaných na protilátkach do vyššieho energetického stavu a emisiu fotónov. Z hľadiska imunológie je možné stanoviť priamu väzbu fluorescenčne značeného antigénu na povrch buniek. V súčasnosti je komerčne dostupné veľké množstvo fluorescenčne značených protilátok. Moderné prietokové cytometre majú vyšší počet detektorov a umožňujú simultánne viacnásobné značenie protilátkami. Niektoré z nich vedia digitálne zobrazit' jednotlivé bunky a lokalizovať fluorescenčný signál priamo na ich povrchu. Z hľadiska imunológie je tak možné nielen stanoviť imunologický stav, ale urobiť aj imunofenotypizáciu hematopoetických buniek v rozdielnom štádiu dozrievania (Robinson et al., 1996).

V detekcii MRD využívame prietokovú cytometriu predovšetkým dvoma spôsobmi:

1. Identifikácia pre nádor špecifického antigénu alebo antigénnej kombinácie
2. Detekcia DNA aneuploidných buniek

Veľmi zriedkakedy nájdeme len jeden antigén, ktorý je špecifický pre nádorovú bunku. Väčšinou sa jedná o unikátnu kombináciu nešpecifických antigénov. Najlepšie preštudovanými sú leukocytárne antigény. Vyskytujú sa nielen na normálnych leukocytoch ale taktiež na bunkách leukémií či lymfómov. Predovšetkým pri ich diagnostike je prietokový cytometer nezastupiteľný. Stále častejšie je používaný u solídnych nádorov. Pre cytometrickú analýzu DNA je vypracovaná rada postupov, z ktorých najznámejšie sú rôzne modifikácie farbenia podľa Vindelova (Robinson et al., 1996). Meria sa relatívna fluorescencia farbiva (propídium jodid), ktoré sa stechiometricky viaže na jadernú DNA. Nie je možné preto vyhodnotiť presný počet chromozómov, ale len obsah DNA vzťahujúci sa k známemu diploidnému štandardu. Prietokovým cytometrom stanovujeme DNA plošiu a vyjadrujeme ju DNA indexom (DI). Ten udáva, koľko krát je obsah DNA v nádorovej bunke zmnožený oproti obsahu DNA v normálnej bunke vo fáze  $G_0/G_1$  bunčného cyklu (bunky v  $G_0$  a  $G_1$  fáze nie je možné prietokovým cytometrom odlišit'). U DNA aneuploidných nádorov je tiež možné k detekcii MRD použiť cytometrickú DNA

analýzu (Campana, 1993). Pozitívny výsledok je definovaný ako zhluk najmenších 10-20 FC signálov v dot plot (Campana and Coustan-Smith, 2002). Falošnú negativitu môže spôsobiť prechodná alebo aj trvalá zmena vlastností nádorových buniek po chemoterapii pri zachovaní ich vitality (Campana et al., 1991). Hlavnou výhodou prietokovej cytometrie je rýchlosť vyšetrenia, množstvo vyšetrených buniek ( $10^{3-4}$  buniek/min) a nízke náklady (Eckschlager et al., 1999).

Obecne je ale možné povedať, že molekulárno-biologické metódy dosahujú vyššiu citlivosť než prietoková cytometria. Z nutnosti identifikovať zriedkavé nádorové bunky medzi prevažujúcou fyziologickou populáciou vyplynula potreba viacfarebnej prietokovej cytometrie, ktorá umožnila dosiahnuť senzitivitu  $10^{-4}$ , ale aj napriek tomu sa stretávame s analýzou na hranici technických možností cytometra. Ďalšou komplikáciou býva nestabilita imunologických profilov nádorových buniek ako aj v priebehu ochorenia, tak predovšetkým v priebehu liečby. Selektívny tlak vytváraný protinádorovou terapiou však môže viesť k selekcií pôvodne minoritných klonov a následnej zmene imunologických charakteristík nádoru, čo nemusí byť pri analýze MRD vychádzajúceho z imunofenotypu stanoveného pri diagnóze zistené a môže viesť k chybným interpretáciám výsledku. Tento výsledok je však vykúpený jednak dlhšou dobou laboratórnej odozvy, vysoko špecifickými požiadavkami na kvalitu preanalytickej fázy a v neposlednej rade i cenou za vyšetrenie.

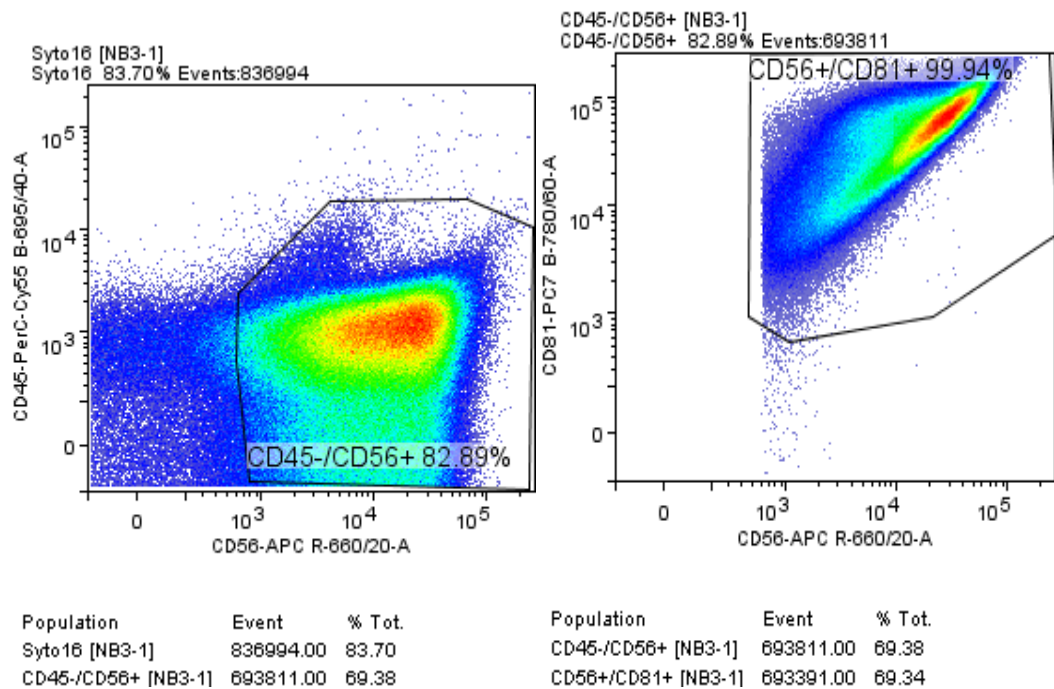
### 1.3.2.1 Využitie prietokovej cytometrie pri stanovení MRD

Využitie FC- kombinácie *CD45*, *CD56*, *CD81*, *CD99*, *EpCAM*, *GD2*, *nuMYOD*, *numyogenin* a *CD271* spolu s inými špecifickými markermi ako sú B-bunky (napr. *CD19*) a T-bunky (napr. *c<sub>y</sub>CD3*) sa javí ako obzvlášť užitočná a rýchla pre diagnostický screening nádorov detského veku. U všetkých pediatrických solídnych tumorov bol najčastejšie skúmaný marker *CD56*, ktorý je u nich najviac exprimovaný. Avšak množstvo v akom je exprimovaný závisí od jednotlivých subtypov nádorov. Najvyššie hodnoty expresie boli detekované u NBL a PNET (Primitive Neuroectodermal Tumor). *CD9* a *CD81* ako jednotlivé markery boli na základe heterogenity a variability expresie označené ako klinicky limitujúce z hľadiska diferenciálnej diagnostiky medzi NBL a inými nádormi detského veku. Avšak v kombinácii s inými molekulami prispievajú k rozlíšeniu NBL a PNET (Ferreira-Facio et al., 2013).

K detekcii MRD u NBL je najčastejšie používaná antigénna trojkombinácia  $CD45^-/CD81^+/CD56^+$ , prípadne  $CD45^-/CD9^+/CD56^+$  (Komada et al., 1998; Nagai et al., 2000). Štúdia preukázala, že tento imunofenotyp sa nenachádza na nenádorových bunkách. Neuroblastóm však nie je jediný solídny nádor detského veku, ktorý tento imunofenotyp exprimuje. Imunofenotyp  $CD45^-/CD81^+/CD56^+$  nie je špecifický len pre NBL a nie je možné ho preto použiť k jeho jednoznačnému preukázaniu. Je detekovateľný nielen u NBL ale i ostatných maligných nádorov. Môžeme ho teda využiť k ich odlíšeniu od benigných afekcií. Nevyhnutnou podmienkou je však preukázanie vysokej expresie v primárnom nádore. Zároveň je zaujímavý pomerne nízky výskyt expresiu u Ewingovho sarkómu (ES). Napriek tomu, že NBL a ES majú rovnaký pôvod neuroektoderme, nemá príbuzný pôvod týchto nádorov vplyv na expresiu  $CD45^-/CD81^+/CD56^+$ . Vyšetrovanie MRD ES v KD dôkazom imunofenotypu  $CD45^-/CD81^+/CD56^+$  je možné doporučiť len so znalosťou expresie v primárnom nádore.

Prvá triple-colour prietoková cytometria bola vyvinutá na detekciu rozšírených neuroblastómových buniek v periférnej krvi a v kostnej dreni Komadam a spolupracovníkmi. Vzorka bola založená na detekcii už spomenutých kombinácií antigénov  $CD9^+$ ,  $CD56^+$  a  $CD45^-$ . Rôzne *in vitro* štúdie potvrdili zhodnú expresiu  $CD9^+$  na neuroblastómových bunkách.  $CD9$  reaguje s 24-kDa typ III transmembránovým proteínom, ktorý je exprimovaný na krvných doštičkách, epiteliálnych a endoteliálnych bunkách, monocytoch, aktivovaných T-bunkách, svalových bunkách a pod. (Komada et al., 1986).  $CD56$  reaguje s izoformou 175/220kDa glykozylovaného antigénu prezentovaného na NK bunkách (natural killer cells), podskupine  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T-buniek v periférnej krvi, odvodených nervových bunkách, veľkých granulovaných lymfocytoch, pri myeloidnej leukémii, neuroblastómu, malých buniek pľúcneho karcinómu a myelómu (Lipinski et al., 1987).  $CD45$  reaguje s izoformami leukocytárnych antigénov ľudských bielych krviniek, lymfocyty, monocyty, granulocyty. Nie je exprimovaný v bunkách NBL liní.  $CD81$  identifikuje 26-kDa transmembránový proteín typ III (TAPA-1), ktorý zohráva úlohu v raste buniek a a signálnej transdukcií. Je exprimovaný na bunkách hematopoetického pôvodu, bunkách NBL, navyše je prítomný aj na endoteliálnych a epiteliálnych bunkách (Oren et al., 1990). Komadova prietoková cytometria bola neskôr modifikovaná Nagaiom a spolupracovníkmi. Tí nahradil marker  $CD9$  za  $CD81$ , pretože mali podozrenie, že interakcia medzi  $CD9$  a krvnými doštičkami môže viesť k ich agregácií a prietokový

cytometer ich vyhodnotí ako pozitívny. A práve trombocyty sú v  $CD45^-$  frakcií vyšetrovanej vzorky prítomné vo veľkom množstve. Podstatnejšou nevýhodou  $CD9$  znaku je slabšia pozitivita alebo úplné chýbanie vo vzorkách primárnych nádorov a neuroblastómových línii oproti znakom  $CD81$  a  $CD56$ , ktoré sú exprimované stabilne. Expresia imunofenotypu  $CD45^-/CD9^+/CD81^+$  je teda značne preukázaná aj v rade ďalších solídnych nádorov detského veku (nefroblastómy, lymfómy, maligné mezenchymálne nádory, Ewingov sarkóm) (Komada et al., 1989; Nagai et al., 2000).



**Obrázok 1** Výsledok vyšetrenia FC- preukázanie buniek nesúcich fenotyp  $CD45^-/CD56^+$  v KD pacienta s NBL



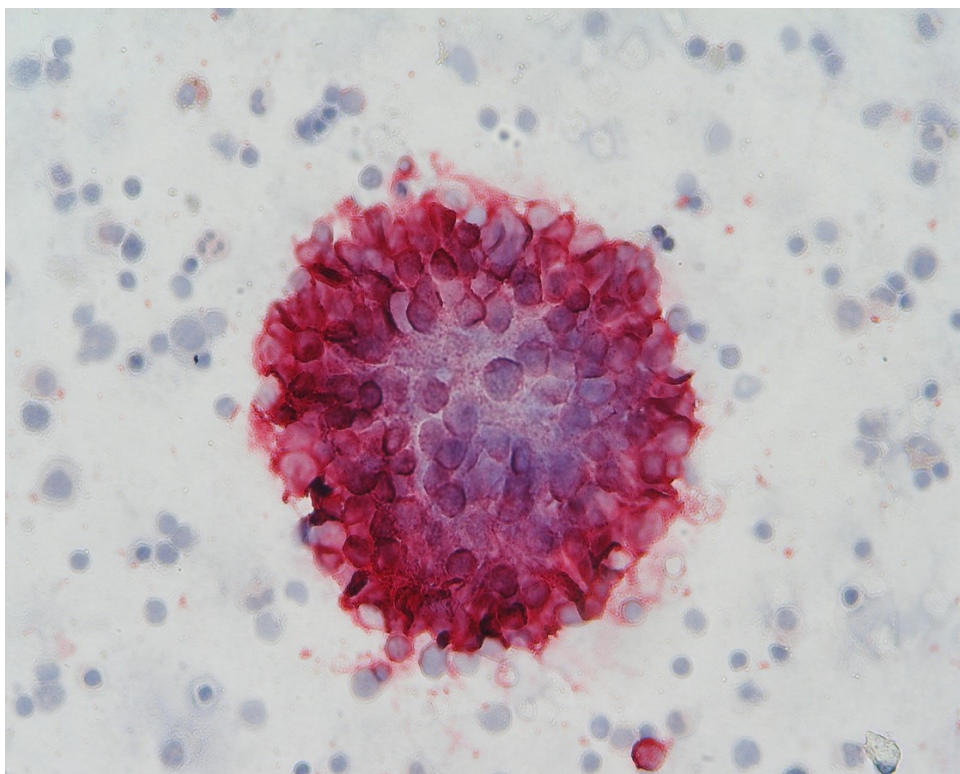
### 1.3.3 Imunocytochémia

Imunocytochémia je metóda, ktorá využíva väzby spravidla monoklonálnych protilátok na nádorové, (nikdy nie normálne, hematopoetické) antigény. Naviazaná protilátka sa enzymaticky detekuje a prebehnutá reakcia sa posudzuje vo svetelnom mikroskope (Kvalheim, 1998). Rozlíšenie svetelného mikroskopu umožňuje detailnejšie hodnotenie cytomorfológie imunopozitívnych alebo imunonegatívnych buniek, čo je dôležité pri rozoznávaní medzi NBL bunkou a hematopoetickou bunkou s naviazaným antigénom ako je napr. makrofág. Na imunocytochemickú detekciu je preferovaná metodika založená na báze alkalín-fosfátu na rozdiel od chrovej peroxidázy (HRP), kvôli vyhnutiu sa falošne pozitívnym výsledkom a nadbytočnej expresii enzýmu v nenádorových bunkách KD. Citlivosť metódy sa pohybuje podľa jednotlivých literárnych údajov od  $1:10^4$  -  $1:10^6$  (Moss, 1999). Je ovplyvnená počtom vyšetovaných buniek a rovnako tak aj výberom vhodnej protilátky. Tá musí byť maximálne špecifická a zároveň dostatočne citlivá. Väčšinou sa využíva zmes rôznych epitopov pre daný antigén, napr. proti cytokeratínu (CK) A45-B/B3. Cytokeratín je proteín, ktorý sa vyskytuje na epiteliálnych bunkách aj nádorových (karcinóm), ale nikdy na bunkách KD alebo PK. Táto protilátka sa využíva ako štandardný znak pre dôkaz mikrometastáz epiteliálnych nádorov v KD. Prospektívne klinické štúdie ukázali, že imunologické metódy založené na anti-CK protilátke môžu pomôcť určiť skupinu pacientov, ktorí majú v dobe stanovenia diagnózy prítomnú MRD v KD, tým spresniť rozsah ochorenia (Bischoff et al., 2003; Braun et al., 2000; Moss, 1999). Metóda navyše umožňuje presnejšie posúdiť morfológiu vyšetrovanej bunky (veľkosť, tvar) a tým rozoznať napr. bunky NBL od buniek KD alebo PK. Pri imunocytochemickom ako aj v imunofluorescenčom vyšetrení sa najskôr automaticky vyhľadajú podozrivé bunky a ich súradnice sa uložia do pamäti počítača. Jednotlivé bunky sú potom individuálne posudzované na základe počítačového a mikroskopického zobrazenia. Bunky musia byť viditeľné ako silne červeno ohraničené po celej oblasti bunkovej membrány a cytoplazmy. Slabé sfarbenie a sfarbenie obmedzené na subcelulárne kompartmenty bunky sa považuje za negatívne. Bunky obklopené pozitívnym značením amorfného tvaru sú vylúčené (Mehes et al., 2001). Používaná imunocytochémia, ktorá pre dôkaz NBL buniek používa rovnaký antigén GD2 a navyše môže presnejšie posúdiť morfológiu vyšetrovanej bunky (jej veľkosť, tvar, uloženie a veľkosť jadra) a tým rozoznať NBL bunky od buniek KD a PK. Imunocytochemické metódy môžu vykazovať falošne

pozitívne výsledky. To môže byť zapríčinené prijatím GD2 nádorovej bunky hematopoetickými bunkami. Veľmi malé množstvo zrelej plazmy buniek produkuje protilátky proti alkalín-fosfatáze, čo môže viesť k falošnej pozitivite, predtým ako reagujú priamo s enzýmom (Borgen et al., 1998). Nelegitímna expresia cieľového antigénu, krosreaktivita aplikovanej monoklonálnej protilátky a interakcia medzi protilátkami a receptormi leukocytov môžu takisto viesť k falošne pozitívnemu výsledku. Nevýhoda imunocytochemických metód zahŕňa obmedzenia, ktoré sa týkajú multiparametrickej analýzy. Z dôvodu chemickej povahy a rozmeru chromogénov, len dva separované markery, môžu byť detekované v rovnakom čase (Combaret et al., 1989). Imunnocytochémia je relatívne lacná metóda, pretože nevyžaduje žiadne špecifické prístroje, okrem klasického svetelného mikroskopu.

#### **1.3.3.1 Využitie Imunocytochémie pri stanovení MRD**

V detskej onkológii má táto metóda najväčší prínos u NBL. Jeden z najdôležitejších antigénov exprimovaných na nádorových bunkách neuroektodermálneho pôvodu vrátane neuroblastómu a melanómu je GD2 disialogangliosid. U pacientov s NBL bolo zistené, že majú významne zvýšené hladiny voľných GD2 v sére v porovnaní so zdravými deťmi a s deťmi, ktorým bol diagnostikovaný iný typ nádoru. Protilátkou proti diasialoglosidu antiGD2 (14GD2) sa nádorové bunky preukazujú v KD, poprípade v PK. Infiltrácia GD2 pozitívnych buniek KD má negatívny dopad na prežitie u pacientov s týmto ochorením (Corrias et al., 2008). GD2 je stabilne exprimovaný na bunkách nádoru a je zachovaný aj v priebehu liečby ochorenia (Kramer et al., 2001). GD2- IC analýza môže mať potenciál pri rozlišovaní rozličných rizikových skupín pacientov.



**Obrázok 2** Bunky neuroblastómu značené GD2 protilátkou

### 1.3.4 QRT-PCR

Polymerázová reťazová reakcia (PCR, Polymerase Chain Reaction) je reakcia založená na enzymatickej amplifikácii špecifického úseku nukleovej kyseliny, ktorý je lokalizovaný medzi párom primerov (oligonukleotidov). Celý proces môžeme rozdeliť na 3 základné fázy: denaturácia, annealing (hybridizáciu) a syntézu. V cyklickej reakcii v 3 odlišných teplotných fázach dochádza k syntéze miliónov kópií sekvencie DNA (McPherson, Moller 2000).

Metóda PCR má v dnešnej dobe radu variant a modifikácií, základný princíp tejto metódy však zostáva rovnaký. Zásadnou modifikáciou klasickej PCR je kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR) v reálnom čase alebo real-time PCR (McPherson, Moller 2000). Na rozdiel od ostatných modifikácií PCR, kde detekujeme až výsledný produkt (end-point detection), tu môžeme sledovať prírastky DNA behom každého cyklu. Základnou zmenou oproti klasickej PCR je fluorescenčný substrát, ktorý sa dokáže naviazať na DNA a prístroj, ktorý túto fluorescenciu dokáže zachytiť (Logan et al. 2009). PCR môže byť použitá i pre amplifikáciu RNA. Pri reverzne transkriptázovej polymerázovej reťazovej reakcii (RT-PCR) prepisujeme vyizolovanú RNA do cDNA a tu potom následne pomocou PCR amplifikujeme (Bustin et al. 2005). Prepis RNA do cDNA nám umožní sledovať génovú expresiu na úrovni mRNA. Z technického hľadiska RT-PCR detekcia tkanivovo-špecifického markeru vyžaduje znalosť génovej sekvencie a intrón-exón spojenia, ktoré uľahčuje výber oligonukleotidových primerov pre RT-PCR (Qui et al., 1990). Detekcia MRD pomocou metódy QRT-PCR je v podstate štúdium génovej expisie, kde hľadaným znakom nádorových buniek je informačná messengerová RNA. Nádorové bunky sa od normálnych zdravých buniek na molekulárnej úrovni líšia svojím expresným profilom, to znamená že nádorová bunka exprimuje iné gény zo svojej výbavy, čo sa prejaví zmenou množstva a spektra exprimovanej mRNA.

V princípe PCR amplifikácia tkanivovo-špecifickej mRNA ponúka niekoľko výhod v porovnaní s metódami založenými na báze proteínov:

- a) RNA je veľmi nestabilná v extracelulárnom prostredí, jej detekcia by mala indikovať prítomnosť nádorových buniek v tkanive alebo telesnej tekutine

b) tkanivovo špecifická mRNA môže indikovať prítomnosť nádorových buniek napriek negatívne proteínovému testu (Hrstka et al., 2014).

RT-PCR amplifikácia tumor-špecifickej mRNA bola prvý krát použitá pri detekcii t(9;22) translokácie chronickéj myeloidnej leukémie (Lee et al., 1987). QRT-PCR v porovnaní s klasickou RT-PCR umožňuje precíznejšiu kvantifikáciu jednej alebo viacpočetných mRNA v klinických vzorkách. Touto metódou sme schopní rozlíšiť jednu nádorovú bunku medzi  $10^6$  buniek kostnej drene. Predovšetkým tam kde k preukázaniu mRNA nevyužívame špecifickú translokáciu, ale len špecifickú expresiu génov (*TH*, *DCX*, *PHOX2B*), nie je možné priame meranie absolútneho počtu buniek, pretože úroveň cieľovej mRNA môže byť v bunke rôzna. Odlišný nádor, odlišná expresia. To je hlavne dôležité pre definovanie klinicky relevantnej hladiny MRD pri stanovení diagnózy a neskôr aj počas ochorenia. Hlavnou podmienkou pre získanie presných výsledkov je výber optimálnej referenčnej mRNA v pomere ku ktorému normalizujeme množstvo testovanej mRNA (Beillard et al., 2003; Viprey et al., 2007).

Pri niektorých vyšetreniach sa využívajú cieľovo-špecifické kalibrátory, ktoré umožňujú presnú kvantifikáciu transkriptu. Ďalej tak hodnotu transkriptu housekeeping kontrolného génu musíme považovať za relatívnu kvôli inter-assay variabilite. No práve extrémna citlivosť tejto techniky má tendenciu viesť k tvorbu falošne pozitívnych výsledkov, pokiaľ nie sú dodržané dostatočné opatrenia aby sa zabránilo kontaminácií vzoriek. Falošná pozitivita môže byť spôsobená pri nelegitímnej transkripcii. Aj keď je počet týchto transkriptov v nežiadúcich bunkách veľmi nízky (odhadovaný počet je jedna molekula mRNA na 100-1000 buniek) vo výsledku to môže mať za následok falošnú pozitivitu vzoriek vzhľadom na vysokú citlivosť RT-PCR. Napríklad neurón-špecifický marker *PGP 9.5* sa ukázal byť prítomný v obmedzenom množstve v normálnych bunkách KD. Pseudogény môžu taktiež vykazovať falošnú pozitivitu. Kvôli nedostatku ich intrónovej sekvencie RT-PCR amplifikácia pseudogénov bude viesť k tomu, že PCR produkty nebudú rozpoznateľné od tých, ktoré sú uvoľnené z mRNA. Súčasný RT-PCR testy na detekciu CTCs a mikrometastáz sú limitované nedostatkom tkanivo-špecifických markerov u solídnych tumorov. Následkom toho sa falošne pozitívne výsledky objavia v nešpecifických markeroch ako je albumín, epiteliálny membránový antigén, estrogénové receptory a testujú sa v kontrolných vzorkách. A to hlavne v prípade keď sú tieto nedostatočne špecifikované markery testované v komplexných tkanivách obsahujúcich

rôznorodé typy buniek, napríklad v KD a lymfatických uzlinách (Mehes et al., 2003). Pretože je väčšina markerov u solidných tumorov tkanivovo-špecifická, samovoľné uvedenie normálnych alebo benigných buniek v obehú po invazívnych procedúrach môže takisto viesť k falošnej pozitivite PCR výsledkov. Falošne pozitívnym výsledkom môžeme zabrániť plánovaním RT-PCR testov niekoľko týždňov po akejkoľvek invazívnej procedúre (Mehes et al., 2001). Falošne negatívne výsledky môžeme očakávať pri detekcii okultných nádorov buniek v prípade, kde je očakávaná nízka úroveň signálu. Inhibítory prítomné v niektorých tkanivách alebo telesných tekutinách môžu znižovať senzitivitu PCR. Preto je nevyhnutné vykonať bezpečné kontroly pre amplifikáciu RNA alebo DNA vo vzorke. To je následne vykonané zosilnenou amplifikáciou konštitutívne prítomného transkriptu ako je napr. aktín. Falošná negativita výsledkov môže byť zapríčinená aj v dôsledku technických nedostatkov ako je vynechanie roztoku alebo činidla, alebo môže nastať problém pri spracovávaní vzorky, pretože len pár mililitrov periférnej krvi je analyzovaných v určitom čase. Neskôr to môže byť spôsobené prerušovaným vylučovaním nádorových buniek do obehú. Tento problém je možné odstrániť sekvenčným vzorkovaním, ktoré je definované ako analýza početných vzoriek krvi v rozličných časových odstupoch. Falošne negatívne výsledky môžu byť taktiež zapríčinené aj zníženou reguláciou cieľového génu v dôsledku terapie (napr. hormonálna liečba) alebo prítomnosťou nedostatočne diferencovaných subklonov, ktoré neexprimujú testovaný tkanivovo-špecifický marker. Využitím viacpočetných markerov je možné redukovať vznik falošne negatívnych výsledkov (Mehes et al., 2003).

Kvantitatívne PCR metódy sú však neschopné odhadnúť množstvo prítomných nádorových buniek v testovanej vzorke mRNA, pretože transkripčné tempo (množstvo cieľovej mRNA) je rozličné medzi individuálnymi nádorovými bunkami. Tento fakt signifikantne limituje hodnotu kvantifikácie PCR pri detekcii okultných nádorových buniek. Kombinácia dvoch alebo viacerých možných techník sa javí ako najlepšia možnosť ako prekonať problémy s falošne negatívnymi alebo falošne pozitívnymi výsledkami pri detekcii vzácnych nádorových buniek. Napríklad kombinácia imunocytologických a PCR techník môže byť použitá na zredukovanie rizika falošne pozitívnych alebo falošne negatívnych výsledkov.

#### 1.3.4.1 Využitie QRT-PCR pri stanovení MRD u NBL

Sutterheim a jeho spolupracovníci vo svojej štúdií preštudovali kandidátne gény zo SAGE knižníc, ktorých vysoká expresia bola identifikovaná v neuroblastómovom tkanive a naopak nízka alebo žiadna hladina v nenádorovom tkanive. Na základe expresie detekovanej prostredníctvom metódy QRT-PCR vybrali markery na porovnanie s GD2. Porovnaním týchto markerov zistili, že všetky boli exprimované v NBL bunkách, ale so značnou variabilitou. Následne vytvorili skupinu najvhodnejších génov pre KD a PK u NBL. Gény *PHOX2B* (*Paired-like homeobox 2b*) *TH* (*Tyrosine hydroxylase*) *DDC* (*Dopa decarboxylase aromatic L-amino acid decarboxylase*), *CHRNA3* (*cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3*) a *GAP43* (*Growth associated protein 43*) boli stanovené pre panel vzoriek KD. Gén *DBH* (*Dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase)*) bol preukázaný ako vhodný marker pre PK. Medzi *PHOX2B*, *TH*, *DDC* a *DBH* je značná korelácia v expresii mRNA, všetky štyri sú u NBL exprimované a môžeme ich využiť k detekcii. Biologický význam génov *CHRNA3* a *GAP43* je však menej známy a vyžaduje ďalšie štúdium (Stutterheim et al., 2009). Na základe vykonaných štúdií sa *PHOX2B* javí ako najvhodnejší marker k detekcii MRD u NBL. Nebol exprimovaný u zdravých kontrol v KD ani PK. Výsledok analýzy poukazuje na jeho vysokú špecificitu pri detekcii (Cargnin et al., 2005). Úroveň hladiny už spomenutého *DDC* v KD a PK je nižšia a táto úroveň nie je pre nás užitočná a spoľahlivá až v takom rozsahu ako úroveň *TH* pri detekcii ochorenia. Vysoká hladina *TH* mRNA v KD v čase stanovenia diagnózy, jasne indikuje nepriaznivú predpoveď a môže byť použitá pri stratifikácii pacientov do liečebných skupín v klinických štúdiách (Trager et al., 2008).

V ďalšej štúdií boli skúmanými markermi pre detekciu MRD u NBL *PGP9.5*, *ELAVL4*, *GALGT* spolu s *TH*. *PGP9.5* (*protein gene produkt 9.5*) je neurón špecifický proteín. *PGP9.5* patrí k hlavným cytoplazmatickým polypeptidom nervových buniek. Pozitivita *PGP9.5* značí prítomnosť cirkulujúcich nádorových buniek u pacienta s NBL (Louthan, 2006). *ELAVL-4* (*Drosophila-like4*) patriaci do skupiny génov rodiny *elav* (*Drosophila melanogaster*) bol označený ako značne špecifický pre nádory neuroektodermálneho pôvodu a *GD2 syntetáza* (*GALGT*) takisto exprimovaná u nádorov odvodených z neurálnej lišty (NBL, melanómy). Štúdiá potvrdili, že *PGP9.5* je ale taktiež exprimovaný v iných typoch neuroendokrinných nádorov a tak, nie je až tak dostatočné

špecifický pre NBL. Naopak, čo sa týka senzitivity vykázal v porovnaní s *TH*, *ELAVL4* a *GALGT* najväčšiu citlivosť (1:10<sup>7</sup>). Ako marker pre detekciu MRD u NBL je teda veľmi užitočný, avšak iba u pacientov u ktorých už bol diagnostikovaný NBL, pretože má nižšiu špecificitu než *TH*. V kombinácií s inými neuroendokrinnými markermi pre detekciu MRD je vhodný (Ootsuka et al., 2008).

Niekoľko transkriptov, bolo označených aj ako menej vhodných, mnohé z nich v dôsledku nešpecifickej reakcie s inými bunkami v KD a PK, čo je v súlade s ďalšími zisteniami z iných štúdií (Trager et al., 2009). Hoci sú napr. *GD2S* (*Acetylgalactosaminyltransferase*) a *DCLK1* (*Doublecortin-like kinase 1*) taktiež exprimované na bunkách NBL, preukázali nedostatočnú špecificitu pretože boli detekované aj v normálnych hematopoetických bunkách. Štúdie ukázali, že *GD2S* mRNA, nie je vhodná ako samostatný marker pre detekciu okultných nádorových buniek NBL (Viprey et al., 2008). Koncentrácia transkripcie jednotlivých génov sa však smie líšiť v závislosti od jednotlivých buniek a tkanív. Rozdiel v bunčných líniách môže byť zodpovedný za niektoré rozdiely vo výsledkoch, pretože v každej rozličnej bunčnej neuroblastómovej línií sa môže značne líšiť pomer špecifických cieľových transkriptov v bunke. Dôvodom prečo sa taktiež môžu niekedy výsledky v štúdiách líšiť, je rozličný proces výberu kandidátnych génov a metodík (Trager et al., 2008).

Okrem toho obsiahle multivariabilné analýzy preukázali, že úroveň mRNA po skončení terapie nemá prediktívnejšiu hodnotu než hodnota mRNA v dobe stanovenia diagnózy, z čoho vyplýva, že naopak hladina mRNA v dobe stanovenia diagnózy bude hlavným determinantom výsledku. Dynamický rozsah a prognostická hodnota týchto mRNA u NBL tak môže prispieť k rozvoju prognostického skóre do klinickej praxe a informovať pri výbere liečbu u detí vysokého rizika NBL.

V našej štúdií sme využili systém vyšetrenia MRD popísaného v SIOPEN monitoring group (Viprey et al., 2014). Tá je založená na detekcii expresie mRNA troch markerov *TH*, *DCX* a *PHOX2B*.



## Charakteristika vybraných génov

### *PHOX2B*

Gén *PHOX2B* (*Paired-like homeobox 2b*) je lokalizovaný na 4.p12 a kóduje transkripčný faktor, ktorý sa podieľa na správnom vývoji neurónov a syntéze katecholamínov (URL1). Zárodočná mutácia tohto kandidátneho génu, naznačuje predispozíciu k vzniku neuroblastómu. *PHOX2B* funguje ako nádorový supresor a zobrazuje silný antiproliferačný účinok, ktorý sa však v mutovanom *PHOX2B* u detekovaného neuroblastómu nenachádza (URL4). Zistilo sa, že mutácie tohto génu sú spájané s poruchami autonómneho nervového systému.

### *TH*

Gén *TH* (*Tyrosine hydroxylase*) je lokalizovaný v oblasti 11p15.5 (URL2). Expresia *TH* génu je regulovaná tkanivovo-špecificky počas vývoja a diferenciácie v NBL bunkách. Jedná sa o enzým katalyzujúci premenu tyrozínu na *DOPA* (*dihydroxyfenylalanín*). Keďže je neuroblastóm endokrinne aktívny, viac ako 98% neuroblastómov produkuje katecholamíny. Detekciu ich metabolitov v moči je možné využiť k sledovaniu priebehu ochorenia.

### *DCX*

Gén *DCX* (*Doublecortin*) lokalizovaný v oblasti Xq22.3-q23 sa uplatňuje pri pohybe nervových buniek, migrácií neurónov. *DCX* gén obsahuje inštrukcie pre produkciu bielkoviny zvanej *doublecortin*. Tento proteín sa podieľa pri pohybe nervových buniek a ich správnom umiestnení pri vyvíjajúcom sa mozgu v procese zvanom migrácia neurónov. *DCX* sa viaže na mikrotubuly, čo sú pevné, duté vlákna, ktoré sú súčasťou cytoskeletu bunky a podporuje ich stabilitu (UR3).

## 2 Hypotézy a ciele práce

1. Hypotéza: Technika QRT-PCR je pre stanovenie MRD štatisticky významne citlivejšia než cytomorfológické vyšetrenie.

2. Hypotéza: Technika QRT-PCR stanoví MRD u neuroblastómu s rovnakou citlivosťou ako imunocytochemické vyšetrenie prítomnosti MRD u neuroblastómu stanovené pomocou pozitIVITY na GD2.

V našej práci sa sústreďíme na dôkaz prítomnosti MRD u neuroblastómov.

Na základe vyššie uvedených predpokladov sme si stanovili tieto hlavné ciele predkladanej diplomovej práce:

- zistiť, či prítomnosť MRD v kostnej dreni (KD) je možné využiť ako nezávislý prognostický znak
- zistiť, ktorú z techník je najvhodnejšie použiť pre detekciu MRD u NBL
- porovnať výsledky QRT-PCR, prietokovej cytometrie, imunocytochémie medzi sebou z jednotlivých vyšetrení a u metódy QRT-PCR porovnať koreláciu sledovaných génov
- následné porovnanie všetkých metód s cytomorfológickým vyšetrením
- vytvorenie diagnostickej schémy MRD u neuroblastómu

### 3 Materiál a metódy

Základným biologickým materiálom pre zhotovenie tejto štúdie boli vzorky kostnej drene pacientov, ktorým bol detekovaný neuroblastóm. Celkovo sme mali k dispozícii 132 vzoriek KD odobranej z pravej alebo ľavej časti bedrovej kosti od 46 pacientov. Vzorky boli spracované v laboratóriu solídnych nádorov 2.LF UK a FN v Motole, kde boli všetci pacienti liečení. Vyšetřili sme vzorky prostredníctvom imunocytochemickej analýzy a metódy QRT-PCR. Výsledky vyšetření z prietokovej cytometrie sme mali k dispozícii od ostatných pracovníkov nášeho laboratória solídnych nádorov 2.LF a FN Motol. My sme konkrétne výsledky cytometrickej analýzy spracovali v rámci štatistického vyhodnotenia.

#### 3.1 Imunocytologická analýza neuroblastómových buniek v KD

Na imunocytologickú analýzu neuroblastómových buniek v KD sme využili štandardne daný protokol:

Chemikálie:

- monoclonal mouse anti-human disialoganglioside GD2 14.G2a (BD Pharmigen, katalóg nr. 554272)
- Rabbit anti-mouse antibody (DAKO Z0259)
- APPAP komplex (DAKO D0651)
- DAKO Fuchsin+<sup>(tm)</sup> substrát Chromogranin systém (DAKO K0625)<sup>\*\*\*</sup>
- PBS
- TBS
- 4% paraformaldehyd
- Hematoxylin, pure-Serva

Prístroje: svetelný mikroskop Olympus BX51

Postup:

1. **Príprava cytospínu:** Mononukleárne bunky kostnej drene sme pripravili radientovou centrifugáciou na Hettich centrifuge – 1500 otáčok/7 min, stočené na (potiahnuté-polylysine) sklá. Pripravili sme suspenziu buniek  $0,7 \times 10^6$  na sklíčko, (spočítali v Bürkerovej komôrke). (Jedno sklíčko sme urobili ako negatívnu kontrolu bez anit- GD2 protilátky). Sklíčka sme po cytospinácií nechali sušiť na vzduchu pri izbovej teplote cez noc.
2. **Uchovávanie cytospínu:** neofarbené cytospíny je možno skladovať pri izbovej teplote až jeden týždeň. Pre dlhšie uskladnenie použijeme alobal k zabaleniu sklíčka a umiestnime do mrazáku na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po vybratí z mrazáku je nutné sklíčko okamžite rozbaľiť, aby nedochádzalo ku kondenzácii vody a tým k porušeniu bunečnej morfológie.
3. **Fixácia:** Pripravili sme 4% paraformaldehyd (4% formol), zo zásobného roztoku (6%) vzali 11,1 ml a doplnili vodou do 100 ml (4% roztok). Vložili sme 4 sklíčka do misky s buničinou a sklíčka preliali 4% paraformaldehydom po dobu 10 min. Následne trikrát premyli v PBS.
4. Ďalším krokom bolo imunoenzymatické farbenie (APAAP DAKO Fuchsin+<sup>(tm)</sup> substrát Chromogranin systém. Do misky sme umiestnili novú buničinu, ktorá sa namočila a urobila sa vlhká komôrka.
5. Vložili sme sklíčka a aplikovali 30 ul primárnej protilátky monoclonal mouse anti-human disialoganglioside *GD2 14.G2a* (BD Pharmigen, katalóg nr. 554272) riedené 1/100 v 1% BSA/PBS<sup>\*\*</sup>. Inkubovali 30 minút pri pokojovej teplote vo vlhkej komôrke.
6. Následne sme premyli v TBS roztoku II.<sup>\*</sup> po dobu 2x 5 minút.
7. **Sekundárna protilátka:** 30ul protilátky aplikujeme Rabbit anti-mouse antibody (DAKO Z0259) riedená 1/15 v 1% BSA/PBS<sup>\*\*</sup>. Inkubovali sme 30 minút pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke.
8. Následne sme znova premyli v TBS roztoku II.<sup>\*</sup> po dobu 2x 5 minút.
9. Aplikovali sme 30 ul APPAP komplex (DAKO D0651) riedený 1/20 v 1% BSA/PBS<sup>\*\*</sup>. Inkubovali sme 30 minút pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke.
10. Znova sme premyli v TBS roztoku II.<sup>\*</sup> po dobu 2x 5 minút. Pri druhom premývaní sme pripravili farbiaci roztok Dako Fuchsin+<sup>(tm)</sup> Substráte Chromogene System.

11. DAKO Fuchsin+ <sup>(tm)</sup> substrát Chromogranin systém (DAKO K0625)<sup>\*\*\*</sup> sme inkubovali 15 minút pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke a využili montovacím médium, ktoré sme nechali vytemperovať na 57°C počas 15 minút.
12. Opláchli sme sklá pod tečúcou vodou po dobu najmenej 5 minút.
13. Vložili sme do nádobky s Hematoxylinem na 1 minútu.
14. Znovu sme opláchli sklá pod tečúcou vodou po dobu najmenej 5 minút.
15. Na podložné sklíčko sme kvapli kvapku rozpusteného montovacieho média a priložili podložné sklíčko s ofarbenými bunkami a nechali na vzduchu zatuhnúť. Týmto boli sklíčka pripravené k mikroskopovaniu.

Náter KD by mal byť videný svetelným mikroskopom pri nízkom (X100-X200) a vysokom (X600-X1000) zväčšení. Nižšie zväčšenie sa používa na posúdenie bunečnej denzity a detekciu veľkých nádorových zhlukov a väčšie zväčšenie na identifikáciu malých nádorových roziet či na rozpoznanie znakov diferenciácie NBL bunky. Bunky NBL sú typicky okrúhle a väčšie než malé lymfocyty s vysokým jadrovým: cytoplasmatickým pomerom. Bunečné jadro môže byť okrúhle alebo oválne s granulovanou chromatinovou štruktúrou (nazývanou aj salt- and- paper pattern). To však nie je prítomné vždy pre popis NBL. Bunky v rozetách sa môžu pohybovať v rôznych veľkostných rozmedziach a môžu byť polygonálneho tvaru. Zhluk alebo rozeta obsahuje aspoň tri neuroblastómové bunky. Jedlotlivé samostatné bunky by nemali byť označené ako pozitívne, skôr sa odporúča ich hodnotiť ako podozrivé a čo sa následné buď potvrdí alebo vyvráti za pomoci využitia ďalších techník ako je IC.

Len vzorky kostnej drene zodpovedajúcej kvality by mali byť vyšetrované pre diagnostické a prognostické účely. V prípade, že je nedostatočné množstvo vzorky, odporúčame opakovanie aspirácie alebo biopsie a nové vyhodnotenie. Náter KD je považovaný za reprezentatívny a vhodný pre kvantitatívne vykazovanie ochorenia, keď je infiltrácia nádorovými bunkami >5%. Keď je infiltrácia tumoru ≤5% musia byť splnené 3 zo 4 kritérií k detekcii prítomnosti alebo neprítomnosti ochorenia alebo MRD:

- 1) prítomnosť častíc so stromálnymi bunkami (histiocyty, fibroblasty alebo osteoblasty)
- 2) prítomnosť megakaryocytov
- 3) z erytroblastov je viac než 20% jaderných buniek

4) bunky periférnej krvi sú v rozsahu pre daný vek (zrelé granulocyty a lymfocyty nepresahujú u dojčiat 65% alebo 50% u detí starších než 1 rok veku

Rutinné aspirácie väčších objemov sa neodporúčajú, aby sa zabránilo zriedeniu kostnej drene s krvou, čo zníži citlivosť analýzy. Bunky s narušenou bunečnou alebo jadernou membránou by nemali byť analyzované.

### 3.2 QRT-PCR génov *TH*, *PHOX2B* a *DCX* s kontrolným génom *β2M*

Pomocou real-time PCR je z cDNA, ktorá vznikla reverznou transkripciou z RNA templátu, vyšetrená expresia mRNA sledovaných génov *TH*, *PHOX2B* a *DCX*. Ako referencia pre normalizáciu je využívané stanovenie exprese mRNA kontrolného génu *β2M*. Prístroj TaqMan 7500 slúži k prevedeniu real-time PCR. Pomocou hydrolyzačných sond v PCR reakcií je možné sledovať nárast fluorescencie v priebehu PCR. Hladina fluorescencie je prímou úmerná množstvu amplifikovaného templátu v PCR reakcií. Optický systém sníma fluorescenciu, ktorá je pomocou softwaru spracovávaná.

#### Chemikálie:

- TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies)
- Primery a sondy (Applied Biosystems, EastPort, GenериBiotech, Metabion)
- RNA voda (Aqua pro injectione Braun) v sterilnej eppendorf skúmavke skladovaná pri -20 °C

#### Sekvencie primerov a sond:

Primery boli riedené z lyofilizátu najprv na zásobnú koncentráciu 100μM a následne riedené na pracovnú 10μM koncentráciu a rozalíkvtované. Sondy boli riedené na pracovnú 20uM koncentráciu a rozalíkvtované. Riedené primery i sondy sme skladovali pri -20°C.

#### Primery *TH*:

forward 5'-ATTGCTGAGATCGCCTTCCA-3'  
reverse 5'-AATCTCCTCGGCGGTGTACTC-3'

Sonda *TH*: FAM 5'-ACAGGCACGGCGACCCGATTC-3' BHQ1

#### Primery *PHOX2B*:

forward 5'-CAGGGACCACCAGAGCAGT-3'  
reverse 5'-CTGCTTGCGCTTCTCGTTGA-3'

Sonda *PHOX2B*: FAM 5'-TACGCCGCAGTTCCTTACAAACTCTTCAC-3'  
BHQ1

Primery *DCX*:

forward 5'-CGCTATGCTCAGGATGATTTTTC-3'

reverse 5'-GCTGTGGCTGATGGGTTTCC-3'

Sonda *DCX*: FAM 5'-CATGACTCGGCATTCATTTTCATCCAG-3'  
BHQ1

Primery  $\beta 2M$ :

forward 5'-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3'

reverse 5'-AATCCAAATGCGGCATCT-3'

Sonda  $\beta 2M$ : FAM 5'-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC-3'  
BHQ1

Prístroje:

- TaqMan 7500 Fast Real-Time PCR System - TaqMan (Applied Biosystems)
- Vortex Rx<sup>3</sup> (VELP Scientifica)
- Minicentrifuga C - 1200 (National Labnet)
- Minicentrifuga E (Wealtec)
- Aura PCR (BIO AIR instruments)
- Pipety (Eppendorf Research)

Spotrebný materiál:

- Sterilné eppendorf skúmavky 1,5 ml
- Sterilné mikroskúmavky 0,2 ml
- Optické stripy - MicroAmp Optical 8 – tube strip (0,2 ml) (Applied Biosystems)
- Optické viečka - MicroAmp Optical 8 – cap strip (Applied Biosystems)
- 96-jamkové doštičky pre Fast QRT-PCR (Applied Biosystems)



- Sterilné pipetovacie špičky s filtrom a bez filtru
- Chladiace namrazovacie stojanky

#### Postup:

1. Mikroskúmavky so vzorkami cDNA a jednu mikroskúmavku s cDNA pozitívnej kontroly sme necháli rozmraziť. cDNA sme po úplnom rozmrazení stočili na minicentrifuge.
2. Na chladiacom stojančeku určenom pre prípravu mastermixu sme nechali rozmraziť alikvótnu časť RNA vody a alikvóty primerov a prób pre všetky sledované gény, ktoré sú nariadené na pracovnú koncentráciu (10  $\mu$ M primery alebo 20  $\mu$ M sondy). Alikvóty primerov a sond sme po úplnom rozmrazení zvortexovali a stočili na minicentrifuge. Objemy jednotlivých reagensí sme spočítali podľa zadaných vzorcov samy.
3. Ďalej sme vyplnili do vzorovej tabuľky pozície jednotlivých vzoriek (vo formáte kód vzorky + prvé písmeno sledovaného génu alebo skratka kg pre kontrolné gén), pozíciu pozitívnej a negatívnej kontroly a tiež tzv. netemplátovou kontrolu (H2O). Pozitívnu kontrolu, podľa ktorej sa vyhodnocujú ostatné vzorky, je potrebné napipetovať na rovnaké miesta (v prípade našej 96-jamkovej doštičky vždy na pozície so súradnicami: H1 H10; v prípade použitia stripov na pozície so súradnicami: G7-G8 a H 1 H8. Negatívna kontrola bola pridaná do vyšetrovacieho postupu už pred reverznou transkripciou. V netemplátovej kontrole bol prísušný mastermix, do ktorého je pridaná miesto vzorky iba RNA voda.

#### Postup

##### Príprava real-time PCR

1. Do Master Mixu sme napipetovali príslušné objemy primerov a sond a príslušný objem vody. Master Mix sme premiešali jemným poklepaním na stenu Eppendorf skúmavky a potom stočili na minicentrifuge.
2. Gény *TH*, *PHOX2B* a *DCX* sme napipetovali u vyšetovaných vzoriek a pozitívne kontroly vždy v triplikátoch. Kontrolný gén sme napipetovali u všetkých vzoriek a kontrolu iba raz (v monáte). U negatívnej kontroly a netemplátovej (H2O) kontroly sme napipetovali všetky gény v monáte.

3. V boxe pre prácu so vzorkami cDNA a RNA sme si pripravili samostatný chladiaci stojan a do neho tri rady popísaných sterilných mikroskúmaviek na prípravu tripplikátu (v každom rade bol počet skúmaviek podľa počtu patientskych vzorov + 1 pozitívna kontrola).
4. Do mikroskúmaviek sme v prvom rade napipetovali vždy 64  $\mu$ l Master Mixu pre *TH*, do druhého radu 64  $\mu$ l Master Mix pre *PHOX2B* a do tretieho radu 64  $\mu$ l Master Mix pre *DCX*. Do prvej skúmavky v prvom rade so 64  $\mu$ l Master Mixu pre *TH* sme pridali 16  $\mu$ l vzorky 1 (premiešali sme pomocou pipety a špičky novo vznikajúce roztok násobného množstva opakovaným nasatím vzorky). Napipetovali sme 3x25  $\mu$ l tejto zmesi na 96 jamkovú doštičku (prípadne stripy) podľa nami pripraveného rozpisu. Obdobne sme postupovali pri vzorke 1 s Master Mix pre *PHOX2B* a *DCX*. Stanovenie kontrolného génu sme vykonali v monáte, čiže napipetovali 20  $\mu$ l Master Mix pre kontrolný gén a k tomu 4  $\mu$ l cDNA vzorky 1 priamo na 96-jamkovú doštičku (prípadne do stripu) a premiešali opakovaným nasatím roztoku do pipety.
5. Pozitívnu kontrolu sme napipetovali rovnakým postupom ako vyšetované vzorky. PC je nutné pri vyšetovaní napipetovať vždy na rovnaké miesta v doštičke či stripoch.
6. Na záver sme napipetovali v monáte negatívnu kontrolu a netemplátovú kontrolu (H<sub>2</sub>O), tzn. 20  $\mu$ l príslušného Master Mix + 5  $\mu$ l cDNA zdravého darcu alebo 5  $\mu$ l vody v prípade netemplátové kontroly a opäť premiešali opakovaným nasatím roztoku do pipety.
7. Napipetovanú doštičku sme prelepili krycou fóliou eventuálne stripy uzavreli optickými viečkami. Fóliu na doštičke je nutné dobre na doštičku prilepiť pomocou plastovej doštičky na to určené. Prípadné bublinky odstránime sklepaním doštičky.
8. Doštičku jsme vložili do prístroje LightCycler®480 System od firmy Roche Applied a pomocou softwaru nastavili protokol podľa nasledujúcich parametrov:
  1. krok: 2 minúty pri 50°C
  2. krok (hot start): 10 minút pri 95°C
  3. krok (denaturácia): 15 sekúnd pri 95°C
  4. krok (hybridizácia, extenzia): 1 minúta pri 60°C
  5. krok (chladenie): 30 sekúnd pri 40°C(kroky 3 a 4 se opakujú 50x)
9. Po ukončení priebehu bol priebehu reakcie bol priebeh softvérovo vyhodnotený s nastavením manuálneho Threshold. Takto získané dáta boli exportované do Excel súboru a ďalej vyhodnotené metódou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Pri využití techniky QRT-PCR v ideálnom prípade by mala byť RNA zriedená na minimálnu koncentráciu 40 ng/  $\mu$ L a skladovaná v alikvótoch na jedno použitie pri -80 °C. Odporúča sa analýza každej RNA v trojitom prevedení, kde každá obsahuje aspoň 100 ng RNA. Výsledky QRT-PCR sú označené ako Ct hodnoty, takže je možné identifikovať prípadné biologické nezrovnalosti a využitie  $2^{-\Delta Ct}$  alebo  $-\Delta Ct$  v ktorom je expresia NBL mRNA normalizovaná internou kontrolou (v našom prípade je to  *$\beta 2$  mikroglobulin*):  $\Delta Ct = (Ct \text{ NBL mRNA} - Ct \text{ } \beta 2 \text{ mikroglobulin})$ . Spodná hranica Ct QRT-PCR pre mRNA neuroblastómu je hodnota 40. Nádorovo negatívna KD má Ct hodnotu  $\geq 40$  pre všetky skúmané mRNA neuroblastómu, keď amplifikácia referenčného housekeeping génu generuje Ct hodnotu  $< 25$ . Ak je to možné, odporúča sa využitie komparatívnej Ct metódy, ako je  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  metóda, ktorá hlási násobnú zmenu v  $\Delta Ct$  expresií vzorky porovnávané s kalibračnou vzorkou analyzovanou v každom teste ako kontrola pri zmene v amplifikácií. Prahový cyklus Ct (Cycle threshold) je počet PCR cyklov, potrebných pre vznik produktu (fluorescenčne značený signál) QRT-PCR prekračujúci nastavenú prahovú hodnotu. Hodnoty Ct sú nepriamo úmerné množstvu NK. Čím vyššia hodnota Ct, tým je nižšie množstvo NK.

$\Delta Ct$  : je rozdiel medzi hodnotou Ct cieľovej mRNA (Ct1) a referenčnej hodnoty mRNA (Ct2). Ct2 je zvyčajne využívaná hodnota housekeeping génu.  $\Delta Ct = Ct1 - Ct2$ . Housekeeping gény sú konštitutívne exprimované na relatívne konštantné hodnoty – hladiny vo vyšetrovaných tkanivách skumaných za daných podmienok testu.

$\Delta \Delta Ct$  je najčastejšie využívaná metóda ktorou reportujeme QRT-PCR dáta. Jedná sa o relatívne kvantifikačnú metódu v ktorej je expresia cieľového transkriptu  $\Delta Ct1$  vyjadrená ku konštante referenčnej vzorky  $\Delta Ct2$ .  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$ .

## 4 Výsledky

### 4.1 Vyhodnotenie výsledkov

Pri testovaní v kontingenčnej tabuľke je štandardne používanou metodikou chí-kvadrát test nezávislosti v kontingenčnej tabuľke. Predpokladom tohto testu sú nezávislé pozorovania. V situácii, keď sa jedná o porovnanie párovo usporiadaných pozorovaní, nie je predpoklad nezávislosti splnený, chí-kvadrát test teda nemožno použiť a správnu metodikou je McNemarov test, ktorý sme stanovili v softwéri Microsoft Excel 2007. V našom prípade boli dáta párovo usporiadané, pretože jedna vzorka kostnej drene bola vyšetrená oboma porovnávanými metódami a pre každú z nich bol zistený buď pozitívny alebo negatívny výsledok. Pre danú vzorku teda bola k dispozícii dvojica meraní. Navyše nešlo o testovanie nezávislosti výsledkov dvoch metód, ako je zvykom u chí-kvadrát testu, ale o porovnanie podielov ich pozitívnych a negatívnych výsledkov. Nulovou hypotézou McNemarovho testu je, že podiely pozitívnych (a z toho vyplýva že i negatívnych) meraní sú pre obe porovnávané metódy rovnaké. V prípade p-hodnoty nižšej ako 0,05 dôjde k zamietnutiu nulovej hypotézy v prospech alternatívy, že jedna metóda má vyšší podiel pozitívnych meraní (a z toho vyplýva že nižší podiel negatívnych meraní) ako druhá. Podmienkou pre použitie McNemarovho testu je, aby počet odlišných výsledkov oboch metód bol aspoň 25. Čím viac je tento predpoklad porušený, tým viac môžu byť výsledky McNemarovho testu skreslené. Tento problém nastal u hypotéz č. 2 a 4, kde bude okomentovaný.

## Hypotézy

1H0: Schopnosť detekcie MRD je pre imunocytochémiu a morfológiu rovnaká.

1H1: Schopnosť detekcie MRD sa pre imunocytochémiu a morfológiu líšia.

Testové kritérium: <b>6,04</b> p-hodnota: <b>0,014</b>		Morfológia		
		poz.	neg.	celkom
Imunocytochémiá	poz.	11	21	32
	neg.	7	93	100
	celkom	18	114	132

**Tabuľka 3** Porovnanie pozitivity/negativity u metód morfológie a imunocytochémié

Celkom vo 104 prípadoch zo 132 bol výsledok imunocytochémié a morfológie rovnaký, z toho v 11 pozitívne a v 93 negatívne. Vo zvyšných 28 prípadoch sa líšil, z toho v 21 prípadoch mala imunocytochémiá pozitívny výsledok a morfológia negatívny a v 7 prípadoch mala imunocytochémiá negatívny výsledok a morfológia pozitívny. Ak porovnáme počet pozitívnych výsledkov, tak imunocytochémiá mala 32 pozitívnych výsledkov zo 132 a morfológia 18 zo 132. Cieľom McNemarovho testu bolo posúdiť, či sa tieto podiely štatisticky významne líšia. P-hodnota dosiahla hodnotu 0,014, teda nižšiu ako 0,05, čo znamená zamietnutie nulovej hypotézy. Medzi metódami bol preukázaný štatisticky významný rozdiel, s tým že podiel pozitívnych výsledkov bol pre imunocytochémiu štatisticky významne vyšší ako podiel pozitívnych výsledkov pre morfológiu.

2H0: Schopnosť detekcie MRD je pre QRT-PCR a morfológiu rovnaká.

2H1: Schopnosť detekcie MRD sa pre QRT-PCR a morfológiu líšia.

Testové kritérium: <b>15,61</b> p-hodnota: <b>0,0001</b>		Morfológia		
		poz.	neg.	celkom
QRT-PCR	poz.	13	28	41
	neg.	5	86	91
	celkom	18	114	132

**Tabuľka 4** Porovnanie pozitivity/negativity u metód QRT-PCR a morfológie

Metóda QRT-PCR mala 41 pozitívnych výsledkov zo 132, zatiaľ čo morfológia mala pozitívnych výsledkov 18 z 132. Rozdiel týchto podielov bol vyhodnotený ako štatisticky významný, pretože p-hodnota McNemarovho testu 0,0001 bola výrazne nižšia ako 0,05. Metóda QRT-PCR má štatisticky významne vyšší podiel pozitívnych výsledkov než morfológia.

3H0: Schopnosť detekcie MRD je pre prietokovú cytometriu a morfológiu rovnaká.

3H1: Schopnosť detekcie MRD sa pre prietokovú cytometriu a morfológiu líšia.

Testové kritérium: <b>2,77</b> p-hodnota: <b>0,096</b>		Morfológia		
		poz.	neg.	celkom
Prietoková cytometria	poz.	8	3	11
	neg.	10	111	121
	celkom	18	114	132

**Tabuľka 5** Porovnanie pozitivity/negativity u metód prietkovej cytometrie a morfológie

Prietoková cytometria a morfológia mali iba 13 odlišných výsledkov zo 132. To je nízky počet na to, aby mohol byť štatisticky preukázaný rozdiel. McNemarov test vyžaduje splnenie podmienky aspoň 25 odlišných výsledkov. P-hodnotu 0,096 treba teda vnímať len ako orientačnú. Či už podľa p-hodnoty alebo kvôli nízkemu počtu pozorovaní, nebol preukázaný štatisticky významný rozdiel v podiele pozitívnych detekcií prietokovej cytometrie a morfológie. Nulová hypotéza nebola zamietnutá.

4H0: Schopnosť detekcie MRD je pre imunocytochémiu a QRT-PCR rovnaká.

4H1: Schopnosť detekcie MRD sa pre imunocytochémiu a QRT-PCR líšia.

Testové kritérium: <b>3,68</b> p-hodnota: <b>0,055</b>		QRT-PCR		
		poz.	neg.	celkom
Imunocytochémiia	poz.	25	7	32
	neg.	16	84	100
	celkom	41	91	132

**Tabuľka 6** Porovnanie pozitivity/negativity u metód imunocytochémiie a QRT-PCR

Podiel pozitívnych výsledkov získaných imunocytochémiickou metódou bol 32 zo 132, zatiaľ čo podiel pozitívnych výsledkov získaných metódou QRT-PCR bol 41 zo 132. Rozdiel týchto podielov nebol vyhodnotený ako štatisticky významný, pretože hodnota p McNemarovho testu bola vyššia ako 0,05. Vzhľadom na to, že nebol splnený predpoklad McNemarovho testu (počet odlišných detekcií je  $16 + 6 = 22$ ), môže byť výsledok McNemarovho testu skreslený. P-hodnota je blízko hranice 0,05, takže by sa mohlo stať, že pri vyššom počte pozorovaní by výsledok dopadol opačne. Celkovo však platí, že na základe dát, aj z dôvodu nízkeho počtu odlišných detekcií, nemožno preukázať medzi imunocytochémiou a metódou QRT-PCR štatisticky významný rozdiel v podiele pozitívnych detekcií. Nulová hypotéza nebola zamietnutá.

5H0: Schopnosť detekcie MRD je pre prietokovú cytometriu a imunocytochémiu rovnaká.

5H1: Schopnosť detekcie MRD sa pre prietokovú cytometriu a imunocytochémiu líšia

Testové kritérium: <b>13,79</b> p-hodnota: <b>0,0002</b>		Imunocytochémiu		
		poz.	neg.	celkom
Prietoková Cytometria	poz.	7	4	11
	neg.	25	96	121
	celkom	32	100	132

**Tabuľka 7** Porovnanie pozitivity/negativity u metód prietokovej cytometrie a imunocytochémiu

Prietoková cytometria mala podiel pozitívnych výsledkov 11 zo 132, zatiaľ čo imunocytochémiu mala pozitívnych výsledkov 32 zo 132. Tento rozdiel je štatisticky významný, pretože hodnota p McNemarovho testu vyšla výrazne nižšia ako 0,05. Bolo preukázané, že podiel pozitívnych výsledkov je pre imunocytochémiu štatisticky významne vyšší ako pre prietokovú cytometriu. Nulová hypotéza bola zamietnutá.

6H0: Schopnosť detekcie MRD je pre prietokovú cytometriu a QRT-PCR rovnaká.

6H1: Schopnosť detekcie MRD sa pre prietokovú cytometriu a QRT-PCR líšia.

Testové kritérium: <b>26,28</b> p-hodnota: <b>0,000</b>		QRT-PCR		
		poz.	neg.	celkom
Prietoková Cytometria	poz.	10	1	11
	neg.	31	90	121
	celkom	41	91	132

**Tabuľka 8** Porovnanie pozitivity/negativity u metód prietokovej cytometrie a QRT-PCR



V prípade, že prietoková cytometria vykázala pozitívnu detekciu, bola detekcia metódou QRT-PCR negatívna iba v jednom prípade. Naopak, ak vykázala metóda QRT-PCR pozitívnu detekciu, bol výsledok prietokovej cytometrie negatívny v 31 prípadoch.

Ide o výrazný rozdiel v oboch metódach. Ďalej možno porovnať z hľadiska celkového podielu pozitívnych detekcií, že u prietokovej cytometrie ich bolo 11 a u metódy QRT-PCR 41. McNemarov test vyhodnotil rozdiel ako štatisticky významný, pretože p-hodnota bola nižšia ako 0,05. Podiel pozitívnych detekcií metódou QRT-PCR je štatisticky významne vyšší ako podiel pozitívnych detekcií prietokovou cytometriou

<b>Metóda</b>	<b>Pozitivita +</b>	<b>Negativita -</b>
Morfológia	18 (13,6%)	114(86,3%)
Prietoková cytometria	11 (8,3%)	121 (91,7%)
Imunocytochémia	32 (24,2%)	100 (75,8%)
QRT-PCR	41( 31,1%)	91(68,9%)

**Tabuľka 9** Porovnanie celkovej pozitivity a negativity: cytomorfológia, prietoková cytometria, imunocytochémia a QRT-PCR

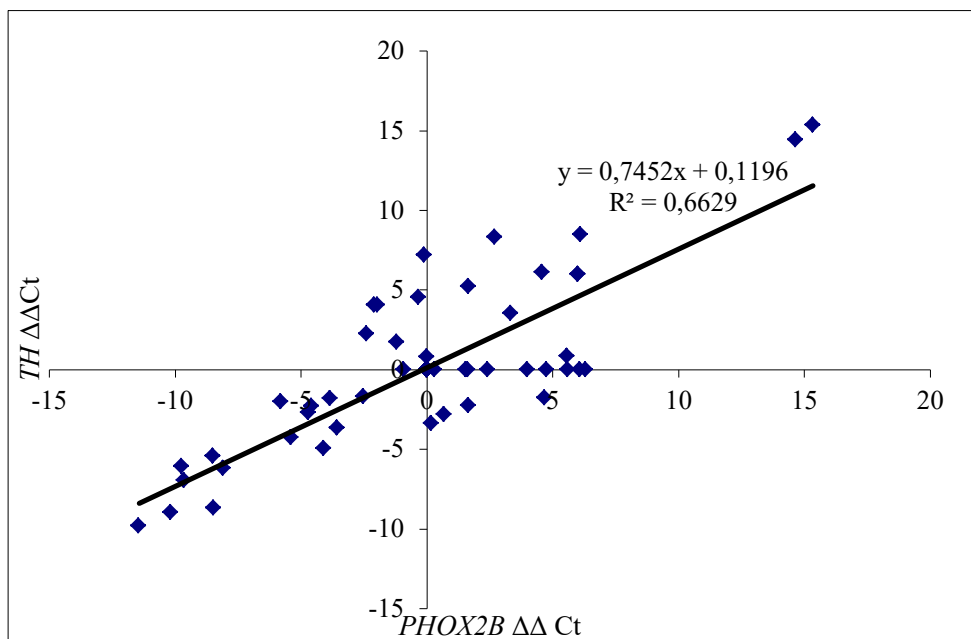
Pre štatistický opis vzťahu medzi expresiou dvoch génov bol použitý Pearsonov korelačný koeficient. Jedná sa číselnú charakteristiku vyjadrujúcu mieru lineárnej závislosti dvoch premenných. Môže nadobúdať hodnoty medzi -1 a 1, kedy hodnoty blízke nule ukazujú na nezávislosť testovaných premenných. Kladné hodnoty na priamu závislosť a záporné hodnoty na nepriamu závislosť. Čím ďalej je hodnota korelačného koeficientu od nuly, tým o silnejšiu závislosť sa jedná. Ďalej bol vykonaný test nezávislosti pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu, ktorého výsledkom je informácia, či je zistená korelácia náhodná alebo štatisticky významná. Nulovou hypotézou tohto testu je, že hodnota Pearsonovho korelačného koeficientu je nulová (= nezávislosť testovaných premenných). V prípade p-hodnoty nižšej ako 0,05 sa nulová hypotéza zamietá v prospech alternatívy (= závislosť testovaných premenných). Testovanie bolo doplnené základnými popisnými štatistikami, konkrétne priemerom a štandardnou odchýlkou, a ďalej bodovými grafy s preloženou regresnou priamkou a hodnotou indexu determinácie.

Gén	<i>TH</i> $\Delta\Delta Ct$	<i>PHOX2B</i> $\Delta\Delta Ct$
Priemer	-0.03	0.10
Smerodatná odchylka	3.50	3.21
Počet pozorovaní	132	132
Pearsonov korelačný koeficient	0,81	
p-hodnota	0,00*	
interpretácia	silná priama lineárna závislosť	

**Tabuľka 10** Porovnanie korelácie génov *TH* a *PHOX2B* ( $\Delta\Delta Ct$ )

Priemerná expresia génu *TH*  $\Delta\Delta Ct$  činila -0,03 so štandardnou odchýlkou 3,5. Priemerná expresia génu *PHOX2B*  $\Delta\Delta Ct$  činila 0,10 so štandardnou odchýlkou 3,21. Hodnoty expresie oboch génov teda majú vzhľadom k svojej priemernej hodnote vysokú variabilitu. Závislosť expresií týchto dvoch génov bola meraná pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu s hodnotou 0,81. Jedná sa o kladnú hodnotu blízku jednej, čo

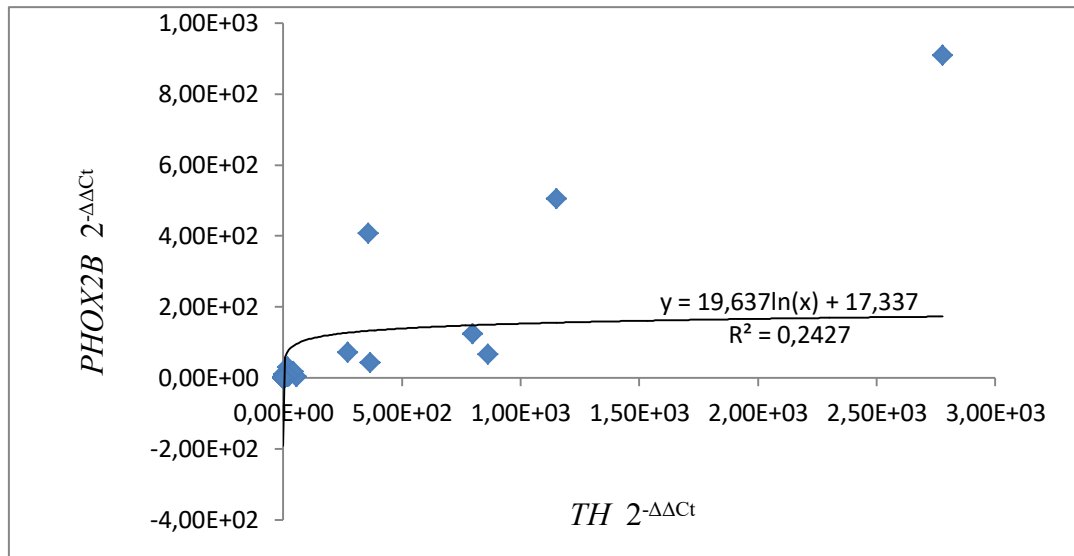
značí silnú pozitívnu koreláciu. Závislosť bola vyhodnotená ako štatisticky významná ( $p = 0,00 < 0,05$ ). Tento výsledok možno interpretovať tak, že s kladnými hodnotami expresie jedného génu sa väčšinou vyskytujú kladné expresie druhého génu, a naopak, so zápornými hodnotami expresie jedného génu sa väčšinou vyskytujú záporné hodnoty expresie druhého génu. Čím vyššia bola expresia jedného génu, tým vyššia bola expresia druhého génu. To možno pozorovať aj v bodovom grafe s preloženou regresnou priamkou.



**Obrázok 3** Graf porovnania korelácie génov *TH* a *PHOX2B* ( $\Delta\Delta Ct$ )

Väčšina nameraných hodnôt sa vyskytuje v prvom a treťom kvadrante, čo potvrdzuje záver vydaný na základe korelačného koeficientu, že ak je hodnota expresie jedného génu kladná, je väčšinou kladná aj hodnota expresie druhého génu (body v prvom kvadrante), ak je hodnota expresie jedného génu záporná, je väčšinou záporná aj hodnota expresie druhého génu (body v treťom kvadrante). Preložená priamka pomerne dobre charakterizuje závislosť dvoch expresií, pretože hodnota indexu determinácie ( $R^2 = 0,66$ ) je pomerne vysoká. Na základe rovnice regresnej priamky sa dá interpretovať, že s nárastom hodnoty expresie génu *TH*  $\Delta\Delta Ct$  o 1 je spojený nárast hodnoty expresie génu *PHOX2B*  $\Delta\Delta Ct$  o 0,7452. Pri nulovej expresii génu *TH* možno očakávať priemernú

expresiu génu *PHOX2B* na hodnote 0,1196. Hodnota Pearsonovho korelačného koeficientu pre hodnotu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  génov *TH* a *PHOX2B* činila hodnotu 0,92 (viz Obrázok 4).

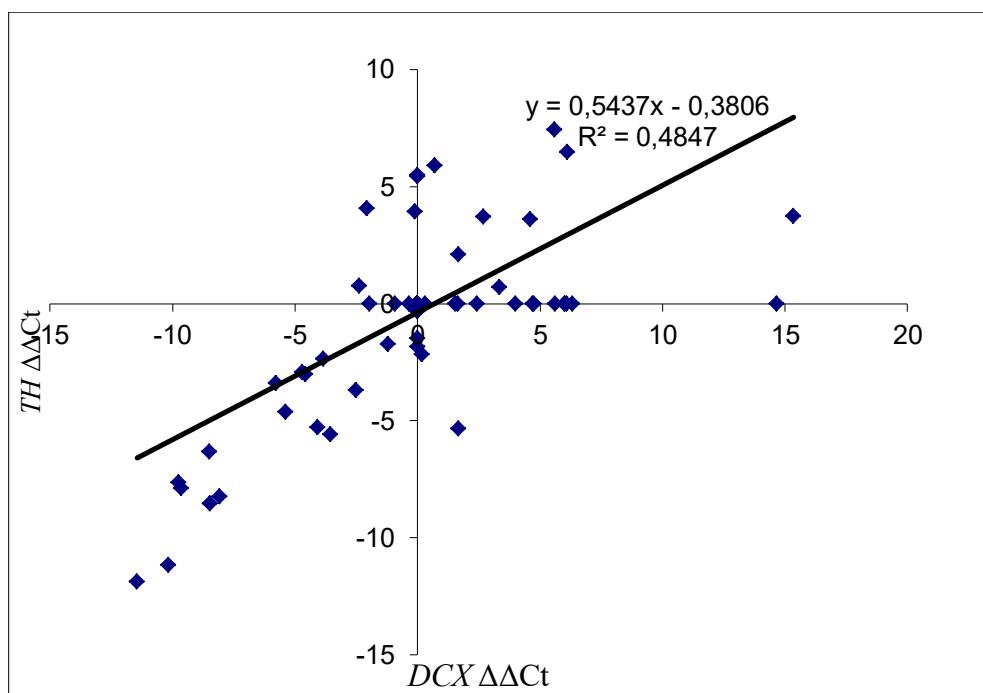


**Obrázok 4** Graf porovnania korelácie génov *TH* a *PHOX2B* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

	<i>TH</i> $\Delta\Delta Ct$	<i>DCX</i> $\Delta\Delta Ct$
Priemer	-0.03	-0.40
Smerodatná odchyľka	3.50	2.74
Počet pozorovaní	132	132
Pearsonov korelačný koeficient	0,70	
p-hodnota	0,00*	
interpretácia	silná priama lineárna závislosť	

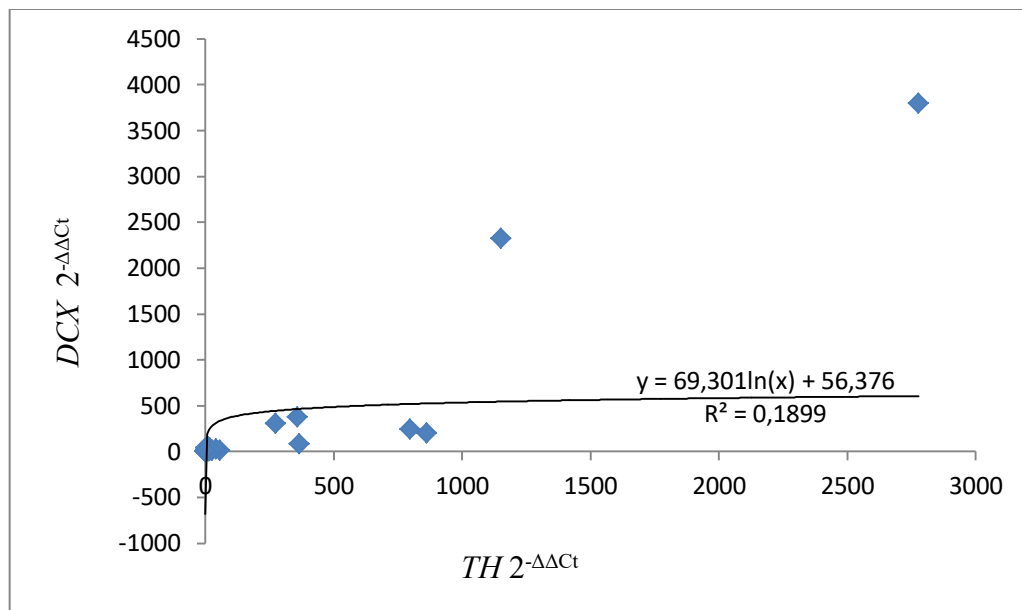
**Tabuľka 11** Porovnanie korelácie génov *TH* a *DCX* ( $\Delta\Delta Ct$ )

Priemerná expresia génu *TH*  $\Delta\Delta Ct$  činila -0,03 so štandardnou odchylkou 3,5. Priemerná expresia génu *DCX*  $\Delta\Delta Ct$  činila -0,40 so štandardnou odchylkou 2,74. Hodnoty expresie oboch génov teda majú vo svojej priemernej hodnote vysokú variabilitu, s tým, že hodnoty expresie génu *TH* kolíšu viac než hodnoty expresie génu *DCX*. Závislosť expresie týchto dvoch génov bola meraná pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu s hodnotou 0,70. Jedná sa o kladnú hodnotu blízku jednej, čo značí silnú pozitívnu koreláciu. Závislosť bola vyhodnotená ako štatisticky významná ( $p = 0,00 < 0,05$ ). Tento výsledok možno interpretovať tak, že s kladnými hodnotami expresie jedného génu sa väčšinou vyskytujú kladné expresie druhého génu, a naopak, so zápornými hodnotami jedného génu sa väčšinou vyskytujú záporné hodnoty druhého génu. Čím vyššia bola expresia jedného génu, tým vyššia bola expresia druhého génu. To možno pozorovať aj v bodovom grafe s preloženou regresnou priamkou.



**Obrázok 5** Graf porovnania korelácie génov *TH* a *DCX* ( $\Delta\Delta Ct$ )

Väčšina nameraných hodnôt sa vyskytuje v prvom a treťom kvadrante, čo potvrdzuje záver vydaný na základe korelačného koeficientu, že ak je hodnota expresie jedného génu kladná, je väčšinou kladná aj hodnota expresie druhého génu (body v prvom kvadrante), ak je hodnota expresie jedného génu záporná, je väčšinou záporná aj hodnota expresie druhého génu (body v treťom kvadrante). Hodnota indexu determinácie je rovná 0,48, čo znamená že 48% variability expresie génu *DCX* je vysvetlená variabilitou expresie génu *TH*. Na základe rovnice regresnej priamky sa dá interpretovať, že s nárastom hodnoty expresie génu *TH*  $\Delta\Delta Ct$  o 1 je spojený nárast hodnoty expresie génu *DCX*  $\Delta\Delta Ct$  o 0,5437. Pri nulovej expresii génu *TH* možno očakávať priemernú expresiu génu *DCX* na hodnote -0,3806. Hodnota Pearsonovho korelačného koeficientu pre motódu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  génov *TH* a *DCX* činila hodnotu 0,93 (viz Obrázok 6).

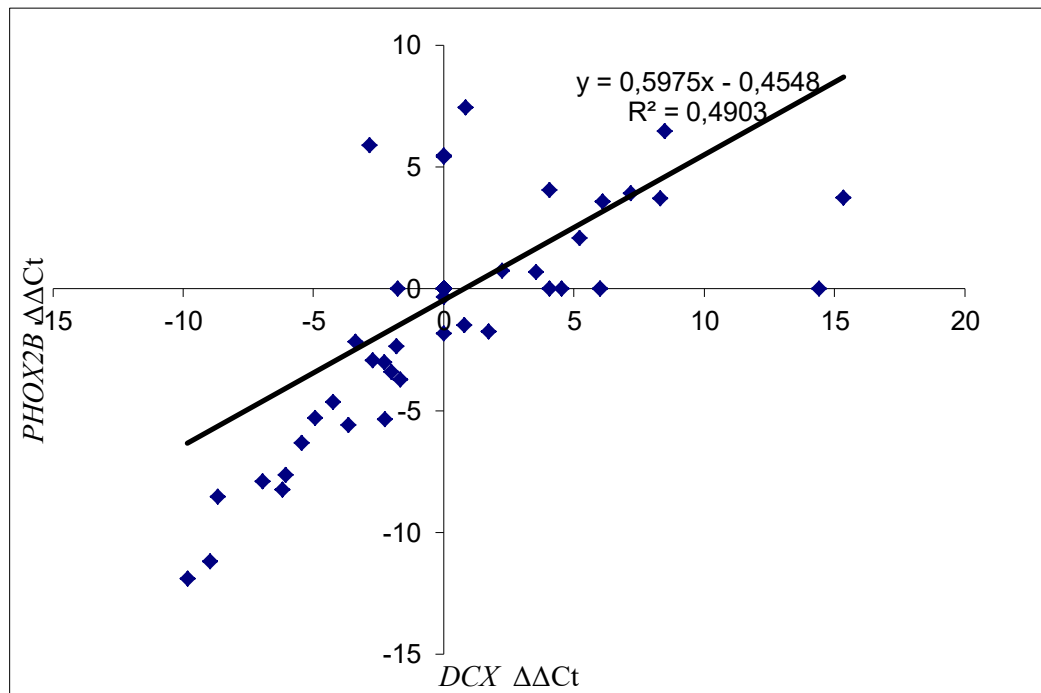


**Obrázok 6** Porovnanie korelácie génov TH a DCX ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Gén	<i>PHOX2B</i> $\Delta\Delta Ct$	<i>DCX</i> $\Delta\Delta Ct$
Priemer	0.10	-0.40
Smerodatná odchyľka	3.21	2.74
Počet pozorovaní	132	132
Pearsonov korelačný koeficient	0,70	
p-hodnota	0,00*	
interpretácia	silná priama lineárna závislosť	

**Tabuľka 12** Porovnanie korelácie génov *PHOX2B* a *DCX* ( $\Delta\Delta Ct$ )

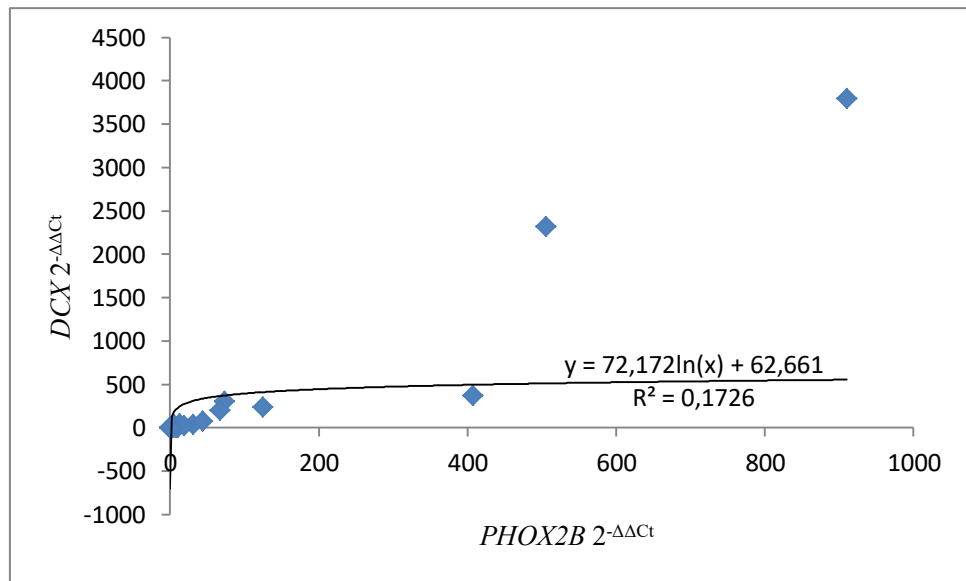
Priemerná expresia génu *PHOX2B*  $\Delta\Delta Ct$  činila 0,10 so štandardnou odchyľkou 3,21. Priemerná expresia génu *DCX*  $\Delta\Delta Ct$  činila -0,40 so štandardnou odchyľkou 2,74. Hodnoty expresií oboch génov teda majú vzhľadom k svojej priemernej hodnote vysokú variabilitu, s tým, že hodnoty expresie génu *PHOX2B* kolíšu viac než hodnoty expresie génu *DCX*. Závislosť expresií týchto dvoch génov bola meraná pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu s hodnotou 0,70. Jedná sa o kladnú hodnotu blízku jednej, čo značí silnú pozitívnu koreláciu. Závislosť bola vyhodnotená ako štatisticky významná ( $p = 0,00 < 0,05$ ). Tento výsledok možno interpretovať tak, že s kladnými hodnotami expresie jedného génu sa väčšinou vyskytujú kladné expresie druhého génu, a naopak, so zápornými hodnotami jedného génu sa väčšinou vyskytujú záporné hodnoty druhého génu. Čím vyššia bola expresia jedného génu, tým vyššia bola expresia druhého génu. To možno pozorovať aj v bodovom grafe s preloženou regresné priamkou.



**Obrázok 7** Porovnanie korelácie génov *PHOX2B* a *DCX* ( $\Delta\Delta Ct$ )

Väčšina nameraných hodnôt sa vyskytuje v prvom a treťom kvadrante, čo potvrdzuje záver vydaný na základe korelačného koeficientu, že ak je hodnota expresie jedného génu kladná, je väčšinou kladná aj hodnota expresie druhého génu (body v prvom kvadrante), ak je hodnota expresie jedného génu záporná, je väčšinou záporná aj hodnota expresie druhého génu (body v treťom kvadrante). Hodnota indexu determinácie je rovná 0,49, čo znamená že 49% variability expresie génu *DCX* je vysvetlené variabilitou expresie génu *PHOX2B*. Na základe rovnice regresnej priamky sa dá interpretovať, že s nárastom hodnoty expresie génu *PHOX2B*  $\Delta\Delta Ct$  o 1 je spojený nárast hodnoty expresie génu *DCX*  $\Delta\Delta Ct$  o 0,5975. Pri nulovej expresii génu *PHOX2B* možno očakávať priemernú expresiu génu *DCX* na hodnote -0,4548. Hodnota Pearsonovho korelačného koeficientu pre metódu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  génov *PHOX2B* a *DCX* činila hodnotu 0,95 (viz Obrázok 8).





**Obrázok 8** Porovnanie korelácie génov *PHOX2B* a *DCX* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

## 5 Diskusia

Prvým krokom k rutinnému zavedeniu vyšetovania klinických vzoriek pacientov s NBL bol výber vhodného znaku a metódy. U NBL neexistuje žiadna špecifická genetická zmena, je možné preto využiť tie, ktoré sú časté v nádorových bunkách, ale nie bunkách KD a PK (napr. amplifikácia *N-myc* onkogénu). U tohto nádoru teda nepanuje jednotný názor na voľbu vyšetovaného znaku alebo metódy. Práve preto bol pre nás NBL zaujímavý. V našej práci sme sa konkrétne zamerali na dôkaz prítomnosti MRD u NBL.

Naším hlavným cieľom bolo zistiť, ktorú z techník je pre detekciu MRD najvhodnejšie zvoliť. Rovnako ako pri iných nádorových ochorenia je KD prvým miestom relapsu ochorenia, no nie je zvyčajne jediným miestom u NBL (Faulkner, L.B a kol., 2000). Cytologické vyšetrenie punktátu KD je pre stanovenie pokročilosti ochorenia zásadné. Prítomnosť NBL buniek je primárne pred liečbou prítomná až u 70% neuroblastómov III., IV. a IV S štádia. Preto sme sa rozhodli vyšetriť vzorky KD. KD tak bola pre naše štúdium významná.

Do našej štúdie bolo zahrnutých 46 pacientov, nezávisle na ich veku a pohlaví, v období od roku 2008-2013. Každá vzorka KD bola vyšetrená cytomorfológicky, imunocytochemicky, využitím prietokovej cytometrie a metódy QRT-PCR. Predpokladali sme, že QRT-PCR metóda je pre stanovenie MRD štatisticky významne citlivejšia než cytomorfológické vyšetrenie a že QRT-PCR stanoví MRD u neuroblastómu s rovnakou citlivosťou ako imunocytochemické vyšetrenie prítomnosti MRD u neuroblastómu stanovené pomocou pozitivity na GD2.

Hlavným cieľom diplomovej práce bolo porovnať výsledky jednotlivých metód medzi sebou a preukázať, ktorá zo spomenutých štyroch techník je najvhodnejšia k preukázaniu MRD u NBL. V tejto štúdií pre nás nebol podstatný údaj, v akom štádiu ochorenia sa pacient pri odbere vzorky nachádza. Na to, aby sme mohli štatisticky spracovať tieto údaje, kde by sme pacientov sledovali na základe odberu vzoriek pred/ počas alebo po terapií sme nemali dostatočne veľký súbor pacientov. Preto sme nezohľadňovali počet vyšetrení u pacienta v konkrétnom čase, ale posudzovali vzorky jednotlivo.

Zo všetkých 132 vzoriek, ktoré sme mali k dispozícii bolo morfológicky pozitívnych 18 (13,6%) vzoriek a morfológicky negatívnych 114 (86,3%) vzoriek KD. V porovnaní s imunocytochemickou metódou ktorá preukázala pozitivitu v 32 (24,2%) vzorkách a v 100 (75,8%) vzorkách bola negatívna, preukázala morfológia nižšiu senzitivitu, čo sme dokázali aj štatisticky (p-hodnota: 0,014). Medzi metódami sme preukázali štatistický významný rozdiel. Imunocytochemická metóda jasne preukázala štatistický vyšší podiel pozitívnych výsledkov. Obidve techniky patria k štandardne vyžívaným pri detekcii MRD u NBL, aj keď je možné vyšetriť len čerstvé vzorky a tieto techniky sú navyše pomerne náročné (vyžadujú zhodnotenie buniek v mikroskope skúseným cytológom). Niekedy, nie vždy je charakteristické zhukovanie do formy neuroblastómových roziet. Ak nie sú tieto rozety vytvorené, je diferenciálne diagnostické posúdenie oproti bunkám leukemickým, alebo metastázam niektorých ohraničených solídnych nádorov (Ewingov sarkóm, non-Hodgkinský lymfóm), zložených z malých guľatých buniek obtiažne. Pre odlišenie je preto nutné vyšetrenie imunocytologické. Mehés, vo svojej štúdií preukázal, že ako veľmi perspektívny sa u NBL javí imunocytochemický alebo imunoflorescennčný dôkaz prítomnosti antigénu disialoglosidu GD2 protilátkou (14G2a) (Mehés, 2003). Corrias a kol. vo svojej štúdií publikovali, že pacienti ktorým bol NBL diagnostikovaný mali významne zvýšené hladiny voľných GD2 v sére v porovnaní so zdravými deťmi a s deťmi, ktorým bol diagnostikovaný iný typ nádoru. Protilátkou proti diasialoglosidu antiGD2 (14GD2) nádorové bunky preukázali v KD a PK. Infiltrácia GD2 pozitívnych buniek KD mala negatívny dopad na prežitie u pacientov s týmto ochorením (Corrias a kol., 2008). To že je GD2 stabilne exprimovaný na bunkách nádoru a je zachovaný aj v priebehu liečby ochorenia potvrdil vo svojej štúdií Kramer a kol. (Kramer et al., 2001).

Ďalšou z techník ktorú sme k preukázaniu MRD u NBL zvolili bola prietoková cytometria. Táto technika si vyžaduje zvoliť kombináciu vhodných znakov, najčastejšie sa jedná o využitie kombinácie leukocytárnych antigénov. Ferrerira-Facio a kol. v štúdií z roku 2013 zistili, že najviac exprimovaným markerom u solídnych nádorov detského veku je *CD56* a to konkrétne u NBL a PNET. Markery *CD45* a *CD81* ako jednotlivé boli na základe heterogenity a variability expresie označené ako klinicky limitujúce z hľadiska diferenciálnej diagnostiky medzi NBL a inými nádormi detského veku. V predošlých štúdiách bolo jednoznačne preukázané, že fenotyp *CD45<sup>-</sup>/CD81<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>* nie je

exprimovaný na povrchu nenádorového tkaniva ani v KD pacienta, ktorý nádorovým ochorením netrpí. My sme si zvolili tento fenotyp. No podľa štúdií, ktoré preukázali Nagai, 2000 a Komada, 1998, NBL nie je jediný nádor detského veku s expresiou tohto fenotypu a preto nie je pre NBL špecifický (Nagai, 2000; Komada, 1998).

Touto technikou sme preukázali pozitivitu u 11 (8,3%) vzoriek KD a negativitu u zvyšných 121 (91,7%). Čo sa týka štatistického porovnania s morfológiou nebolo možné ich vzájomne štatisticky vyhodnotiť, pretože mali len 13 odlišných výsledkov zo 132 vzoriek a tak môžeme p-hodnotu: 0,096 posudzovať ako orientačnú. Štatistický významný rozdiel v podiele pozitívnych detekcií MRD prietokovou cytometriou a morfológiu sme nepreukázali. Preukázali sme však štatisticky významný rozdiel v porovnaní s imunocytochémiou pretože p-hodnota McNemarovho testu vykázala výrazne nižšiu hodnotu než 0,05 (p-hodnota: 0,0002). Preukázali sme tak, že podiel pozitívnych výsledkov je pre imunocytochémiu výrazne vyšší než podiel pozitívnych výsledkov pre prietokovú cytometriu. V porovnaní s QRT-PCR metódou sme dosiahli výrazný rozdiel s p-hodnotou: 0,000. Podiel pozitívnych detekcií metódou QRT-PCR je štatisticky výrazne vyšší, než podiel pozitívnych detekcií prietokovou cytometriou. Prietoková cytometria je metóda rýchla, výsledok je možné získať behom niekoľkých hodín, avšak môžeme potvrdiť, že má nižšiu citlivosť než metódy molekulárne biologické. Najväčšou nevýhodou je teda jej nižšia citlivosť. Lepšie než imunocytochémiu kvantifikuje percentuálne postihnutie pri vyšších hodnotách nádorové náložie v KD a PK. Preukázali sme, že metóda prietkovej cytometrie ako primárne stagingové vyšetrenie k detekcií MRD nie je veľmi vhodná k zachyteniu ochorenia v priebehu terapie alebo pre záchyt skorého relapsu.

Ďalšou technikou ktorou sme preukazovali MRD u NBL bola metóda QRT-PCR. Výhoda tejto techniky spočíva v kvantifikácia produktu už behom PCR. Je taktiež zaistená vyššia citlivosť, presnosť a znížená variabilita medzi jednotlivými PCR. Metódou QRT-PCR sme preukázali 41 (31,1%) pozitívnych a 91 (68,9%) negatívnych vzoriek. QRT-PCR metóda má štatisticky významne vyšší podiel pozitívnych výsledkov než morfológia. P-hodnota nám v tomto prípade vyšla 0,0001. Negatívne QRT-PCR nálezy u vzoriek, ktoré boli pozitívne pri cytometrickom vyšetrení je možné vysvetliť tým, že KD nie je infiltrovaná u NBL difúzne ale ložiskovo, prípadne v zhlukoch. Oproti imunocytochemickým metódam má PCR metóda vyššiu senzitivitu a špecificitu. Veľkou výhodou je čiastočná automatizácia vyšetrenia. Limitujúce je naopak, okrem PCR *in situ*,

chýbajúca možnosť morfológického posúdenia detekovaných nádorových buniek. Technika PCR in situ však znižuje objem vyšetrovanej vzorky. V optimálnom prípade je možné zachytiť 1 nádorovú bunku medzi  $10^7$  nenádorovými bunkami. Tak vysoká senzitivita ale môže negatívne ovplyvniť špecifickosť metódy (Doeberitz M.K., a kol., 2001). K falošne pozitívnym výsledkom môže dôjsť kontamináciou prób pri ich spracovaní, amplifikáciou pseudogénov, alebo nelegitímnou expresiou skúmaného génu. Väčšina autorov preto vzhľadom k uvedeným skutočnostiam udáva senzitivitu nižšiu a to  $1:10^4$ - $1:10^6$ .

Yamamoto a kol. detekovali rozdielnu koreláciu MRD markerov v KD a PK u pacientov s neuroblastómom vysokého rizika. Zistili, že senzitivita MRD markerov vo vzorkách PK bola odlišná od vzoriek KD. Z vybraných markerov (*CHRNA3*, *CRMP1*, *DBH*, *DCX*, *DDC*, *GABRB3*, *GAP43*, *ISL1*, *KIF1A*, *PHOX2B* a *TH*), *KIF1A* a *DCX* boli pozitívne len vo vzorkách PK, ale nie vo vzorkách KD, kdežto *PHOX2B* a *DBH* boli pozitívne vo vzorkách KD ale nie vo vzorkách PK. Hoci bol predtým *DBH* uvedený ako marker MRD pre PK súčasná štúdia ho identifikovala ako jeden z najcitlivejších markerov vo vzorkách KD. Expresia týchto 11 zvolených markerov v PK a KD u pacientov vysokorizikového NBL, však signifikantne nekorelova (Yamamoto et al., 2015).

Viprey a kol. vo svojej prospektívnej štúdií z roku 2014 jasne preukázali, že úroveň hladiny *PHOX2B*, *TH* a *DCX* mRNA v KD a v PK pri stanovení diagnózy a v KD po indukčnej terapii sú nezávislé prognostické faktory EFS (Event-free survival) a OS (Overall survival) u pacientov s NBL v najpokročilejšom štádiu ochorenia, u ktorých súčasná liečba zlyháva, a ktorí tak môžu byť kandidátmi na iné alternatívne možnosti liečby alebo experimentálne postupy. Kvantitatívne dáta preukázali, že úroveň hladiny mRNA u génov: *TH*, *PHOX2*, *DCX* v KD a PK sa u detí značne líšia v dobe odberu vzoriek. V KD bol medián úrovne expresie pre všetky tri mRNA vyšší v dobe stanovenia diagnózy alebo po ukončení terapie ako vo vzorkách PK stanovený v rovnakom čase. Vysoké hladiny *TH*, *PHOXB* a *DCX* mRNA v KD a PK v dobe stanovenia diagnózy jednoznačne predikujú nepriaznivé EFS a OS. Úroveň týchto mRNA-áz bola detekovaná prostredníctvom metódy QRT-PCR (Viprey et al., 2014). Zistilo sa, že u pacientov v klinickom štádiu IV. je v KD úroveň mediánu jednotlivých expresií pre všetky tri gény vyššia v dobe stanovenia diagnózy alebo po indukčnej terapii než v PK v rovnakom čase. Medzi *TH*, *PHOX2B* a *DCX* bola veľká zhoda v koreláciách. Kombinácia mRNA v KD

nedodáva prediktívnu silu žiadnej single mRNA. V čase stanovenia diagnózy v PK a po indukčnej terapii v KD bol medián úrovne mRNA nižší, než v čase diagnózy v KD a expresia týchto mRNA korelovala o niečo menej. Môžeme tak povedať, že hladiny týchto mRNA môžu byť použité na monitorovanie statusu pacienta počas ochorenia a liečby v čase (Viprey et al., 2014). V podskupine pacientov s vysoko-rizikovým NBL sa *TH* mRNA detekovaná v PK ukázala ako nezávislý prediktívny faktor pre EFS a OS v čase stanovenia diagnózy. Po indukčnej terapii vysoké hladiny *TH* mRNA v PK a *DCX* mRNA v KD nezávisle predikujú horšiu EFS a OS. Navyše hladina *TH* mRNA detekovaná v KD predikuje horšie EFS a OS. Hladina *TH* mRNA vo vzorkách PK na konci terapie je nezávislý prediktor horšieho výsledku ochorenia. V závere tak možno povedať, že hladiny *TH* a *DCX* mRNA hodnotené prostredníctvom QRT-PCR vo vzorkách KD a PK je vhodné použiť ako spoľahlivý marker pri novej stratégii v predliečebnej stratifikácii pacientov s NBL. V metastatických bunkách NBL vysokého rizika, *TH* a *DCX* mRNA kvantifikácia môže byť použitá pre hodnotenie odozvy na liečbu a pre včasnú detekciu progresu alebo recidívy ochorenia (Yanez et al., 2015).

My sme v našej štúdií vyšetřili koreláciu týchto troch u NBL exprimovaných génoch. Pri porovnaní korelácií *TH* a *PHOX2B* ( $\Delta\Delta Ct$ ) sme zistili, že hodnoty expresií oboch génov majú vysokú variabilitu a závislosť bola vyhodnotená ako štatisticky významná s ( $p=0,00<0,05$ ). Korelačný koeficient dosiahol hodnotu 0,81. Pri porovnaní korelácie *TH* a *DCX* ( $\Delta\Delta Ct$ ) sme obdobne preukázali, že hodnoty ich expresie majú vysokú variabilitu a závislosť bola takisto vyhodnotená ako štatisticky významná ( $p=0,00<0,05$ ). Korelačný koeficient dosiahol hodnotu 0,70. V poslednom porovnaní korelácie medzi *PHOX2B* a *DCX* ( $\Delta\Delta Ct$ ) dosiahol korelačný koeficient hodnotu 0,70. a závislosť bola takisto vyhodnotená ako štatisticky významná ( $p=0,00<0,05$ ). Čím vyššia bola hladina expresie jedného génu, tým vyššia bola hladina expresie druhého génu. Bolo taktiež zistené, že ako najšpecifickejší marker k detekcii MRD u NBL sa javí *PHOX2B*, pretože nebol exprimovaný u zdravých kontrol v KD a KD, čo potvrdil Cargnin a kol. (Cargnin a kol., 2005). Yanez a kol. vo svojej štúdií preukázali v metastatických bunkách NBL vysokého rizika, že *TH* a *DCX* mRNA kvantifikácia môže byť použitá pre hodnotenie odozvy na liečbu a pre včasnú detekciu progresu alebo recidívy ochorenia (Yanez, et a kol., 2016).

Na nami definované hypotézy sme v texte diskusie odpovedali. Jasne sme preukázali, že QRT-PCR metóda je pre stanovenie MRD štatisticky významne citlivejšia než cytomorfológické vyšetrenie. To, či technika QRT-PCR stanoví MRD u neuroblastómu s rovnakou citlivosťou ako imunocytochemické vyšetrenie prítomnosti MRD u neuroblastómu stanovené pomocou pozitIVITY na GD2, nemôžeme štatisticky dokázať. Celkovo však platí, že na základe dát, aj z dôvodu nízkeho počtu odlišných detekcií, nemožno preukázať medzi imunocytochémiou a metódou QRT-PCR štatisticky významný rozdiel v podiele pozitívnych detekcií., p-hodnota: 0,05 (viz Tabuľka 6).

## 6 Záver

Príbeh spoznania významu MRD je jedným z úžasných príkladov aplikovaného výskumu, ako sa komplikovaný základný výskum presunul do vysoko technologickej laboratórnej diagnostiky a stal sa užitočným pre klinickú prax. Zavedením metód na monitorovanie MRD je možné v klinickej praxi sledovať kinetiku „tumoróznej masy“, ktorá je pod hranicou možností klasických vyšetrovacích metód. Podľa nameranej hladiny MRD u NBL sa dajú v klinickej praxi identifikovať pacienti, u ktorých je nevyhnutná modifikácia liečby, a tak zintenzívnením liečebného režimu predchádzať relapsom alebo znížením intenzity liečby znížiť aj riziko toxických účinkov liečby. Minimálna reziduálna choroba môže viesť k relapsu choroby aj mesiace, alebo roky po primárnej liečbe. Jej korelátom v biologickom materiáli je prítomnosť izolovaných nádorových buniek. Detekcia a charakterizácia cirkulujúcich nádorových buniek je vzhľadom na ich nízku koncentráciu v kostnej dreni a periférnej krvi pomerne komplikovaný proces.

V našej práci sme preukázali, že prítomnosť MRD v KD je možné využiť ako nezávislý prognostický znak. Preukázali sme, že KD je spoľahlivým kompartmentom pre pátranie MRD u NBL. Porovnali sme výsledky QRT-PCR, prietokovej cytometrie, imunocytochémie medzi sebou a u metódy QRT-PCR sledovali koreláciu génov. Taktiež sme sa pokúsili nastoliť diagnostickú schému MRD u NBL. Zistili sme, že najvhodnejšou spomedzi nami vybraných techník pre detekciu MRD u NBL je QRT-PCR metóda, ktorá preukázala najvyššiu citlivosť. V budúcnosti by teda bolo vhodné nahradiť cytologické vyšetrenie QRT-PCR alebo GD2 imunocytochémiou. Pacienti ktorí majú pozitívny nálezy v KD po ukončení indukčnej terapie majú horšie celkové prežívanie a mali by teda pokračovať v indukcií pred ďalšou terapiou (chirurgická liečba, rádioterapia

Monitorovanie MRD získalo významné postavenie v Európskych liečebných protokoloch a to na základe vysokej hodnoty predikcie liečebného výsledku a pre jeho uplatnenie v stratifikácií pacientov.



## 7 Zoznam skratiek

μl	mikroliter
ALM	akútna lymfoblastická leukémia
CD	cluster of diferentiation; diferenciačná skupina
cDNA	complementary DNA; komplementárna DNA
CK	cytokeratín
CML	chronická myeloidná leukémia
Ct	threshold cycle; prahový cyklus
CT	CT počítačová tomografia
CTCs	circulating tumor cells
DBH	dopamine beta-hydroxylase
DCLK1	Doublecortin-like kinase 1
DCX	doublecortin
DI	DNA index
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
DOPA	dihydroxyfenylalanín
EFS	Event Free Survival; obdobie po ukončení liečby bez udalosti
ES	Ewingov sarkóm
FC	flow cytometry; prietoková cytometria
FISH	fluorescent in situ hybridisation; fluorescenčná in situ hybridizácia
FR	fyziológický roztok

GAP43	growth associated protein 43
GD2	GD2 syntetáza
CHRNA3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3
IC	imunocytochémia
IDRF	Image Defined Risk Factors
IHC	imunohistochémia
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
KD	kostná dreň
kDa	kilodalton
MIBG	metaiodobenzylguanidin
ml	mililiter
MRD	minimal residual disease; minimálne reziduálna choroba
MRI	magnetic resonance imaging; magnetická rezonancia
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NBL	neuroblastóm
NGF	nerve growth factor; neurotrofný faktor
NK	nukleové kyselina
OS	Overall Survival; celkové prežívanie
PBS	phosphat-buffered saline; fosfátový pufr
PBSC	periferal blood stem cells; periférne kmeňové bunky

PCNA	proliferačný nukleárny antigén
PGP 9.5	neuroendokrinný proteín 9.5
PHOX2B	paired-liked-homeobox 2b
PK	periférna krv
PNET	primitive neuroectodermal tumor
qPCR	quantitative PCR; kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia QRT-PCR quantitative reverse transcription PCR; kvantitatívna reverznej transkriptázovej polymerázovej reťazovej reakcia
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction; reverznej transkriptázovej polymerázovej reťazovej reakcia
TH	tyrozín hydroxyláza
trkA,B,C	gény receptorov tyrozín kinázy
UZ	ultrazvukové vyšetrenie

## 8 Zoznam použitej literatúry

Beillard, E., Pallisgaard, N., van der Velden, V.H.J., Bi, W., Dee, R., van der Schoot, E., Delabesse, E., Macintyre, E., Gottardi, E., Saglio, G., *et al.* (2003). Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17, 2474-2486.

Berois, N., Varangot, M., Osinaga, E., Babino, A., Caignault, L., Muse, I., and Roseto, A. (1997). Detection of rare human breast cancer cells. Comparison of an immunomagnetic separation method with immunocytochemistry and RT-PCR. *Anticancer Res* 17, 2639-2646.

Bischoff, J., Rosenberg, R., Dahm, M., Janni, W., and Gutschow, K. (2003). Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients with metastatic breast cancer. In *Molecular Staging of Cancer*, H. Allgayer, M.M. Heiss, and F.W. Schildberg, eds. (Berlin: Springer-Verlag Berlin), pp. 135-140.

Borgen, E., Beiske, K., Trachsel, S., Nesland, J.M., Kvalheim, G., Herstad, T.K., Schlichting, E., Qvist, H., and Naume, B. (1998). Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: Non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 185, 427-434.

Braun, S., Kentenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., and Pantel, K. (2000). Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18, 80-86.

Brenner, M.K., Rill, D.R., Holladay, M.S., Heslop, H.E., Moen, R.C., Buschle, M., Krance R.A., Santana, V.M., Anderson, W.F., Ihle, J.N. (1993). Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet*; 342 (8880):1134-7.

Breslow, R. (1971). *Advan. Chem. Ser. No. 100*, 21.

Brodeur, G.M. and Maris, J.M. (2002). Neuroblastoma. In *Principles and practice of pediatric oncology*, 4th ed. (eds. P.A. Pizzo and D.G. Poplack), pp. 895–938.

- Brodeur, G.M. (2003). Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3, 203-216.
- Burchill, S.A., Lewis, I.J., Abrams, K.R., Riley, R., Imeson, J., Pearson, A.D.J., Pinkerton, R., and Selby, P. (2001). Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol* 19, 1795-1801.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. 34(3):597-601
- Campana, D. (1993). Detection of minimal residual disease in leukemia and lymphoma. *Recent Advances in Hematology*.
- Campana, D., and Coustan-Smith, E. (1999). Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38, 139-152.
- Campana, D., and Coustan-Smith, E. (2002). Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 15, 1-19.
- Campana, D., Coustansmith, E., and Behm, F.G. (1991). THE DEFINITION OF REMISSION IN ACUTE-LEUKEMIA WITH IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES. *Bone Marrow Transplant* 8, 429-437.
- Campana, D., and Pui, C.H. (1995). DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE-LEUKEMIA - METHODOLOGIC ADVANCES AND CLINICAL-SIGNIFICANCE. *Blood* 85, 1416-1434.
- Cargnin, F., Flora, A., Di Lascio, S., Battaglioli, E., Longhi, R., Clementi, F., and Fornasari, D. (2005). PHOX2B regulates its own expression by a transcriptional auto-regulatory mechanism. *J Biol Chem* 280, 37439-37448.
- Combaret, V., Favrot, M.C., Kremens, B., Philip, I., Cailly, C., Fontaniere, B., Gentilhomme, O., Chauvin, F., Zucker, J. M., Bernard, J. L., and Phillip, T. (1989). Immunological detection of neuroblastoma cells in bone marrow harvested for autologous transplantation. *Br.J.Cancer*, 59, 844.
- Corrias, M.V., Parodi, S., Haupt, R., Lacitignola, L., Negri, F., Sementa, A., Dau, D., Scuderi, F., Carlini, B., Bianchi, M., *et al.* (2008). Detection of GD2-positive cells in bone

marrow samples and survival of patients with localised neuroblastoma. *Br J Cancer* 98, 263-269.

Eckschlager, T. (1992). LYMPHOCYTE COUNT AS A PROGNOSTIC FACTOR IN CHILDHOOD-CANCER. *Pediatr Hematol Oncol* 9, 99-105.

Eckschlager, T. a kolektiv (1999). *Průtoková cytometrie v klinické praxi*; Grada Publishing, ISBN 80-7169-279-4.

Eckschlager, T., McClain, K. (1996). Comparison of fluorescent in situ hybridization (FISH) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of residual neuroblastoma cells.; 43(5):301-3.

Ferreira-Facio, C.S., Milito, C., Botafogo, V., Fontana, M., Thiago, L.S., Oliveira, E., da Rocha, A.S., Werneck, F., Forny, D.N., Dekermacher, S., *et al.* (2013). Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. *Plos One* 8, 10.

Fields, K.K., Effenbein, G.J., Trudeau, W.L., Perkins, J.B., Janssen, W.E., and Moscinski, L.C. (1996). Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 14, 1868-1876.

Frantz, C.N., Duerst, R.E., Ryan, D.H., Gelsomino, N.L., Constine, L.S., Gregory, P.K. (1985). Anti-neuroblastoma monoclonal antibodies which do not bind to bone marrow cells. *Advances in neuroblastoma research*

Goto, S., Umehara, S., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Lukens, J.N., Matthay, D.K., and Shimada, H. (2001). Histopathology (international neuroblastoma pathology classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors - A report from the children's cancer group. *Cancer* 92, 2699-2708.

Hagenbeek, A. (1992). MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN LEUKEMIA - STATE-OF-THE-ART 1991. *Leukemia* 6, 12-16.

Hrstka, R., Kolářová, T., Michalová, E., Vojtěšek, B. (2014). Vývoj metod založených na PCR a jejich amplifikace v onkologickém výzkumu a praxi. *Klin. Onkol.*, 27(Supp11), S69-S74.

- Cheung, I.Y., Lo Piccolo, M.S., Kushner, B.H., Kramer, K., and Cheung, N.K.V. (2003). Quantitation of GD2 synthase mRNA by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: Clinical utility in evaluating adjuvant therapy in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21, 1087-1093.
- Janossy, G., Campana, D., and Amlot, P.L. (1988). LEUKEMIA AND LYMPHOMA TREATMENT WITH AUTOLOGOUS BONE-MARROW TRANSPLANTATION - PRECLINICAL STUDIES. *Cancer Detect Prev* 12, 597-604.
- Jenčo, I. (2014). Neuroblastómy detského veku. *Onkológia (Bratisl.)*; roč. 9(4): 249–252.
- Kasimir-Bauer, S., Oberhoff, C., Sliwinska, K., Neumann, R., Schindler, A.E., and Seeber, S. (2001). Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use ? *Breast Cancer Res Treat* 69, 123-132.
- Komada, Y., Azuma, E., Kamiya, H., and Sakurai, M. (1986). PHENOTYPIC PROFILE OF HUMAN NEUROBLASTOMA CELL-LINES - ASSOCIATION WITH MORPHOLOGICAL-CHARACTERISTICS. *Br J Cancer* 54, 711-715.
- Komada, Y., Azuma, E., Yamamoto, H., Tanaka, S., Shimizu, K., Kamiya, H., Sakurai, M., and Izawa, T. (1989). DISCONTINUING THERAPY IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC-LEUKEMIA TREATED WITH A CHEMO-IMMUNOTHERAPY PROTOCOL. *Cancer Immunol Immunother* 29, 51-56.
- Komada, Y., Zhang, X.L., Zhou, Y.W., Inaba, H., Deguchi, T., Azuma, E., and Sakurai, M. (1998). Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer* 82, 591-599.
- Kramer, K., Gerald, W.L., Kushner, B.H., Larson, S.M., Hameed, M., and Cheung, N.K.V. (2001). Disialoganglioside G(D2) loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 36, 194-196.
- Kubisz, P. (2006). *Hematológia a transfuziológia*. 1. vydání, Grada Publishing, 324pp.
- Kvalheim, G. (1998). Diagnosis of minimal residual disease in bone marrow and blood in cancer patients - Methods and clinical implications. *Acta Oncol* 37, 455-462.

- Lee, M.S., Chang, K.S., Freireich, E.J., Kantarjian, H.M., Talpaz, M., Trujillo, J.M. Stass, S.A. (1988). Detection of minimal residual bcr/abl transcripts by a modified polymerase chain reaction. *Blood* 72:893-897.
- Lipinski, M., Hirsch, M.R., Deagostinibazin, H., Yamada, O., Tursz, T., and Goridis, C. (1987). CHARACTERIZATION OF NEURAL CELL-ADHESION MOLECULES (NCAM) EXPRESSED BY EWING AND NEUROBLASTOMA CELL-LINES. *Int J Cancer* 40, 81-86.
- Logan, J., Edwards, K., Saunders, N., (2009). Real-time PCR. Current Technology and Application. Norfolk: Caister Academic Press.
- Louthan, O. (2006). Neuroendokrinní nádory: klinické pohledy. Grada ISBN 80-247-1162-1.
- Mattano, L.A., Moss, T.J., and Emerson, S.G. (1992). SENSITIVE DETECTION OF RARE CIRCULATING NEUROBLASTOMA-CELLS BY THE REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN-REACTION. *Cancer Res* 52, 4701-4705.
- McPherson, M.J., Moller S.G., (2000). PCR. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Mehes, G., Luegmayr, A., Ambros, I.M., Ladenstein, R., and Ambros, P.F. (2001). Combined automatic immunological and molecular cytogenetic analysis allows exact identification and quantification of tumor cells in the bone marrow. *Clin Cancer Res* 7, 1969-1975.
- Mehes, G., Luegmayr, A., Kornmuller, R., Ambros, I.M., Ladenstein, R., Gadner, H., and Ambros, P.F. (2003). Detection of disseminated tumor cells in neuroblastoma - 3 log improvement in sensitivity by automatic immunofluorescence plus FISH (AIPF) analysis compared with classical bone marrow cytology. *American Journal of Pathology* 163, 393-399.
- Monclair, T., Brodeur, G.M., Ambros, P.F., Brisse, H.J., Cecchetto, G., Holmes, K., Kaneko, M., London, W.B., Matthay, K.K., Nuchtern, J.G., *et al.* (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol* 27, 298-303.
- Moss, T.J. (1999). Clinical relevance of minimal residual cancer in patients with solid malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 18, 91-100.



- Nagai, J., Ishida, Y., Koga, N., Tanaka, Y., Ohnuma, K., Toyoda, Y., Katoh, A., Hayabuchi, Y., and Kigasawa, H. (2000). A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma cells in peripheral blood using flow cytometry. *Journal of Pediatric Hematology Oncology* 22, 20-26.
- Naito, H., Kuzumaki, N., Uchino, J., Kobayashi, R., Shikano, T., Ishikawa, Y., and Matsumoto, S. (1991). DETECTION OF TYROSINE-HYDROXYLASE MESSENGER-RNA AND MINIMAL NEUROBLASTOMA-CELLS BY THE REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN-REACTION. *Eur J Cancer* 27, 762-765.
- Ootsuka, Y., Blessing, W.W., Steiner, A.A., and Romanovsky, A.A. (2008). Fever response to intravenous prostaglandin E-2 is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 294, R1294-R1303.
- Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R., and Levy, S. (1990). TAPA-1, THE TARGET OF AN ANTIPROLIFERATIVE ANTIBODY, DEFINES A NEW FAMILY OF TRANSMEMBRANE PROTEINS. *Mol Cell Biol* 10, 4007-4015.
- Peuchmaur, M., d'Amore, E.S.G., Joshi, V.V., Hata, J., Roald, B., Dehner, L.P., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Lukens, J.N., Matthay, K.K., *et al.* (2003). Revision of the international neuroblastoma pathology classification - Confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 98, 2274-2281.
- Pritchard, J., and Hickman, J.A. (1994). WHY DOES STAGE 4S NEUROBLASTOMA REGRESS SPONTANEOUSLY. *Lancet* 344, 869-870.
- Qiu, S.D., Young, C.Y., Bilhartz, D.L., Prescott, J. L., Farrow, G.M., He, W.W., and Tindall, D.J. (1990). In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J Urol* 144, 1550-1556.
- Rečková, M., Mego, M. (2007). Vybrané kazuistiky náhlých stavov v onkologii. Infopress.
- Rill, D.R., Buschle, M., Foreman, N.K., Bartholomew, C., Moen, R.C., Santana, V.M., Ihle, J.N. Brenner, M.K. (1992). Retrovirus-mediated gene transfer as an approach to analyze neuroblastoma relapse after autologous bone marrow transplantation. *Hum Gene Ther.*; 3(2):129-36.

- Riley, R.S., Hogan, T.F., Pavot, D.R., Forysthe, R., Massey, D., Smith, E., Wright, L., and Ben-Ezra, J.M. (2004). A pathologist's perspective on bone marrow aspiration and biopsy: I. Performing a bone marrow examination. *J Clin Lab Anal* 18, 70-90.
- Robinson, J.K., Rademaker, A.W., Goolsby, C., Traczyk, T.N., and Zoladz, C. (1996). DNA ploidy in nonmelanoma skin cancer. *Cancer* 77, 284-291.
- Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B., Stram, D.O., Gerbing, R.B., Lukens, J.N., Matthay, K.K., *et al.* (1999). The International Neuroblastoma Pathology classification (the Shimada system). *Cancer* 86, 364-372.
- Schell, M. and Bergeron, C. (2003). Neuroblastoma. Orphanet Encyclopedia, Centre Le'on Be'ard, Service de Pe'diatrie.
- Schwab, M. (1999). Human neuroblastoma: From basic science to clinical debut of cellular oncogenes. *Naturwissenschaften* 86, 71-78.
- Stutterheim, J., Gerritsen, A., Zappeij-Kannegieter, L., Yalcin, B., Dee, R., van Noesel, M.M., Berthold, F., Versteeg, R., Caron, H.N., van der Schoot, C.E., *et al.* (2009). Detecting Minimal Residual Disease in Neuroblastoma: The Superiority of a Panel of Real-Time Quantitative PCR Markers. *Clin Chem* 55, 1316-1326.
- Trager, C., Kogner, P., Vernby, A., Caren, H., Kryh, H., Martinsson, T., Gustafsson, G., and Kogner, P. (2009). NEUROBLASTOMA INCIDENCE WAS STABLE BUT DIFFERENT FOR BOYS AND GIRLS OVER 27 YEARS IN SWEDEN WHILE NEUROBLASTOMA PROGNOSIS IMPROVED, IN PARTICULAR FOR HIGH-RISK DISEASE. *Pediatr Blood Cancer* 53, 747-747.
- Trager, C., Vernby, A., Kullman, A., Ora, I., Kogner, P., and Kagedal, B. (2008). mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer* 123, 2849-2855.
- Viprey, V.F., Corrias, M.V., Kagedal, B., Oltra, S., Swerts, K., Vicha, A., Ladenstein, R., and Burchill, S.A. (2007). Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: Quality assurance on behalf of SIOPEN-R-NET. *Eur J Cancer* 43, 341-350.

Viprey, V.F., Gregory, W.M., Corrias, M.V., Tchirkov, A., Swerts, K., Vicha, A., Dallorso, S., Brock, P., Luksch, R., Valteau-Couanet, D., *et al.* (2014). Neuroblastoma mRNAs Predict Outcome in Children With Stage 4 Neuroblastoma: A European HR-NBL1/SIOPEN Study. *J Clin Oncol* 32, 1074-+.

Viprey, V.F., Lastowska, M.A., Corrias, M.V., Swerts, K., Jackson, M.S., and Burchill, S.A. (2008). Minimal disease monitoring by QRT-PCR: guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials. *J Pathol* 216, 245-252.

Weinstein, J.L., Katzenstein, H.M., and Cohn, S.L. (2003). Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist* 8, 278-292.

Yamamoto, N., Kozaki, A., Hartomo, T.B., Yanai, T., Hasegawa, D., Kawasaki, K., Kosaka, Y., Matsuo, M., Hirase, S., Mori, T., *et al.* (2015). Differential expression of minimal residual disease markers in peripheral blood and bone marrow samples from high-risk neuroblastoma patients. *Oncol Lett* 10, 3228-3232.

Yanez, Y., Grau, E., Rodriguez-Cortez, V.C., Hervas, D., Vidal, E., Noguera, R., Hernandez, M., Segura, V., Canete, A., Conesa, A., *et al.* (2015). Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma. *Clin Epigenetics* 7, 14.

YerlyMotta, V., Racadot, E., Fest, T., Bastard, C., Ferrand, C., Deschaseaux, M.L., and Herve, P. (1996). Comparative preclinical study of three bone marrow purging methods using PCR evaluation of residual t(14;18) lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 23, 313-321.

## **Internetové zdroje**

URL1<<http://preventiongenetics.com/clinical-dna-testing/test/hereditary-neuroblastoma-via-the-phox2b-gene/1306/>> citované dňa 12.4.2014

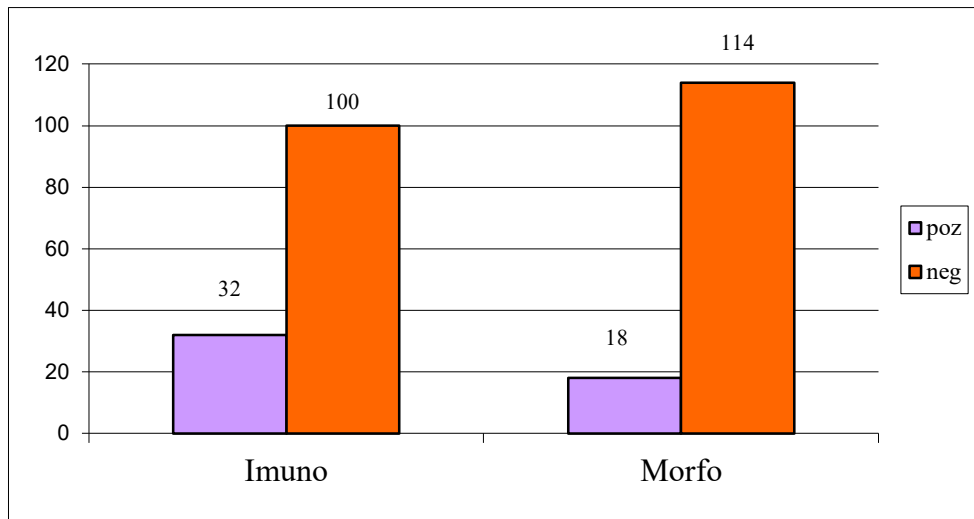
URL2<<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TH>> citované dňa 12.4.2014

URL3<<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/DCX>> citované dňa 13.4.2014

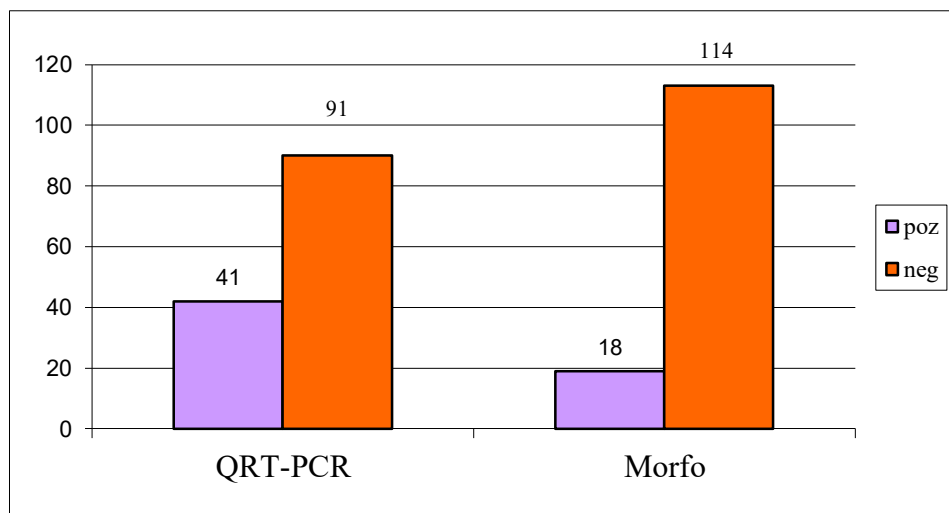
URL4<<http://www.jneurosci.org/content/30/3/905.abstract>> citované dňa 15.4.2014

## 9 Prílohy

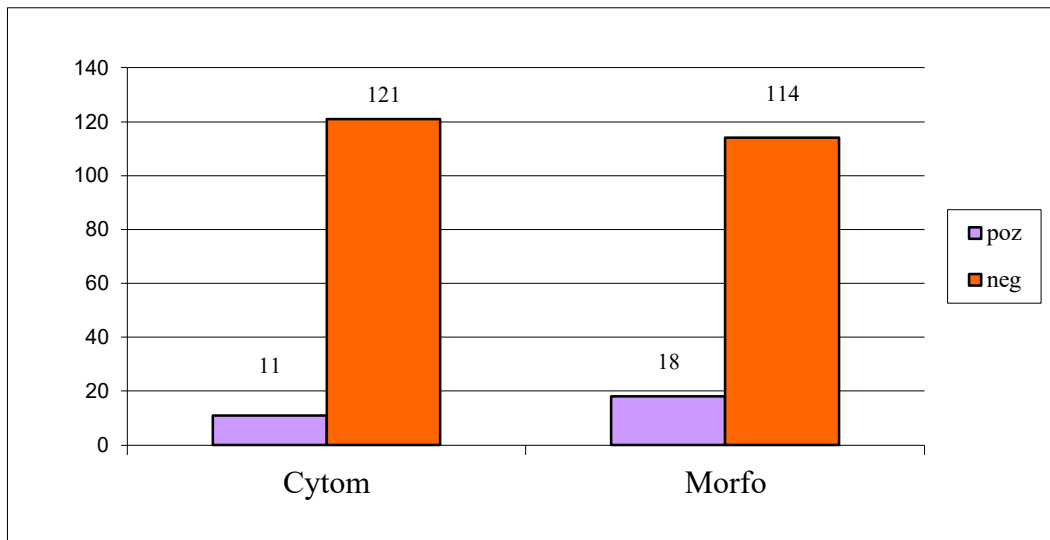
**Príloha 1** Porovnanie poz./neg. u metód imunocytochémié a morfológie



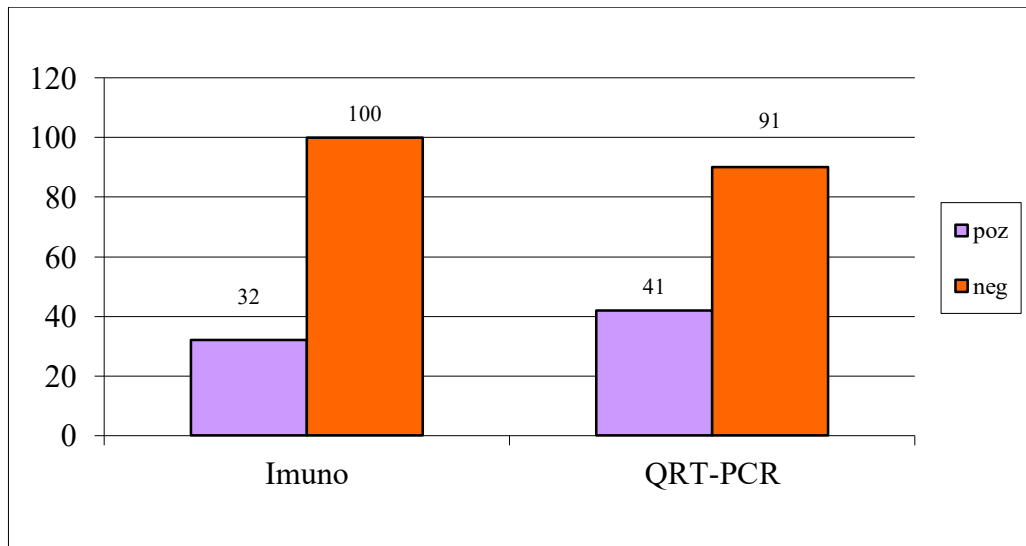
**Príloha 2** Porovnanie poz./neg. u metód QRT-PCR a morfológie



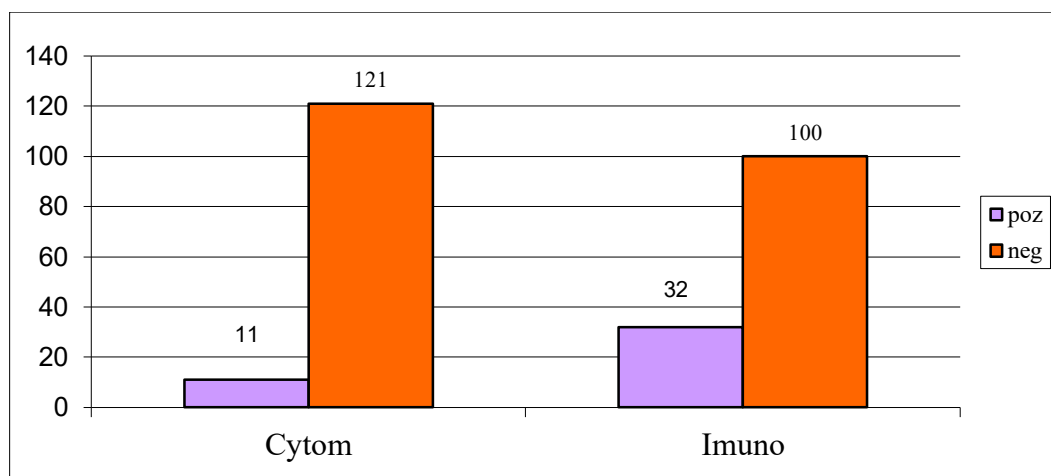
**Príloha 3** Porovnanie poz./neg. u metód cytometrie a morfológie



**Príloha 4** Porovnanie poz./neg. u metód imunocytochémie a QRT-PCR



**Príloha 5** Porovnanie poz./neg. u metód cytometrie a imunocytochémié



**Príloha 6** Porovnanie poz./neg u metód cytometrie a QRT-PCR

