

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2016

Barbora Smolová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Barbora Smolová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**SROVNÁNÍ KVANTITY A KVALITY NUKLEOVÝCH
KYSELIN IZOLOVANÝCH Z HISTOLOGICKÝCH ŘEZŮ
RŮZNÉHO STÁŘÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

PLZEŇ 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškerá měření a analýzy jsem prováděla sama, text jsem vytvářela na základě pochopení dané problematiky a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 23.3.2016

.....

vlastnoruční podpis

Děkuji RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval, za cenné rady, odborné připomínky, poskytnutí materiálních podkladů a za možnost podílet se na výzkumných studiích zpracovávaných v laboratoři ústavu biologie LF v Plzni. Dále děkuji PharmDr. Václavě Černé za vypracování statistických grafů a Ing. Pavlíně Pánové za uvedení do dané problematiky, odborný dohled, seznámení s dalšími metodami a za morální podporu během zpracování bakalářské práce.

Anotace

Příjmení a jméno: Smolová Barbora

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Srovnání kvantity a kvality nukleových kyselin izolovaných z histologických řezů různého stáří

Vedoucí práce: RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Počet stran – číslované: 59

Počet stran – nečíslované: 24

Počet příloh: 5

Počet titulů použité literatury: 22

Klíčová slova: analýza – DNA – FFPE – glioblastom – izolace – metody – miRNA – nádor – nádory jater – nádory štítné žlázy – NK – RNA – RT - PCR

Souhrn:

Tato bakalářská práce obsahuje část teoretickou a praktickou. V teoretické části je popsán vznik, iniciace a růst nádorového onemocnění, včetně faktorů schopných vyvolat změny v genomu buněk organismu a genů, jejichž poškození vede k nádorové progresi. Dále je v teoretické části kapitola věnovaná metodám analýzy patogeneze nádorů, která zahrnuje jak hodnocení změn metodami molekulární biologie, ale i histologie a imunoanalýzy.

Praktická část začíná definováním cílů a metodikou práce. Následuje část věnovaná metodám izolace NK a poté podrobný popis izolace NK na silikátovém povrchu, což je princip kolonkové metody, kterou jsem ve své práci použila. Následují naměřené parametry izolované DNA a RNA, statistické vyhodnocení a interpretace výsledků.

Annotation

Surname and name: Smolová Barbora

Department: Department of theoretical fields

Title of thesis: Comparing the quantity and quality of nucleic acids isolated from histological sections of various ages

Consultant: RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Number of pages – numbered: 59

Number of pages – unnumbered: 24

Number of appendices: 5

Number of literature items used: 22

Keywords: analysis – DNA – FFPE – glioblastoma – isolation – liver tumors – methods – miRNA – NA – RNA – RT - PCR – thyroid tumors – tumor

Summary:

This bachelor thesis consists of two parts: the theoretical one and the practical one. In the theoretical part there are described origin, initiation and growth of the neoplastic disease, including the factors triggering the changes in a genome of cells of organisms and genes, whose damage leads to a cancerous growth. Additionally, this part contains a chapter dedicated to the methods of analysis of tumor pathogenesis, which includes both evaluation of changes to the methods of molecular biology, but also histology and immuno-analysis.

The practical part begins by defining the objectives and methodology of the work. The following is a section devoted to the methods of isolation of NA, and then a detailed description of the isolation of the NA above the surface, which is the principle column method, which I core in my work. The following are the measured parameters of the isolated DNA and RNA, statistical evaluation and interpretation of results.

OBSAH

ÚVOD.....	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ	12
1.1 Obecná definice nádoru	12
1.2 Patogeneze nádorového růstu	12
1.2.1 Soubor příčin a mechanismů vzniku zhoubných nádorů.....	12
1.2.2 Iniciace nádorové transformace.....	14
1.2.3 Růst zhoubných nádorů	15
1.3 Geny, jejichž poškození vede k nádorové progresi	17
1.3.1 Protoonkogeny.....	17
1.3.2 Tumor supresorové geny	18
2 METODY ANALÝZY PATOGENEZE NÁDORŮ.....	19
2.1 Hodnocení změn na úrovni tkáně - histologie	19
2.1.1 Základní histologické vyšetření.....	19
2.1.2 Peroperační histologické vyšetření.....	19
2.1.3 Imunohistochemie	19
2.1.4 Elektronová mikroskopie.....	20
2.2 Změny na úrovni nukleových kyselin.....	20
2.2.1 Polymerázová řetězová reakce	20
2.2.2 Southern blotting	21
2.2.3 Sekvenace	21
2.3 Analýza genové exprese v nádorové tkáni.....	23
2.3.1 Měření hladin mRNA pomocí RT – PCR	23
2.3.2 DNA čipy a expresní čipy	23
2.4 Stanovení množství proteinů	24
2.4.1 Western blotting	24
2.4.2 ELISA.....	24
2.5 TNM klasifikace	24
PRAKTICKÁ ČÁST	26
3 CÍL PRÁCE.....	26
3.1 Metodika	26
3.2 Výzkumné otázky	26
4 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN PRO ANALÝZY GENOVÉ EXPRESE	28
4.1 Metody izolace.....	28
4.1.1 Fenol - chloroformová extrakce nukleových kyselin	28

4.1.2	Adsorpce na silikátový povrch	29
4.1.3	Izolace nukleových kyselin z formalinem fixované, v parafínu zalité tkáně 29	
4.2	Hodnocení čistoty nukleových kyselin	30
4.2.1	RNA.....	30
4.2.2	DNA	30
4.3	Doporučená opatření pro přípravu vzorků a následnou izolaci nukleových kyselin 30	
5	POPIS IZOLACE DNA A RNA PROVEDENÉ ZE STEJNÉHO VZORKU NÁDOROVÉ TKÁNĚ ZALITÉ V PARAFÍNOVÉM BLOČKU (FFPE)	35
5.1	Příprava řezů tkáně pro izolaci nukleových kyselin	35
5.2	Příprava soupravy AllPrep® DNA/RNA Kit QIAGEN pro izolaci nukleových kyselin.....	35
5.3	Deparafinizace tkáně pro izolaci nukleových kyselin	36
5.4	Izolace RNA	37
5.5	Izolace DNA	38
5.6	Statistické vyhodnocení	40
6	VÝSLEDKY	41
7	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	47
8	DISKUZE	67
	ZÁVĚRY PRO PRAXI	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ	
	SEZNAM ZKRATEK	
	SEZNAM TABULEK	
	SEZNAM OBRÁZKŮ	
	SEZNAM GRAFŮ	
	SEZNAM PŘÍLOH	

ÚVOD

Pokroky v onkologické léčbě v posledním desetiletí prodloužily přežití pacientů s onkologickým onemocněním, avšak tato onemocnění jsou stále nejčastějším úmrtím v 5. a 6. dekádě života. Pro co nejlepší léčebné výsledky je důležité jak časný záchyt onkologických onemocnění, tak správně stanovené stádium onemocnění, které umožňuje adekvátní indikaci onkologické léčby.

Pro pochopení patogeneze nádorových onemocnění je důležitá nejen histologická analýza tkáně, ale také poznání změn na úrovni DNA (deoxyribonukleová kyselina) a genové exprese. Úvodu do této problematiky je věnována teoretická část bakalářské práce.

Jednou z možností výzkumu patogeneze nádorového onemocnění je analýza histologických bločků tzn. formalinem fixované v parafinu zalité tkáně (FFPE). Takovéto bločky jsou rutinně připravovány pro diagnostiku nádorového onemocnění pacienta. Tyto bločky je možné využít i retrospektivně a novými metodami z nich izolovat DNA a RNA (ribonukleová kyselina) pro molekulárně genetické analýzy. Izolace DNA a RNA z histologických bločků a vztah jejich výtěžku k typu tkáně jsou předmětem praktické části mé bakalářské práce.

TEORETICKÁ ČÁST

1 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

1.1 Obecná definice nádoru

„Nádor je geneticky podmíněný abnormální přírůstek buněčné tkáňové hmoty klonálního charakteru. Jeho růst není v koordinaci s růstem okolních tkání a rovnovážným stavem organismu. Nádorová proliferace přetrvává i po odstranění základního etiologického momentu.“ (1, s. 16)

Základem růstu změněných buněk tkáně jsou trvalé změny genotypu těchto buněk, to znamená změny genotypu somatických buněk. Pravděpodobně všechny buňky jednoho nádoru pocházejí z jedné změněné buňky (klonální charakter). (1)

Obecně platí, že rychlost přírůstku transformovaných buněk nádorové tkáně je vyšší než v nezměněné okolní tkáni, ovšem čas mezi jednotlivými mitózami u nádorových buněk je často delší ve srovnání se zdravými proliferujícími kmenovými buňkami či dokonce buňkami embryonálními. Tedy přírůstek nádorově transformovaných buněk není způsoben rychlostí proliferace, nýbrž snížením odumírání nádorových buněk. Je tedy porušena rovnováha mezi přírůstkem a zánikem těchto buněk. (1)

Další charakteristikou nádorových buněk je bezúčelný růst buněčné hmoty, která často omezuje svými potřebami okolní tkáň a zdravé buňky. (1)

1.2 Patogeneze nádorového růstu

1.2.1 Soubor příčin a mechanismů vzniku zhoubných nádorů

Vznik nádorového bujení je vždy multifaktoriální a probíhá ve více etapách. Základem je několikanásobná mutace ve dvou až čtyřech soustavách genů důležitých pro život buňky. Jednak je to mutace v celulárních protoonkogenech a v antionkogenech zajišťujících proliferaci buňky, dále mutace v genech apoptotické kaskády a v genech opravy poškození DNA. Takovouto transformaci buňky způsobí jednak zevní mutageny, a jednak konstituční vlastnosti genomu dané buňky. (1, 2)

Zevní mutageny schopné vyvolat změny v genomu buněk organismu dělíme do tří skupin-chemické karcinogeny, fyzikální karcinogeny a biologické karcinogenní faktory. (1)

Chemické karcinogenní látky jsou velkou skupinou účinných mutagenů s nejrůznější chemickou strukturou a výraznou afinitou k DNA. Některé z nich působí změny DNA přímo, dokáží se vázat s molekulou DNA bez jakékoli předchozí metabolické přeměny. Jiné dosáhnou karcinogenního charakteru až po metabolickém zpracování organismem. Mechanismus působení na molekulární úrovni je však stejný. Jsou vysoce elektrofilní, což způsobuje jejich reakce s místy bohatými na elektrony (DNA, RNA, proteiny). Mezi chemické karcinogeny řadíme např. kamenouhelný dehet, aromatické aminy, látky vznikající při výrobě syntetických textilií, plastů, umělých hnojiv, herbicidů, pesticidů, nitráty, nitridy, dimethylaminoazobenzen, cigaretový dehet, mastné kyseliny ve stravě, kovy a jiné. (1, 3)

Fyzikální karcinogenní faktory mají také schopnost vyvolat změny v genetické informaci. Nejznámějším fyzikálním mutagenem je ionizující záření. Ionizující záření působí dvěma základními mechanismy. První z nich je založen na náhodné interakci ionizujícího záření s molekulami buňky, které vedou k chemickým změnám. Ty následně interagují s molekulou DNA a způsobí mutace nebo chromosomální aberace. Druhým mechanismem poškození je přímá absorpce energie ionizujícího záření molekulou DNA a následně dochází k vyvolání mutace, či chromosomové aberace. Dalším zářením s karcinogenním účinkem je záření ultrafialové vytvářející v DNA dimery pyrimidinu, což má za následek zejména chyby v transkripci. Do této skupiny mutagenů řadíme i infračervené záření. (3)

Mechanismus účinku *biologických karcinogenních látek* je podobný jako u látek chemických, dojde k vazbě mutagenu s DNA. Do této skupiny řadíme většinu virů (RNA a DNA viry). RNA onkogenní viry napadenou buňku nezničí přímo, začlení svůj genom do genomu buňky ve formě DNA kopie svého RNA genomu, kterou vytvoří pomocí enzymu nazývaného reversní transkriptáza, která je základní složkou funkční virové částice. Tento proces zajistí tzv. horizontální přenos virové informace mezi buňkami hostitele. Po začlenění virového genomu mohou nastat tři typy vztahu mezi RNA virem (retrovirem) a organismem hostitele. Za určitých okolností může dojít k nádorové transformaci buňky, častěji však vzniká nenádorové onemocnění, jakým je např. HIV (Human Immunodeficiency Virus) nebo chřipka. Retrovirus se také může začlenit do genomu buňky, šířit se dál a nezpůsobit žádné závažné škody. Nákaza onkogenním virem DNA je dvoufázová. V první fázi dochází k replikaci virové DNA v jádře hostitelské buňky zároveň se syntézou buněčné DNA. Buňky z G0 a G1 fáze přejdou do fáze

S a právě tento přechod infikovaných buněk je předpokladem transformační schopnosti viru. Druhá fáze virové infekce slouží k syntéze virových proteinů a k dozrávání nových virionů (základní částice viru se schopností infikovat hostitelské buňky), díky jejichž pomnožení dojde k lyzi infikované buňky. Mezi onkogenní DNA viry řadíme viry HPV (Human Papilloma Virus), EBV (Epstein – Barr Virus), HBV (Hepatitis B Virus), KSHV (Kaposi Sarcoma – Associated Herpesvirus) atd. (1, 3)

Faktory schopné vyvolat změny v genomu buněk organismu nemusí být jen zevní, ale i *vnitřní*. Bylo zjištěno, že v DNA eukaryotických buněk se vyskytují úseky podobné s virovými onkogeny, které svými produkty ovlivňují buněčnou diferenciaci a proliferaci. Jejich aktivitu můžeme vysledovat většinou pouze v embryonálním a fetálním období, případně v době, kdy je zvýšená proliferace tkáně. Jelikož byla zjištěna velmi vysoká aktivita těchto genů v nádorových buňkách, nazýváme je celulárními onkogeny. Příkladem je celulární onkogen c-abl nacházející se v místě zlomu při translokaci části raménka 22 nejčastěji na chromosom 9 (Filadelfský chromosom). Do skupiny vnitřních faktorů řadíme např. poškození DNA vlivem radikálů generovaných vlastním metabolismem buňky, nebo chybné zařazení nukleotidů DNA polymerázou během replikace. (1, 3)

1.2.2 Iniclace nádorové transformace

Iniclace a další progresse nádorové transformace probíhá stupňovitě a celý proces trvá poměrně dlouhou dobu (např. u kolorektálního karcinomu až desítky let). Na základě fenotypových změn nádorový růst dělíme do tří fází. První fází je indukce, druhou blastoma in situ a třetí fází je progresse nádoru, která může vyústit v jeho metastazování. (1, 4, 5)

Indukční fázi můžeme dále rozdělit na tři vývojové etapy. Nádorový zvrát buňky je etapou první, iniciační. Jedná se o ireverzibilní změnu genotypu dané buňky, případně skupiny buněk, která je nejčastěji způsobena mutacemi. K iniciaci dochází prostřednictvím působení mnoha transformujících faktorů a to velmi brzy po začátku jejich působení. Tyto faktory nazýváme iniciátory. Postižená buňka je často natolik poškozená mutacemi, že spontánně zaniká apoptózou, případně jsou vzniklé chyby opraveny reparačními mechanismy buňky. Iniclace může být chemická, fyzikální či biologická. V případě, že se jedná o iniciaci chemickou, dojde v buňce k vazbě iniciátoru na DNA. Při iniciaci fyzikální dochází ke změně DNA přímou či

zprostředkovanou cestou. Iniclace biologická má za následek inzerci heterologních či aktivaci vlastních onkogenních součástí. Další etapou indukční fáze je etapa latence. Doba trvání této etapy je individuální a poměrně variabilní co se týče procesů probíhajících v nádorové tkáni. Jedná se buď o stálé působení iniciátoru, což může vést k opakované eliminaci změněných buněk organismem, nebo již dojde k prvním změnám následující etapy postrádající výraznější fenotypové změny doposud normálně vypadající buňky. Třetí a zároveň poslední etapou indukční fáze je etapa promoce vyžadující dlouhodobější účinek promočního faktoru. Takovýmto faktorem neboli promotorem, může být karcinogenní látka, působení růstových faktorů, hormonální dráždění, fyzikální iritace, ale i onkogenní virus. Obecně je to látka, která bez předchozího podnětu nádorovou přeměnu nevyvolá. Hlavní funkcí promotoru je stimulace dělení mutované buňky, čímž dochází ke zvýšení proliferace a zvýšení počtu mitóz mutovaných buněk. Pravděpodobnost fixace genetické chyby způsobené iniciační mutací se zvyšuje a zároveň vznikají výhodné podmínky pro vznik dalších genomových změn v nádorové tkáni. V tuto chvíli se projevují fenotypové změny buněk. Doba trvání indukční fáze se všemi etapami je odhadována na 15 až 30 let. (1, 2, 3)

Druhou fází vývoje vzniku nádoru je *blastoma in situ*. Z hlediska patologické morfologie ji lze zařadit do období preneoplastického. Ovšem z hlediska buněčného a tkáňového můžeme pozorovat selekci neobvyklých buněk nesoucí genotypovou, ale stále funkčně neúplnou fenotypovou charakteristiku maligního nádoru. Prozatím se neprojevuje schopnost invazivního růstu a šíření metastáz. Tato fáze trvá 5 až 10 let. (1, 3)

Progresi nádoru lze rozdělit do dvou etap, které však nejsou pravidlem u všech nádorů. První etapou je tzv. invaze, během níž dochází k lokálnímu infiltrativnímu či destruktivnímu růstu. Probíhá po dobu 1 roku až 3 let. Druhou etapu diseminace charakterizuje šíření nádoru zakládáním metastáz, které může trvat 1 rok až 5 let. (1, 3)

1.2.3 Růst zhoubných nádorů

„Rozdíl v dynamice růstu normálních a transformovaných tkání je v tom, že v normální tkáni existuje rovnováha mezi produkcí a zánikem buněk, kdežto v nádorové přesahuje množství vzniklých buněk počet odumírajících a z růstu vyřazených. Celkový počet buněk v nádoru a tím částečně daná jeho velikost, jsou ovlivněny jednak proliferační aktivitou buněk a jednak jejich prodlouženým přežíváním.“ (1, s. 65)

Jeden z rozdílů mezi růstem netransformované tkáně a tkáně nádorové je změna intervalu mezi mitózami označovaná jako generační čas. Generační čas buněk transformované tkáně je spolu s deregulací apoptózy zásadní pro velikost masy nádorové tkáně. I přes to, že normální negativní regulace buněčného cyklu zajištěna produkty genu Rb, p53 a cykliny je u nádorů často porušena a nádorová buňka se tak neregulovaně dostává do dalších cyklů dělení, její generační čas je stejný, často i delší než u zdravých buněk. Avšak pro nárůst tkáně nádoru je klíčové porušení normální aktivace apoptózy. V momentě, kdy nádor dosáhne hmotnosti asi 1 mg, což odpovídá asi $1 \cdot 10^6$ buněk, zásobení buněk difusí látek z okolí již není dostačující. To vede k indukci angiogeneze, tvorbě kapilár zásobujících zvětšující se nádorovou masu. Z důvodu nedostatku nutričních faktorů a vytvořením neproliferujících buněk přesunutých do G0 fáze (dormantní buňky) dojde k prodloužení generačního času prodloužením G1 fáze, a tedy ke zpomalení růstu. (1, 4, 5)

U nádorů takovéto velikosti již dochází k odlišnosti buněčných klonů a jejich metabolických potřeb. Nedostatečným zásobením a rychlým růstem část buněk podléhá nekróze a to formou onkózy (náhodný, nespecifický rozklad mutovaných buněk), či klasické apoptózy (geneticky programovaná smrt buněk). Naopak existuje i mnoho inhibitorů apoptózy vedoucí k výraznému upřednostnění růstu nádorových buněk jejich prodlouženou životností. Mezi takovéto inhibitory patří např. růstové faktory, hormony a onkoproteiny. Může dojít i ke zpětné aktivaci dormantních buněk, k čemuž dochází hlavně při nízkém počtu buněk či po snížení objemu nádorové hmoty. (1, 4)

Nádorová tkáň o velikosti větší než 1g se často skládá ze dvou frakcí – růstové a neproliferující. Růstovou frakci tvoří buňky proliferující, naopak frakci neproliferující tvoří buňky dormantní, apoptotické, nekrotické a nedělící se plně diferencované. (1, 4)

Dalším často používaným měřítkem týkajícím se dynamiky růstu a změn nádoru je čas zdvojení jeho velikosti, tzv. dubling time. Rozpětí této veličiny se pohybuje od 1 měsíce až po více než 1 rok. Pomocí zobrazovacích metod se dají snadno zjistit parametry této veličiny, což je velkou výhodou. Na druhou stranu zobrazovací metody neudávají informace o velikosti růstové a neproliferující frakce. Velikost nádoru často také závisí na oběhových změnách v nádoru, které mohou způsobit edémy a krvácení, či změnu objemu nekrotických úseků nádorové tkáně. (1, 4)

1.3 Geny, jejichž poškození vede k nádorové progresi

Vznik nádoru na buněčné úrovni úzce souvisí s kontrolou buněčného dělení, diferenciací a apoptózou. Právě tyto procesy jsou regulovány jak intracelulárními tak extracelulárními mechanismy. U nádorových onemocnění se vyskytují dva typy genetického poškození. Prvním typem jsou dominantní mutace onkogenů, které stimulují efekt těchto genů. Druhým typem jsou recesivní změny antionkogenů (tumor supresorových genů), které při poškození obou alel daného genu vedou ke ztrátě funkce. (1, 4)

1.3.1 Protoonkogeny

Protoonkogeny jsou geny pro proteiny, které jsou nezbytné pro životaschopnost každé eukaryotické buňky. Jsou to geny, které se podílejí na kontrolování průchodu buňky buněčným cyklem, na inhibici apoptózy a některé z těchto genů mají také funkci v buněčném metabolismu. Zvýšená aktivace těchto genů nebo jejich změna, která vede k produkci pozměněných proteinů, má za následek nadměrné buněčné dělení, následný vznik nádoru, inhibici apoptózy a jeho zvýšené krevní zásobení. Takto mutované protoonkogeny nazýváme onkogeny.

Dosud byly popsány čtyři typy aktivace protoonkogenů. Prvním typem je *bodová mutace* ve specifických kodonech v protein kódujících částech (např. mutace genu K -ras, který nalezneme u mnoha typů nádorů). Dalším typem aktivace protoonkogenů je *genová amplifikace* způsobující zvýšení produkce DNA sloužící jako předloha pro tvorbu RNA, což vede ke špatné expresi kódovaných proteinů. Třetím typem je *chromosomální translokace*, které způsobí abnormální regulaci transkripce poškozených genů či vznik genů s abnormální funkcí. Posledním typem je *inzerce retrovirů* do genomu buňky ovlivňující kontrolu genů prostřednictvím promotorů retrovirů. Ty jsou zodpovědné za chybnou expresi protoonkogenů či tvorbu proteinu se změněnou funkcí. Pro aktivaci protoonkogenu na onkogen, stačí mutace v jedné ze dvou alel.

Mezi protoonkogeny řadíme geny pro růstové faktory, geny pro receptory růstových faktorů, geny pro přenašeče signálů, jaderné transkripční faktory, geny pro cykliny a cyklin – dependentní kinázy atd. (6, 7, 8)

Nejčastěji vyšetřovaným onkogenem je analýza mutací genu KRAS, jehož produktem je protein K - ras s GTPázovou aktivitou účastnící se přenosu signálu od aktivovaného transmembránového receptoru EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

do jádra. V případě, že je tento gen mutovaný, dochází ke stimulaci signální dráhy nezávisle na stavu EGFR. K inhibici signální dráhy byly vyvinuty monoklonální protilátky proti receptoru EGFR, které způsobí jeho zablokování, inhibici signální kaskády a růstu nádoru. V případě, že se monoklonální látka naváže na receptor k inhibici signální kaskády, dojde pouze v případě, pokud signální dráha neobsahuje produkt mutovaného genu KRAS. V případě mutovaného genu KRAS nemá smysl receptor EGFR inhibovat, protože dráha je v důsledku přítomnosti onkoproteinu K – ras stále aktivní. Vyšetření genu KRAS slouží tedy pro predikci léčebné odpovědi. (9)

1.3.2 Tumor supresorové geny

Tumor supresorové geny, neboli antionkogeny, na rozdíl od onkogenů kódují proteiny, které se podílejí na kontrole buněčného cyklu a procesu diferenciaci ve smyslu jejich inhibice. Ztráta těchto funkcí potlačením, inaktivací dysfunkcí či ztrátou těchto genů má za následek buněčnou transformaci. Aby se tento zvrát projevil, musí dojít k poruše na obou alelách. Pomocí různých experimentálních pokusů byla indentifikována řada tumor supresorových genů. Jedním z nich je například retinoblastomový gen (Rb), jehož inaktivace je klíčová ve vývoji mnoha lidských nádorů. Tento protein se nachází v jádře buňky a účastní se kontroly transkripce jiných proteinů a regulace buněčného dělení. Dalším významným antionkogenem je p53 gen nacházející se na chromosomu 17p13.1. U většiny lidských nádorů je mutovaný právě tento gen kódující jaderný protein působící jako negativní regulátor přechodu buňky z G1 fáze buněčného cyklu do fáze S. (1, 4, 7, 8)

2 METODY ANALÝZY PATOGENEZE NÁDORŮ

2.1 Hodnocení změn na úrovni tkáně - histologie

Z histologického hlediska se nádor skládá ze dvou typů buněk - z vlastního nádorově transformovaného parenchymu a netransformované, ale závisle proliferující podpůrné vazivové tkáně orgánu. Tkáň určená k analýze je posílána do laboratoře buď v nativním stavu, či vložená do fixačního roztoku. Je-li tkáň již fixovaná, možnosti využití metod pro analýzu se značně zúží. Proto je lepší tkáň nechat v nativním stavu, aby patolog přítomný v laboratoři měl možnost daný materiál lépe makroskopicky zhodnotit, zvážit, zjistit přesné rozměry případně odebrat lymfatické uzliny, které se tak dají snáze vyhledat. (1, 3)

2.1.1 Základní histologické vyšetření

Základním histologickým vyšetřením je metoda založená na zalití tkáně do parafinových bločků, z nichž se nakrájením na mikrotomu zhotoví histologické řezy, které jsou standardně barveny v roztoku Hematoxylin - Eosin. Je-li potřeba, doplní se tato barvicí metoda dalšími metodami znázorňující vaziva, pigmenty, buněčnou cytoplazmu či nervová vlákna. Z takto zhotovených preparátů patolog určí, zda jde o nádorovou tkáň, pseudotumor, či jinak změněnou tkáň. U většiny případů dokáže patolog rozlišit nádor maligní od benigního. (3)

2.1.2 Peroperační histologické vyšetření

K další metodě se využívá nativní nefixovaná tkáň, která je zmrazena proudem kysličníku uhličitého či ponořením do kapalného dusíku. Takto fixovaná tkáň je dále krájena v kryostatu, řezy jsou uchyceny na eosinová sklička, která se vloží do fixační tekutiny a obarví či dále zpracují. Tato metoda je používána hlavně u peroperační biopsie, ale i pro provedení některých imunohistochemických metod. (3)

2.1.3 Imunohistochemie

Princip imunohistochemických metod je poměrně jednoduchý. Základem je histologický řez, na který je nanášena specifická protilátka, která se naváže na daný antigen v případě jeho přítomnosti. Díky konjugaci protilátky s fluorochromem, můžeme pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorovat místo, kde je protilátka navázána, tudíž přesnou lokalizaci hledaného antigenu. Kromě fluorochromu se k detekci specifických protilátek v praxi častěji používají enzymy (např. křenová peroxidáza). V současnosti je dostupné

velké množství jak monoklonálních, tak polyklonálních protilátek specificky se vázajících na příslušné antigeny také využitelných u různých typů nádorů a to zejména na jejich diagnostiku. Použitím panelů protilátek a vyhodnocením pozitivních reakcí získáme imunofenotyp tumoru, který je pro většinu nádorů charakteristický. Tak lze s jistotou určit, z jaké tkáně nádorové buňky pocházejí a také o jaký typ nádoru jde. (3)

2.1.4 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie se používá k detekci definovaných cytoplazmatických komponent, díky kterým můžeme nádor správně diagnostikovat. Pro zobrazení v elektronovém mikroskopu je potřeba tkáň fixovat v glutaraldehydu, poté ji zalít do pryskyřice, nakrájet na ultramikrotomech pomocí skleněných či diamantových nožů, kontrastovat a zachytit na kovové síťky. (3)

2.2 Změny na úrovni nukleových kyselin

Genom eukaryotických buněk tvoří jaderná DNA a DNA nacházející se v mitochondriích. Genetická informace je realizována prostřednictvím ribonukleotidových kyselin – RNA (např. mRNA, miRNA). Metod analýz DNA je mnoho, ale cíl mají společný – detekovat konkrétní sekvenci dané DNA. U nádorových onemocnění se jedná jednak o detekci mutací hereditárního původu (onemocnění dědí se z generace na generaci), kdy zjišťujeme, zda je konkrétní mutovaná sekvence v genomu pacienta přítomna. Dále jsou pomocí DNA diagnostiky vyhledávány de novo mutace nově vzniklé v nádorových buňkách (např. mutace onkogenu K-ras pro predikci léčebné odpovědi). Analýzou hladin mRNA případně miRNA můžeme hodnotit aktivitu konkrétních genů.

2.2.1 Polymerázová řetězová reakce

Nejpoužívanější metodou molekulární diagnostiky je Polymerázová řetězová reakce (PCR). Umožňuje amplifikaci cílové sekvence DNA pomocí páru primerů. Právě sekvence primerů určuje specifitu reakce, tedy úsek molekuly DNA, který bude amplifikován. Syntéza analyzované DNA probíhá v opakujících se cyklech, při nichž se pravidelně střídají tři kroky. Prvním krokem je denaturace dvouřetězcové molekuly DNA probíhající při 94 - 98°C . Dojde k rozpadu vodíkových můstků mezi bázemi spojující dvě vlákna DNA. Při druhém kroku se sníží teplota na 30 - 65°C . Dojde k připojení primerů k odděleným řetězcům. V posledním kroku se teplota opět zvýší na 65 - 75°C a dojde k polymeraci. Nová vlákna DNA jsou syntetizována pomocí termostabilní DNA polymerázy. Celá reakce je prováděna ve speciálních termocyklerech, které jsou schopny

teploty automaticky měnit podle předem nastaveného programu. Výsledkem takto opakovaných cyklů je exponenciální zmnožení cílové sekvence DNA. (3, 4, 10)

2.2.1.1 Analýza pomocí alelově specifických primerů

U některých genetických onemocnění je známa molekulární podstata konkrétní mutace, což umožňuje přímou detekci sledované mutace ve vyšetřovaném vzorku. Primery jsou dvojího druhu – jedny jsou syntetizovány tak, aby přesně odpovídaly sekvenci normální DNA, tudíž hybridizují jen k nepozměněné komplementární sekvenci, druhé jsou komplementární jen s mutovanými sekvencemi. Právě díky krátkým alelově specifickým sondám můžeme na jisto detekovat změny v jednom nukleotidu, což například metoda Southern blotting neumožní. Tato analýza se užívá především v případech s vysokou pravděpodobností výskytu dané mutace u jedince, založené na faktu, že se tato mutace v rodině již vyskytuje. (4, 11)

2.2.2 Southern blotting

Potřebným materiálem je opět izolovaná DNA z buněk vyšetřovaného probanda. Principem této metody je štěpení genomové DNA restrikcími endonukleázami na mnoho různých fragmentů, které jsou gelovou elektroforézou rozděleny podle velikosti, malé fragmenty se v elektrickém poli pohybují rychleji než ty velké. Takto rozdělené fragmenty jsou přeneseny z gelu na nitrocelulóзовou či nylonovou membránu tzv. blottingem (kapilárním přenosem). Daný vyšetřovaný fragment DNA identifikujeme hybridizací se specificky značenou sondou, jejíž sekvence odpovídá hledanému úseku DNA. Membrána s fragmenty se sondou společně inkubují v roztoku za podmínek způsobujících jejich hybridizaci. Následuje promytí a odstranění nenavázaných sond. Membrány exponují autoradiografický film, který po vyvolání identifikuje pozici fragmentů, které se sondou hybridizovaly. (3, 4, 12)

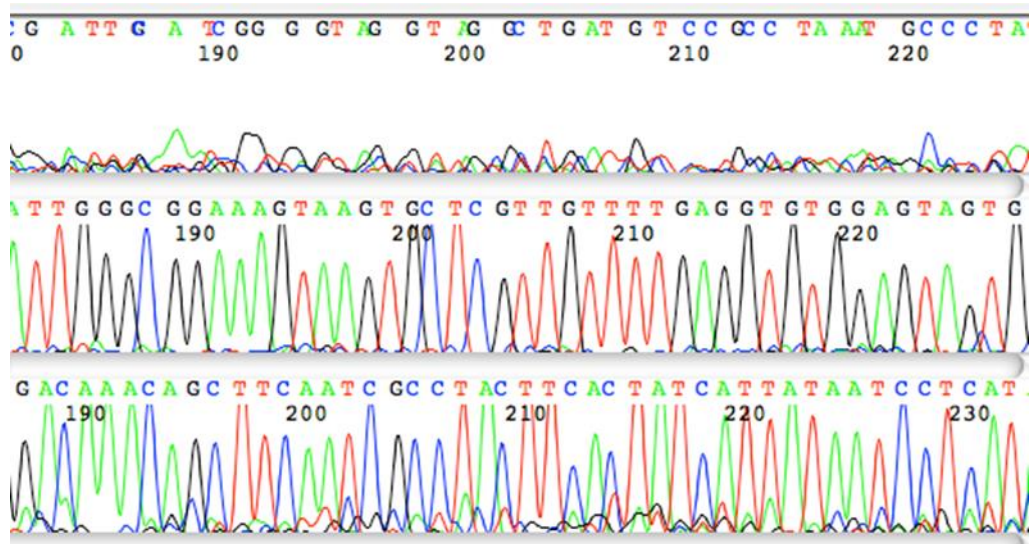
2.2.3 Sekvenace

Metodu sekvenace používáme k vyhledávání či screeningu mutací. Sekvenování je proces, během kterého zjistíme kompletní sekvenci nukleotidů ať už klonovaného fragmentu nebo cílové sekvence zmnožené pomocí PCR. Pro určení nukleotidové sekvence v úseku DNA byly prvně použité metody - Sangerova a Maxam & Gilbertova. (4, 11, 12)

Nejčastěji používanou metodou sekvenování je stále metoda *Sangerova* využívající značených chemických analogů nukleotidů, které svými vlastnostmi inhibují enzymovou

aktivitu DNA polymerázy při syntéze řetězce DNA (postrádají hydroxylovou skupinu na třetím uhlíku, což způsobí nemožnost připojení další báze). V momentě, kdy DNA polymeráza začlení do nově syntetizovaného řetězce chemický analog nukleotidů, tzv. dideoxyribonukleotidtrifosfát, proces syntézy se ukončí. Získáme tak čtyři směsi s velkým množstvím různě dlouhých oligonukleotidů, které budou končit vždy příslušnou značenou bází. Tento soubor produktů analyzujeme pomocí gelové elektroforézy fungující na principu rozdělení fragmentů DNA podle jejich délky. Jednotlivé báze zobrazené na gelu čteme postupně od 5' konce ke konci 3'. Dnes je toto sekvenování prováděno na automatických přístrojích používajících různě barevné flouorescenční označení pro jednotlivé dideoxyribonukleotidtrifosfáty a tak celý proces může probíhat v jedné reakci. Produkty jsou separovány kapilární elektroforézou, barevně značené báze jsou snímány a na základě jejich pořadí (elektroforegramu, viz obr. 1) je vytvořena sekvence DNA.

Obrázek 1 Elektroforegram - výsledek Sangerovy metody sekvenování z automatického přístroje



Zdroj: (13)

U *Maxam – Gilbertovy* metody se opět vychází z namnožených různě dlouhých fragmentů molekuly DNA radioaktivně značených na jednom konci a separovaných podle délky gelovou elektroforézou. Rozdíl oproti Sangerově metodě spočívá v tom, že je tato metoda založena na štěpení molekul analyzovaného fragmentu DNA, kdežto u předchozí metody dochází k syntéze konkrétních fragmentů z vlákna vyšetřované DNA. (4, 11, 12)

2.3 Analýza genové exprese v nádorové tkáni

Materiálem pro tato vyšetření je RNA. Určuje se jimi, zda jsou buňky nádoru agresivní a je potřeba podstoupit léčbu chemoterapií, nebo ne.

2.3.1 Měření hladin mRNA pomocí RT – PCR

Molekuly RNA jsou přepsány reverzní transkriptázou do komplementární cDNA (complementary DNA), která je zmnožena standartním postupem PCR. Modifikací RT - PCR je tzv. RT real – time PCR, sledování PCR v reálném čase umožňující přímou kvantifikaci zmnoženého produktu během reakce. Tato metoda je využívána pro stanovení aktivity konkrétních genů. (3, 4)

2.3.2 DNA čipy a expresní čipy

Výhodou čipové analýzy je, že umožňuje analýzu až tisíců genů najednou. Používá se buď k identifikaci sekvencí genů či genomových mutací, nebo k určení hladiny exprese genů. DNA čip má podobu malé destičky, na které jsou v určitém pořadí pevně přichyceny fragmenty analyzovaných genů. Jako sondy jsou použité buď úseky genomové DNA (DNA čipy) nebo mRNA v případě expresních čipů. mRNA izolovaná z vyšetřovaných buněk pomocí metody RT (reverzní transkripce) převedené na cDNA je označená fluorescenčním barvivem. cDNA izolovaná z normálních buněk má odlišnou barvu než cDNA izolovaná z buněk nádorových. Takto označené a v přesném poměru smíchané sondy jsou aplikovány na destičku (čip), kde dochází k hybridizaci sondy s její komplementární sekvencí. Na závěr se měří intenzita fluorescenčních signálů. Je-li v buňce slabá exprese daného genu, projeví se slabou fluorescencí jedné barvy. Naopak silná fluorescence značí silnou expresi. Je možné stanovit v určitém uspořádání poměr fluorescence obou barev, tudíž poměr exprese genů v obou typech buněk. Tyto buňky pak vytvoří skupiny, podle kterých lze určit nádorový fenotyp. (3, 11)

Podobná technologie je využívána například u testů Mamaprint týkající se rakoviny prsu. Umožní lékařům určit nejvhodnější druh léčby po chirurgickém odebrání nádoru. Tento test se provádí na nádorové tkáni buďto fixované ve formalinu, nebo na tkáni nativní, která je vložena do mRNA konzervačního prostředku ihned po operačním zákroku. Dále je vzorek zpracován mikročipovou technologií. (14, 15)

2.4 Stanovení množství proteinů

Pro časný záchyt prognózu a predikci nádorových onemocnění se často využívají nádorové markery, často proteinové molekuly, které jsou produkovány nádorovými buňkami. V základním výzkumu se nádorové markery při jednotlivých experimentech často měří metodou Western blotting. V klinické praxi se pak klinicky významné nádorové markery měří metodou, která umožňuje vyšetření různých markerů u velkého množství pacientů a to v relativně krátkém čase. To umožňuje metoda ELISA.

2.4.1 Western blotting

Metoda detekuje specifické proteiny pomocí protilátek. Nejprve je analyzovaný vzorek podroben elektroforéze na polyakrylamidovém gelu, kdy dojde k rozdělení proteinů podle jejich velikosti. Takto rozdělené proteiny se přenesou na membránu, která je i s proteiny inkubována s protilátkami, které rozpoznají daný protein. Interakce mezi antigenem a protilátkou je detekována pomocí druhé histochemicky, fluorescenčně či radioaktivně značené protilátky. (4)

2.4.2 ELISA

ELISA (Enzyme – Linked Immuno Sorbent Assay) je metoda umožňující stanovení množství daného proteinu, nádorového markeru, obecně antigenu. Tato metoda má mnoho variant, princip je však stejný. Na dně mikrotitrační destičky je navázána protilátka, k níž se přidá vyšetřovaný vzorek. Dojde tak k reakci antigenu s protilátkou. Nenavázané antigeny se odstraní promytím a ke vzorku se přidá druhá protilátka, k níž je kovalentně navázán enzym (např. alkalická fosfatáza či peroxidáza). Následuje inkubace a promytí nenavázané protilátky. Díky enzymu navázanému na protilátku dojde k chemické přeměně přidaného substrátu na produkt, který je barevný a může se tak spektrofotometricky či fluorescenčně detekovat. (3)

2.5 TNM klasifikace

„TNM systém slouží k jednoduchému popisu rozsahu nádoru a určení stádia onemocnění. Stádium onemocnění je pak jedním z kritérií, podle kterých se lékař rozhoduje při volbě léčby. TNM systém není univerzální, ale pro každou nádorovou lokalizaci je vypracován vlastní systém.“ (16, s. 1)

V případě určování TNM na základě klinického vyšetření, před každým symbolem je uvedeno „c“ (cT, cN, cM). Klasifikaci může provádět i patolog na základě vyšetření

nádoru a jeho okolí, pak je před zkratky vloženo písmeno „p“ (pT, pN, pM). Často je použito podrobnější dělení (T1a, T1b atd.). (16)

Kategorie *T* popisuje rozsah nádoru, jeho velikost či vztah k okolním tkáním (např. u karcinomu prsu je T1 označení nádoru o velikosti 2cm, T2 je označení nádoru většího než 2 cm atd.). (16)

Kategorie *N* popisuje rozsah postižení okolních lymfatických uzlin (např. u karcinomu prsu se uzliny bez poškození označují N0, N1 je označení pro uzliny volně pohyblivé v podpaží postižené nádorem atd.). (16)

Kategorie *M* popisuje přítomnost, nebo nepřítomnost okolních metastáz (M1 značí přítomnost, M0 nepřítomnost metastáz). (16)

PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo zjistit možnosti a limity izolace NK (DNA, RNA) z rutinně připravovaných histologických bločků, tzn. formalinem fixované v parafínu zalité tkáně (FFPE) pro použití takto izolované DNA a RNA pro následné molekulárně biologické analýzy. U izolované DNA a RNA jsem měřila jednak její množství a dále její čistotu (znečištění proteiny a látkami přítomnými v izolační soupravě) a tyto hodnoty jsem dávala do vztahu s typem izolované tkáně. NK jsem izolovala z FFPE tkáně štítné žlázy, nádorů jater a glioblastomů pomocí tzv. kolonkové metody soupravy AllPrep®DNA/RNA Kit firmy QIAGEN.

3.1 Metodika

K analýze byly dodány histologické bločky tří studií (štítné žlázy, nádorů jater, glioblastomů). Ke každému histologickému bločku bylo přiloženo eozinové sklíčko, na němž byla patologem vyznačena tkáň nádorová a nenádorová. Celkem bylo izolováno 105 analyzovaných vzorků, jejichž parametry (izolované množství, čistota), jsou uvedeny v tabulkách (viz tabulky č. 1, 2, 3). Poté byly tyto údaje vyhodnoceny. Uvedené hodnoty jsou prezentovány formou grafů vyjadřující závislost izolovaného množství NK v ng/μl na množství zdrojové tkáně v mm² při konstantní tloušťce 15μm (viz grafy č. 1 – 16) a formou grafů porovnávající průměr a směrodatnou odchylku získané z naměřených hodnot jednotlivých tkání a vyhodnocené pomocí statistické metody t - test (viz grafy č. 17 – 22).

3.2 Výzkumné otázky

Před zpracováním studie bločků FFPE byly stanoveny tyto výzkumné otázky:

1. Je výtěžnost izolovaných DNA a RNA z FFPE tkáně postačující pro následné genetické analýzy?
2. Je čistota izolovaných NK z FFPE tkáně dostačující pro následné genetické analýzy?
3. Je množství izolovaných NK zcela závislé na ploše (množství) řezů FFPE tkáně, ze které byla izolace provedena?

4. Existuje rozdíl mezi výtěžkem izolované DNA a RNA z oblastí nádorové a nenádorové tkáně?

4 IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN PRO ANALÝZY GENOVÉ EXPRESE

Jedna z prvních rutinně používaných metod izolace DNA je tzv. Müllerova vysolovací metoda. Tato metoda byla později doplněna o další odstranění proteinů a membránových struktur pomocí chloroformu. Nejrozšířenější metodou izolace RNA byla izolace pomocí izotchiokianátu. V této podobě byl tento postup izolace DNA a RNA nejrozšířenější až do zavedení tzv. kolonkových metod založených na adsorpci NK na silikátový povrch. Kolonkové metody postupem času téměř vytlačily jiné postupy a staly se metodou volby ve většině laboratoří využívající molekulárně genetické metody. Kromě tzv. kolonkové metody jsou používány i další postupy např. izolace NK na skleněné kuličky. Většina metod izolace NK je započata lyzí buněk, která vede k uvolnění cytoplazmy a jádra. Obvykle stačí porušení biomembrán a denaturace proteinů některým z detergentů (TRITON, SDS – dodecylsírán sodný), ovšem pro lyzi pevných tkání je zapotřebí mechanická síla, jakou je například homogenizace kuličkami, drcení zmražené tkáně v třecí misce apod. Čistotu izolované NK zvýšíme přidáním enzymu proteinázy K, která způsobí štěpení proteinů, včetně histonů. V další části izolace získáme čistou NK buď precipitací (např. ethanolem), nebo adhezí na některý ze silikátových povrchů. Na závěr NK rozpustíme v deionizované vodě (dd H₂O). Při rozpuštění DNA se často do dd H₂O přidává kyselina etylendiaminotetraoctová (EDTA), která na sebe váže ionty vápníku známé jako kofaktory nukleáz, což způsobí jejich deaktivaci, čímž zabráníme rozštěpání izolované DNA. (17, 18)

4.1 Metody izolace

4.1.1 Fenol - chloroformová extrakce nukleových kyselin

Tento postup odstraňuje molekuly, především proteiny, lyzátu z pufru a NK v něm ponechává. Principem této metody je rozdělení směsi na dvě fáze, což je důsledek přidání fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu k lyzátu. Na rozdíl od izolace DNA pro izolaci RNA musíme použít kyselý fenol. Chloroform se nemísí s vodným roztokem lyzátu, což způsobí rozdělení směsi na vodnou (horní) fázi a chloroformovou (spodní) fázi. Protřepáním způsobíme promíchání fází, během něhož fenol vysráží proteiny obsažené v lyzátu. Rozpustnost fenolu ve chloroformu zvyšuje izoamylalkohol, takže po protřepání fenol přejde do spodní fáze obsahující chloroform. Aby se obě fáze dokonale oddělily, necháme směs zcentrifugovat. Sražené proteiny v podobě bílého prstence nám

fáze viditelně oddělí. Horní, vodnou fázi, obsahující NK přeneseme do čistých zkumavek. Pro dokonalé odstranění proteinů je nutné celý postup opakovat opětovným přidáním směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu, protřepáváním a zcentrifugováním, dokud se na rozhraní nepřestane objevovat bílá sraženina proteinů. Nakonec roztok ještě jednou extrahujeme, tentokrát už jen směsí chloroformu a izoamylalkoholu, která odstraní zbytky fenolu v roztoku, který by mohl narušovat samotné zpracování NK. Z takto získaného vodného roztoku vysrážíme NK přidáním koncentrovaného ethanolu. Po odstředění vznikne na dně zkumavky bílý sediment (peleta), obsahující jak NK, tak soli, které odmyjeme 70% ethanolem. Po odstranění supernatantu NK rozpustíme ve vodě či vodném pufru. Pokud svou práci zaměříme na DNA, RNA musíme z roztoku odstranit působením RNázy. Poté roztok musíme opět extrahovat směsí fenolu a chloroformu a DNA vysrážet ethanolem. Jak už jsem zmínila výše, pro izolaci RNA musíme použít kyselý fenol. Výtěžek RNA může být zvýšen v případě, že se extrakce fenolem provádí za vyšší teploty. (17)

4.1.2 Adsorpce na silikátový povrch

Principem další metody izolace NK je jejich adheze na silikátový povrch v přítomnosti chaotropních směsí. K lyzátu přidáme chaotropní sůl a suspenze silikátových částic. Při izolaci DNA je použita RNáza pro odstranění RNA. Naopak při izolaci RNA je použita DNáza pro odstranění kontaminující DNA. Protřepáním způsobíme snazší a rychlejší adhezi NK na silikátové částice. Směs necháme zcentrifugovat, což způsobí usazení silikátových částic na dno zkumavky, supernatant odstraníme. Částice na dně zkumavky opět propláchneme chaotropními solemi, odstředíme a odstraníme supernatant. Tím získáme čisté NK stále ještě adherovanou na silikátových částicích. Uvolnění NK docílíme přidáním vody či vodného pufru neobsahující chaotropní soli. Po zcentrifugování získáme čistý roztok NK a na dně zkumavky usazené silikátové částice. (17)

4.1.3 Izolace nukleových kyselin z formalinem fixovaného, v parafínu zalité tkáně

Formalinem fixované, v parafínu zalité tkáně (FFPE) z archivů patologických oddělení mohou být zdrojem analýzy DNA nebo studia exprese genů (nutná izolace RNA). Biopticky či chirurgicky odebraná tkáň fixována formalínem a zalitá do parafínu není zcela degradována a tak je možné ji dále zpracovávat za účelem studia přetrvávání NK virového genomu ve tkáni či buněčné exprese. K této metodě je vyráběno mnoho izolačních souprav, ovšem princip metody je vždy stejný. Čerstvě nakrájenou FFPE tkáň

na 10 µm řezy deparafinizujeme pomocí např. xylenu a poté inkubujeme v lyzáto­vém pufru obsahující detergenty a proteinasu K. Za těchto podmínek se uvolní do roztoku cytoplazma využitá pro izolaci RNA, zatímco další nerozštěpený materiál se využije pro izolaci DNA. Po centrifugaci získáme roztok pro izolaci RNA. Ze získané pelety izolujeme. Takto získané NK se dále zpracovávají odděleně. Kvůli fixaci a zalití tkáň jsou NK ve vzorcích zpravidla degradované a modifikované, proto takto izolované NK mají často nižší molekulovou hmotnost než vzorky čerstvé či zmražené. Stupeň fragmentace závisí na typu a stáří vzorku, na podmínkách fixace, zalití a skladování vzorku. Další postup izolace NK z FFPE vzorku může být některou z výše uvedených metod. (18, 19)

4.2 Hodnocení čistoty nukleových kyselin

4.2.1 RNA

Čistota RNA se stanovuje spektrofotometricky při vlnových délkách 280nm, 260nm a 230nm, při kterých jsou obvykle absorbovány i kontaminující látky. „*Poměr hodnot absorbancí změřených při těchto vlnových délkách nám pak poskytne požadované informace o kontaminaci vzorku.*“ (11, s. 125) Čistá RNA v poměru A_{260}/A_{280} by měla dosahovat hodnoty 2. Je - li tato hodnota menší než 1,8 je daný vzorek kontaminován proteiny. V případě poměru A_{260}/A_{230} by se měla hodnota čisté RNA pohybovat v rozmezí 2,0 – 2,4. Pokud jsou hodnoty vyšší, či nižší než požadované rozmezí, je vzorek kontaminován organickými látkami. (11)

4.2.2 DNA

Izolovanou DNA se nikdy nepodaří získat 100% čistá. Vždy obsahuje zbytky bílkovin a reagensů použitých při její izolaci. Při poměru A_{260}/A_{280} by měla čistá DNA dosahovat hodnoty 1,8. Poměr A_{260}/A_{230} by měl být v případě čisté DNA vyšší než 2. (11)

4.3 Doporučená opatření pro přípravu vzorků a následnou izolaci nukleových kyselin

Postupy a opatření týkající se izolace NK jsou velmi striktní a je nutné je dodržovat, a proto jsou uvedeny ve většině manuálů pro danou izolační soupravu.

Opatření pro manipulaci s DNA:

- Manipulace s čerstvým a uloženým materiálem před zpracováním DNA

Pro izolaci genomové DNA z buněk a tkání použijeme buď čerstvé vzorky, nebo vzorky, které byly rychle zmrazené alespoň na -20°C ideálně v tekutém dusíku a uložené v -20°C dlouhodobě ideálně v -70°C . Tato procedura minimalizuje degradaci DNA omezením aktivity endogenních nukleáz.

Pro dosažení nejlepších výsledků použijeme čerstvou krev nebo krev uloženou po dobu kratší než 2 dny v pokojové teplotě.

Z krve uložené po dobu jednoho týdne ve $2 - 8^{\circ}\text{C}$ či po dobu kratší než jeden měsíc při teplotě $-15 - -25^{\circ}\text{C}$ budou výsledky výnosu genomové DNA sníženy o 10 – 15%. Vzorky krve se neodebírají do zkumavek obsahující heparin, nýbrž antikoagulant EDTA. Heparin může zapříčinit útlum či inhibici amplifikace v průběhu PCR.

- Pipetování DNA

Pipetování by mělo být opatrné a šetrné. Pipetování špičkami o malých objemech může způsobit fragmentaci genomové DNA. Vždy pracujeme se špičkami s filtrem zabraňující kontaminaci automatických pipet.

Správné pipetovací špičky nepředstavují žádné riziko poškození plazmidové DNA a dalších menších molekul DNA.

- Skladování DNA

Genomová DNA je možno krátkodobě uchovávat při teplotě $2 - 8^{\circ}\text{C}$, dlouhodobě při -20°C . Opakované rozmrazování způsobuje poškození DNA. Plazmidová DNA a ostatní malé molekuly DNA mohou být skladovány

- o při teplotě $2 - 8^{\circ}\text{C}$ pro krátkodobé uložení

- o v alikvotech při teplotě $-15 - -25^{\circ}\text{C}$ pro dlouhodobé uložení.

(11, 20, 21)

Manipulace s DNA:

Vzorek DNA připravený k dalším analýzám by měl být vždy na ledu.

- Sušení DNA

Vyhněme se přesušení DNA po precipitaci ethanolem. Nechme DNA vysušit volně na vzduchu.

Plazmidová DNA a ostatní malé molekuly DNA mohou být sušené na vzduchu či vakuově.

- Rozpouštění DNA

DNA rozpustíme v pufru EDTA - Tris označovaném TE nebo v dd H₂O. Po přidání pufru můžeme rozpuštění DNA pomoci opatrným převrácením zkumavky či opatrným klepnutím ze strany do zkumavky, případně necháme DNA stát v pufru přes noc při teplotě 2 - 8 °C.

Genomovou DNA pokud možno intenzivně nevortexujeme. Pro rozpuštění a deaktivaci DNázy můžeme ohřát vzorek DNA na 65°C a necháme působit 10 minut.

(11, 20, 21)

Opatření pro manipulaci s RNA:

- Obecné informace

Z důvodu chemické nestálosti RNA a všudypřítomné RNázy je práce s RNA náročnější než práce s DNA. Na rozdíl od DNáz, RNázy nepotřebují ionty kovu jako kofaktory a mohou být aktivní i po delším povaření či autoklávování. Právě proto by měla být přijata zvláštní opatření pro práci s RNA.

- Kontakt s materiálem

Při práci s RNA mějme rukavice bez talku. Po navlečení rukavic se vyhněme kontaktu s povrchy a zařízeními, tím zabráníme kontaminaci RNáz do dekontaminovaného materiálu.

- Pracovní plocha

Vyhraňme a označme si speciální plochu pouze pro práci s RNA. Pracovní plochy čistíme 100% alkoholem nebo lépe speciálními přípravky pro odstranění RNáz.

- Zařízení a jednorázové položky

Používejme sterilní, jednorázové, plastové nádoby. Elektroforetické tanky pro analýzu RNA mohou být čištěny 1 % dodecylsíránem sodným (SDS), opláchnuté vodou, absolutním ethanolem a namočené ve 3 % peroxidu vodíku na 10 minut. Oplachové nádrže musí obsahovat diethylpyrokarbonát (DEPC).

- Sklo a plastové nádoby

Skleněné nádoby musí být ošetřené vysokou teplotou (180 - 200°C) působící nejméně 4 hodiny. Autoklávování skla pro eliminaci RNázy není dostatečné. Používejme komerčně dostupné plastové nádoby. Je-li plastové nádoby opětovně používáno, před dalším použitím ho namočíme na 2 hodiny při 37°C do 0,1 M roztoku hydroxidu sodného (NaOH)/1 mM EDTA, opláchneme vodou obsahující

DEPC a zahřejeme na 100°C po dobu 15 minut. Zkumavky by měly být ošetřeny přes noc při pokojové teplotě vodou obsahující DEPC, dále pak autoklávovány po dobu 30 minut pro zničení DEPC.

- Čištění elektrod pro měření pH

Elektrody inkubujeme 30 minut v 70% ethanolu, 5 minut v 1 M NaOH a opláchneme vodou obsahující DEPC.

- Činidla

Vyhradíme si nástroje a reagentie pouze pro práci s RNA: rukavice, špachtle, nedotčené vážící lžičky či vážící papír. Všechny reagentie musí obsahovat DEPC.

- Manipulace s čerstvým, či uloženým materiálem před extrakcí RNA

Extrakci RNA je nutné provést co nejrychleji po získání vzorků. Pro lepší výsledky použijeme čerstvé či rychle zmražené vzorky v roztoku nitrogenu uchované při -70°C. Tato procedura minimalizuje degradaci surové RNA omezením aktivity endogenní RNázy.

Vzorky krve a kostní dřeně musí být stabilizovány komerčně vyráběnými činidly. Všechny požadované reagentie by měly být uchovány na ledu.

- Inhibitory RNáz

Inhibitory RNáz mohou být použity pro ochranu RNA v průběhu izolace, čištění a všech dalších procedur.

Nejčastěji používaný inhibitor je eukaryotický protein inhibující RNázy nekovalentní a reverzibilní vazbou. Pro udržení aktivity inhibitoru je dobré vyhnout se silným denaturačním činidlům jako je SDS či močovina, udržovat redukční podmínky a teplotu okolo 65°C.

- Uložení RNA

RNA můžeme uchovat rozdělenou na alikvoty v ethanolu či isopropanolu při teplotě -70°C. Při této teplotě je většina RNA velmi stabilní. Ethanol či isopropanol odstraníme centrifugací a resuspendací v příslušném pufru RNázy.

- Manipulace s RNA

Během příprav experimentu máme vzorky RNA vždy uložené na ledu.

- Sušení RNA

Vyhněme se přesušení RNA po precipitaci ethanolem. Vzorky RNA sušíme ve vakuu nebo 10 minut při pokojové teplotě na ploše vyhrazené pro práci s RNA.

- **Rozpouštění RNA**
RNA rozpustíme přidáním pufru či vody neobsahující RNázu, inkubací ve zkumavce na ledu po dobu 15 minut. Zkumavku můžeme během inkubace jemně protřepat či opatrně zvortexovat.
- **Pipetování RNA**
Pro pipetování RNA použijeme špičky bez RNáz, vždy s filtrem. Pipety udržujeme čisté.
- **Teplotní citlivost**
Při zvýšených teplotách RNA není stabilní, proto se vyhneme teplotám vyšším nad 65°C. Ohřátím RNA na teplotu 65°C po dobu 15 minut za přítomnosti denaturačních pufrů způsobíme rozpuštění sekundárních struktur.
- **Ideální je pokud je možné další molekulárně biologické metody provádět v tzv. PCR boxu, který umožňuje před prací dekontaminovat prostorů pomocí UV.**
(11, 20, 21)

5 POPIS IZOLACE DNA A RNA PROVEDENÉ ZE STEJNÉHO VZORKU NÁDOROVÉ TKÁNĚ ZALITÉ V PARAFÍNOVÉM BLOČKU (FFPE)

5.1 Příprava řezů tkáně pro izolaci nukleových kyselin

- Připravíme si řádně očištěný mikrotom (viz příloha 1), histologické bločky a k nim odpovídající eozinová sklíčka s řezy barvenými Hematoxylinem-Eosinem, na nichž je vyznačena nádorová a nenádorová část tkáně (viz příloha 2), případně jiné morfologicky změněné buňky.
- Do stojánku si dáme čtyři zkumavky (počet zkumavek závisí na počtu vzorků, které máme zhotovit), které si popíšeme 1T (tumor), 1Z (zdravá tkáň). Dvě zkumavky, 1T a 1Z, použijeme jako vzorky záložní, zbylé dvě budeme dále zpracovávat.
- Histologický bloček zorientujeme tak, aby polohou odpovídal řezu na odpovídajícím eozinovém sklíčku a upevníme ho do mikrotomu, kde ho pomocí šroubů srovnáme do polohy tak, aby tkáň byla skrajována rovnoměrně a aretujeme (viz příloha 3).
- Skrojíme 3 svrchní vrstvy, které jsou vzduchem zoxidované, abychom se dostali k vlastní, nepoškozené tkáni (počet skrojených vrstev závisí na množství zalité tkáně, pokud je tkáň zalité v bločku dostatek, skrojíme vrstev pět).
- Postupně skrajujeme bloček z jehož řezů si skalpelem oddělujeme nádorovou a nenádorovou tkáň, kterou vkládáme do předem popsanych zkumavek. Do každé zkumavky by mělo přijít přibližně 250mm² odpovídající tkáně (což odpovídá pěti řezům).
- Záložní zkumavky s tkání uložíme do krabiček a skladujeme v temnu.

(22)

5.2 Příprava soupravy AllPrep® DNA/RNA Kit QIAGEN pro izolaci nukleových kyselin

- Příprava vybavení a potřebných reagensů: Souprava AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN), 96-100% ethanol (nepoužívat denaturovaný alkohol),

96-100% isopropanol, deparafinační činidlo DIASOLV (xylen, heptan atd.), sterilní špičky s filtrem, pipety, sterilní 2ml eppendorfky, centrifuga (>10.000 rpm), vortex, suchá lázeň (56°C , 80°C a 90°C).

- Po otevření doposud nerozbalené soupravy zkompletujeme některé pufrы přidáním dalších chemikálií.
 - Pufr FRN doplníme 42ml isopropanolu.
 - Pufr RPE doplníme 44ml ethanolu.
 - Pufr AW1 doplníme 25ml ethanolu.
 - Pufr AW2 doplníme 30ml ethanolu.
 - DNasa I je dodávána v lyofilizovaném stavu. Lahvičku opatrně otevřeme a přidáme 550μl RNase-free water. Vzniklý roztok nevortexujeme, nýbrž jen lehce protřepeme v ruce a skladujeme nejdéle 9 měsíců při -20°C nebo 6 týdnů v lednici.
- (19)

5.3 Deparafinizace tkáně pro izolaci nukleových kyselin

- Deparafinizace vzorku
 1. Zapneme suchou lázeň na 56°C (viz příloha 4).
 2. Do zkumavek s tkání přidáme 1ml xylenu případně jeho náhražky, diasolvu.
 3. Zkumavky silně zvortexujeme na 10s a zcentrifugujeme 2min. v centrifuze při 13.000 otáčkách.
 4. Supernatant ze zkumavek opatrně odstraníme pipetou tak, abychom se nedotkli pelety na dně, a přidáme 1ml ethanolu. Tím odstraníme zbytky xylenu (diasolvu).
 5. Vzorky silně zvortexujeme po dobu 10s a centrifugujeme 2min. v centrifuze při 13.000 otáčkách.
 6. Pipetou odstraníme co největší množství supernatantu ze zkumavek, které pak necháme ležet otevřené minimálně 10min. při pokojové teplotě, aby se odpařil zbytek ethanolu.
 7. Dále do zkumavek přidáme 150μl pufru PKD, který navodí příznivé podmínky pro působení Proteinasy K.
 8. Hned poté k vzorkům přidáme 10μl Proteinasy K, která rozštěpí tkáň, čímž dojde k rozvolnění buněk a jejich lyzi.

9. Zkumavky silně zvortexujeme pod dobu 10s a 15min. inkubujeme v suché lázni při 56°C .
10. Během inkubace si připravíme led a popíšeme 2ml eppendorfky.
11. Zkumavky s tkání vyndáme z bloku a přendáme na 3min. na led. Poté je centrifugujeme v centrifuze na 15min. při maximálních otáčkách (13.000 rpm).
12. Supernatant ze zkumavek opatrně přeneseme pipetou do předem popsaných 2ml eppendorfek. Zde se nachází zlyzované buňky, z nichž budeme dále izolovat RNA.
Zkumavky s peletou obsahují zbytky tkáně, kterou dále použijeme k izolaci DNA.

(19, 22)

5.4 Izolace RNA

1. Eppendorfky se supernatantem inkubujeme 15min. v suché lázni při 80°C (viz příloha 4). Odstraníme tak modifikace RNA způsobené formalínem.
2. Ke vzorkům přidáme 320μl pufru RLT. PufR RLT navodí příznivé podmínky pro adhezi RNA na kolonku během centrifugace.
3. Vzorky zvortexujeme a přidáme 1120μl ethanolu. Zkumavky opět zvortexujeme. Připravíme a popíšeme si růžové kolonky (speciální zkumavky obsahující silikátový filtr, přes který roztok během centrifugace prochází a zachytává RNA).
4. Část vzorků ze zkumavek přeneseme pipetou do růžových, předem popsaných kolonek. Kolonky centrifugujeme 1min. v centrifuze při 10.000 otáčkách.
5. Zcentrifugovaný roztok (filtrát) vylejeme, zkumavky otřeme o bunu a do kolonek přidáme další část vzorků.
6. Kolonky centrifugujeme 1min. v centrifuze při 10.000 otáčkách.
7. Filtrát vylejeme, zkumavky otřeme o bunu a do kolonek přeneseme zbytek vzorků.
8. Kolonky centrifugujeme 1min. v centrifuze při 10.000 otáčkách.
9. Filtrát vylejeme, zkumavky otřeme o bunu a do kolonek přidáme 350μl pufru FRN.

10. Kolonky centrifugujeme 1min. v centrifuze při 10.000 otáčkách.
 11. Filtrát opět vylejeme a zkumavky otřeme o bunu.
 12. Do čisté eppendorfky napipetujeme 70μl pufru RDD a 10μl DNázy I./vzorek. Zvortexujeme a krátce centrifugujeme. Tento roztok odstraní případné zbytky DNA na kolonce obsažené v původním supernatantu.
 13. Do kolonek napipetujeme 80μl připraveného roztoku DNázy I. a 15min. inkubujeme při laboratorní teplotě.
 14. Po inkubaci přidáme do kolonek 500μl pufru FRN a centrifugujeme 1min. při 10.000 otáčkách.
 15. Filtrát nalejeme zpět do kolonek a ty vložíme do čistých zkumavek. Ty opět centrifugujeme v centrifuze 1min. při 10.000 otáčkách.
 16. Filtrát vylejeme, zkumavky otřeme o bunu a přidáme do nich 500μl pufru RPE. Pufr RPE je promývací roztok, kterým odstraníme kontaminující látky.
 17. Kolonky centrifugujeme v centrifuze 1min. při 10.000 otáčkách.
 18. Filtrát vylejeme, zkumavky otřeme o bunu a do kolonek opět přidáme 500μl pufru RPE.
 19. Kolonky centrifugujeme v centrifuze 1min. při 10.000 otáčkách.
 20. Kolonky přendáme do čistých zkumavek a otevřené centrifugujeme 5min. při 13.000 otáčkách.
 21. Takto zcentrifugované kolonky přendáme do čistých eppendorfek, přidáme 30μl speciálně ošetřené vody, RNase-free water, a centrifugujeme je v centrifuze 1min. při 12.500 otáčkách.
 22. Růžové kolonky vyhodíme, eppendorfky obsahující filtrát popíšeme a na přístroji Nanodrop (viz příloha 5) změříme koncentrace RNA ve vzorcích při 260nm.
 23. Vzorky RNA skladujeme buď při -20°C nebo při -70°C .
- (19, 22)

5.5 Izolace DNA

1. Zapneme suchou lázeň na 56°C (viz příloha 4).
2. Do zkumavek s peletou přidáme 180μl pufru ATL, čímž peletu tkáň resuspendujeme a vytvoříme tím vhodné prostředí pro lyzi tkáň a zároveň příznivé podmínky pro Proteinasu K. Vzorky zvortexujeme.

3. Do zkumavek přidáme 40 μ Proteinasy K, která rozloží makromolekulární proteinové komplexy, což má za následek uvolnění DNA do roztoku.
4. Vzorky silně zvortexujeme po dobu 10s a inkubujeme v suché lázni 1 hodinu při 56°C.
5. Po hodinové inkubaci vzorky z bloku vyndáme, teplotu suché lázně zvýšíme na 90°C, v níž vzorky inkubujeme další 2 hodiny.
6. Poté vzorky z bloku vyndáme, necháme je chvíli vychladnout a krátce centrifugujeme v centrifuze (15s při 13.000 otáčkách).
7. Do zkumavek přidáme 200 μ l pufru AL. Tento pufr navodí vhodné podmínky pro vazbu DNA na kolonky během centrifugace. Zkumavky zvortexujeme.
8. Ke vzorkům přidáme 200 μ l ethanolu a opět je zvortexujeme.
9. Popíšeme si bílé kolonky (stejně tak jako u kolonek používající se k izolaci DNA, mají i tyto zkumavky kolonky, na nichž se nachází silikátový filtr tentokrát však bílé barvy, na kterém se zachytává DNA) a přeneseme do nich celý obsah eppendorfek.
10. Zkumavky centrifugujeme 1min. při 10.000 otáčkách.
11. Kolonky přendáme do čistých zkumavek a přidáme do nich 700 μ l pufru AW1, kterým omyjeme DNA na filtru a zbavíme ji kontaminujících látek.
12. Vzorky centrifugujeme 1min. při 10.000 otáčkách.
13. Filtrát vylejeme, zkumavky otřeme o bunu a přidáme 700 μ l promývacího pufru AW2. Opět zkumavky centrifugujeme 1min. při 10.000 otáčkách.
14. Filtrát ze zkumavek opět vylejeme, zkumavky otřeme o bunu a přidáme do nich 700 μ l ethanolu, který odstraní v alkoholu rozpustné kontaminující látky a pomůže zafixovat DNA na kolonce.
15. Zkumavky centrifugujeme v centrifuze 1min. při 10.000 otáčkách.
16. Kolonky přendáme do čistých zkumavek a otevřené je stočíme v centrifuze na 5min. při 13.000 otáčkách.
17. Po centrifugaci kolonky vložíme do čistých eppendorfek a přidáme do nich 50 μ l elučního pufru ATE. ATE je roztok deionizované vody, která umožní odpoutání DNA od kolonek a její stabilizaci.

18. Vzoroky centrifugujeme na 1min. při maximálních otáčkách (13.000 rpm).
19. Bílé kolonky vyhodíme, eppendorfky obsahující filtrát popíšeme a koncentrace DNA ve vzorcích změříme na přístroji Nanodrop (viz příloha 5) při 260nm.
20. Vzoroky DNA skladujeme při -20°C .
(19, 22)

5.6 Statistické vyhodnocení

Pro porovnání výtěžků izolovaných NK v jednotlivých typech tkáně byl použit t-test. T-test je parametrický test používaný pro testování statistických hypotéz. Rozlišujeme test jednovýběrový, dvouvýběrový a párový. Díky tomuto testu můžeme posoudit, zda data dvou vyšetřovaných skupin jsou statisticky odlišné. Pro vypočtení a sestavení grafů je potřeba vypočítat průměr a směrodatnou odchylku ze získaných dat.

Pro výpočty byl použit párový t-test. Jako statisticky signifikantní byla akceptována hodnota $p < 0,05$. Výpočet byl proveden statistikem PharmDr. Václavou Černou v programu Statistica 10.

6 VÝSLEDKY

Tabulka 1 Parametry izolované RNA a DNA z histologických bločků nádorů štítné žlázy

	Množství tkáně [mm ²]	RNA			DNA		
		<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230	<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230
1Z	144	72,29	1,57	0,60	41,50	1,86	2,30
1T	120	96,82	1,69	0,94	122,89	1,85	2,19
2Z	200	20,45	1,65	0,18	40,69	1,70	1,75
2T	180	47,21	1,91	0,19	292,80	1,97	2,48
3Z	240	98,51	1,96	1,21	220,95	1,89	2,34
3T	240	107,20	2,05	1,22	207,87	1,91	2,65
4Z	242	6,59	2,35	0,03	259,24	1,92	2,41
4T	300	26,87	1,84	1,21	264,00	1,89	2,48
5Z	192	376,60	2,00	1,68	478,13	1,87	2,45
5T	264	321,54	2,03	1,58	192,02	1,86	2,16
6Z	312	21,60	1,79	0,13	190,71	1,88	2,34
6T	210	15,48	1,41	0,37	260,26	1,85	1,78
7Z	150	218,19	2,01	0,77	115,79	1,87	2,07
7U	180	180,18	2,03	0,70	68,82	1,77	1,94
7T	140	52,96	2,06	0,24	38,26	1,84	0,97
8Z	300	32,15	2,18	0,63	104,7	1,87	1,60
8T	200	547,37	1,99	1,53	151,79	1,83	2,29
9Z	126	61,22	1,82	1,64	121,0	1,85	2,00
9U	28	25,00	2,34	1,48	7,01	1,28	1,81
9T	243	55,26	1,89	1,31	28,40	1,64	1,62
Průměrná hodnota izolované RNA: 119,3 ng/μl				Průměrná hodnota izolované DNA: 160,4 ng/μl			

Zdroj: vlastní

Legenda: Z ...zdravá tkáň
T ...tkáň obsahující tumor
U ...uzel

Tabulka 2 Parametry izolované RNA a DNA z histologických bločků nádorů jater

	Množství tkáně [mm ²]	RNA			DNA		
		<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230	<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230
1Z	198	110,39	1,83	0,64	565,76	1,87	1,88
1T	288	138,66	1,88	0,68	683,57	1,96	2,32
1P	160	103,85	2,00	0,64	46,72	1,79	1,28
2Z	180	46,28	1,69	1,21	119,36	2,07	2,15
2T	144	105,93	1,57	1,62	168,92	1,89	2,20
2P	60	95,93	1,57	0,51	243,23	1,95	2,24
3Z	231	206,85	1,80	1,23	421,81	1,95	1,93
3T	396	84,92	1,85	0,30	665,32	2,00	2,21
3P	130	209,47	1,77	1,23	148,80	1,87	2,25
4Z	429	124,30	1,83	1,26	229,80	1,94	2,21
4T	288	380,20	1,99	1,72	78,68	1,93	1,98
4P	104	263,91	2,01	1,80	123,56	1,92	2,62
5Z	363	251,27	1,85	0,86	340,49	1,87	1,59
5T	125	465,54	2,00	1,78	190,65	1,90	2,30
5P	65	246,78	1,97	1,15	53,59	2,10	1,89
6Z	195	253,29	2,04	0,79	102,00	1,85	2,11
6T	324	379,43	1,99	1,21	154,00	1,95	2,38
6P	140	210,76	2,06	0,79	115,06	1,72	1,05
7Z	180	60,62	1,74	0,37	125,65	1,85	1,44
7T	180	145,87	1,57	0,86	94,35	1,70	1,97
7P	55	53,31	1,71	0,23	55,62	1,83	2,53
8Z	120	44,81	1,60	0,62	36,69	1,98	1,77
8T	240	79,85	1,80	0,71	451,80	1,85	2,24
8P	120	36,58	1,86	0,15	51,07	1,69	2,26
9Z	160	121,47	1,98	0,46	318,69	1,88	2,30
9T	324	43,00	1,82	0,62	183,38	1,94	1,82
9P	100	80,39	1,55	0,82	15,32	1,67	1,18
10Z	200	169,48	1,94	0,72	129,94	1,91	0,84

	Množství tkáně [mm ²]	RNA			DNA		
		<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230	<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230
10T	432	96,39	1,93	1,55	25,27	1,89	1,72
10P	80	138,70	1,78	1,21	34,52	1,74	1,53
11Z	80	90,01	1,88	0,42	55,91	1,83	1,70
11T	216	225,55	1,88	1,52	116,63	2,05	2,34
11P	112	136,45	1,83	1,27	89,21	1,83	1,99
12Z	72	296,33	1,53	1,46	105,03	1,77	1,07
12T	220	190,23	1,23	1,37	439,37	1,82	1,64
12P	65	99,36	0,90	0,72	66,30	1,84	1,00
13Z	210	137,97	1,11	1,01	293,83	1,69	0,96
13T	160	188,52	1,29	1,18	144,53	1,86	2,18
13P	60	105,64	1,96	1,24	28,30	2,41	1,47
14Z	180	198,60	1,25	1,08	40,99	1,64	1,07
14T	150	232,40	1,34	1,31	76,41	1,86	1,65
14P	62	198,42	1,99	0,68	29,47	1,67	0,84
15Z	240	101,02	0,97	0,34	815,87	1,93	1,42
15T	175	108,63	0,99	0,51	55,37	2,09	2,01
15P	70	192,58	1,94	1,00	55,14	1,81	1,90
16Z	250	39,44	1,88	0,21	169,25	1,85	1,61
16T	220	109,20	1,90	1,27	212,69	1,90	2,13
16P	95	65,51	1,71	0,71	71,10	1,84	1,84
17Z	243	390,87	2,00	1,03	202,80	1,88	1,91
17T	168	137,98	2,02	1,23	19,87	1,55	0,74
17P	65	87,14	2,05	1,42	31,55	2,08	1,74
18Z	140	342,52	2,00	0,88	48,86	1,86	1,75
18T	330	748,06	2,05	1,23	960,17	1,91	1,99
18P	98	684,52	2,04	0,57	153,04	1,85	1,68
19Z	210	94,53	1,22	1,22	51,79	1,69	2,07
19T	200	194,54	1,95	1,11	110,67	1,96	2,70
19P	70	111,36	1,91	0,82	90,26	1,80	1,44
20Z	180	52,36	1,64	0,92	193,89	1,97	1,96

	Množství tkáně [mm ²]	RNA			DNA		
		<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230	<i>Izolace</i> [ng/μl]	<i>Čistota</i> 260/280	<i>Čistota</i> 260/230
20T	192	224,11	1,97	1,79	172,12	1,83	1,68
20P	115	199,62	1,60	0,93	90,88	1,83	1,63
21Z	312	54,84	1,58	0,98	999,14	1,96	1,61
21T	240	112,14	1,64	1,21	486,20	1,88	2,14
21P	125	83,36	1,64	0,99	105,51	1,90	2,17
22Z	180	312,76	1,96	1,95	89,19	1,73	1,38
22T	115	58,38	2,12	0,78	37,80	1,51	1,57
22P	65	89,78	1,95	1,34	25,13	1,87	2,41
23Z	150	60,31	1,99	1,33	92,20	1,93	2,34
23T	250	334,68	1,85	1,58	209,55	1,96	2,30
23P	100	105,58	1,69	1,00	70,71	1,79	2,05
24Z	240	84,61	1,77	0,94	249,22	1,85	1,51
24T	135	33,55	1,68	0,77	27,15	1,34	1,09
24P	100	60,62	1,65	0,64	117,24	1,86	1,82
Průměrná hodnota izolované RNA: 172,8 ng/μl				Průměrná hodnota izolované DNA: 184,6 ng/μl			

Zdroj: vlastní

Legenda: Z ...zdravá tkáň
T ...tkáň obsahující tumor
P ...přechodná tkáň

Tabulka 3 Parametry izolované RNA a DNA z histologických bločků glioblastomů

	Množství tkáně [mm ²]	RNA			DNA		
		Izolace [ng/μl]	Čistota 260/280	Čistota 260/230	Izolace [ng/μl]	Čistota 260/280	Čistota 260/230
1Z	210	74,10	2,00	0,80	56,82	1,94	2,47
1T	84	80,84	1,52	0,68	72,96	2,03	2,42
2Z	120	26,02	1,78	0,09	12,32	2,50	2,11
2T	180	129,88	2,05	0,83	118,97	1,94	2,09
3Z	243	113,92	2,02	0,21	89,13	2,03	1,99
3T	180	213,06	2,07	0,50	230,65	1,86	1,77
4Z	176	69,82	2,10	0,60	48,71	1,87	1,22
4T	168	94,68	2,03	0,58	48,18	1,88	1,49
5Z	160	145,61	2,04	1,46	98,58	1,94	2,01
5T	128	79,35	2,04	0,22	82,63	1,86	1,30
6Z	200	41,91	1,99	0,19	46,39	1,89	2,07
6T	125	172,47	2,05	1,12	114,31	1,93	2,30
7T	70	124,83	2,04	0,65	65,94	1,92	2,18
Průměrná hodnota izolované RNA: 109,8 ng/μl				Průměrná hodnota izolované DNA: 83,5 ng/μl			

Zdroj: vlastní

Legenda: Z ... zdravá tkáň
T ... tkáň obsahující tumor

Tabulka 4 Hodnoty čistoty izolovaných NK, poměru A₂₆₀/A₂₈₀, počet analyzovaných vzorků 105

	Čistota NK			
	RNA		DNA	
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	< 2,0	> 2,0	> 1,8	< 1,8
Počet vzorků	74	31	85	20
Procenta [%]	77,7	22,3	89,25	10,75

Zdroj: vlastní

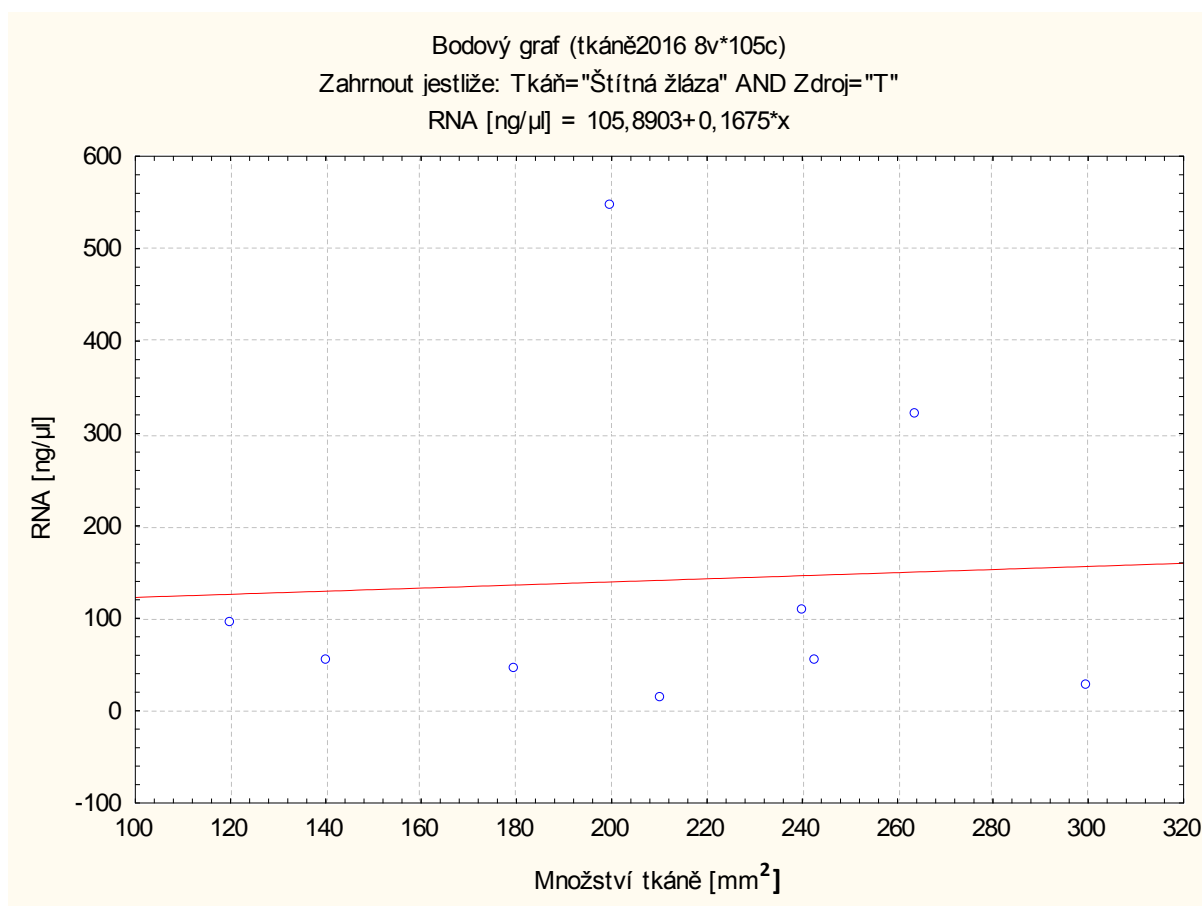
Tabulka 5 Hodnoty čistoty izolovaných NK, poměru A_{260}/A_{230} , počet analyzovaných vzorků 105

	Čistota NK				
	RNA			DNA	
A_{260}/A_{230}	2,0-2,4	> 2,4	< 2,0	> 2	< 2
poč. vzorků	0	0	105	48	57
procenta [%]	0	0	100	40,15	59,85

Zdroj: vlastní

7 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

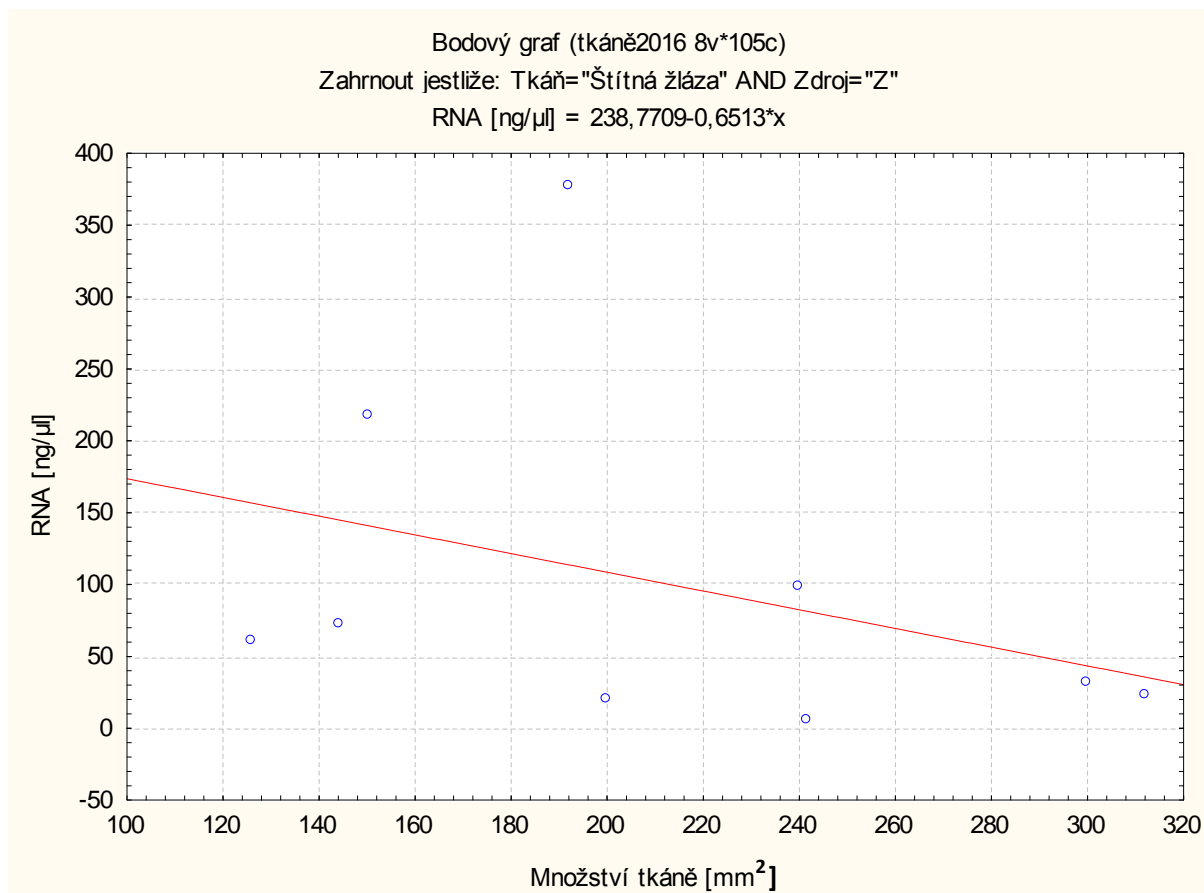
Graf 1 Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u štítné žlázy



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,0547$ $p = 0,8889$

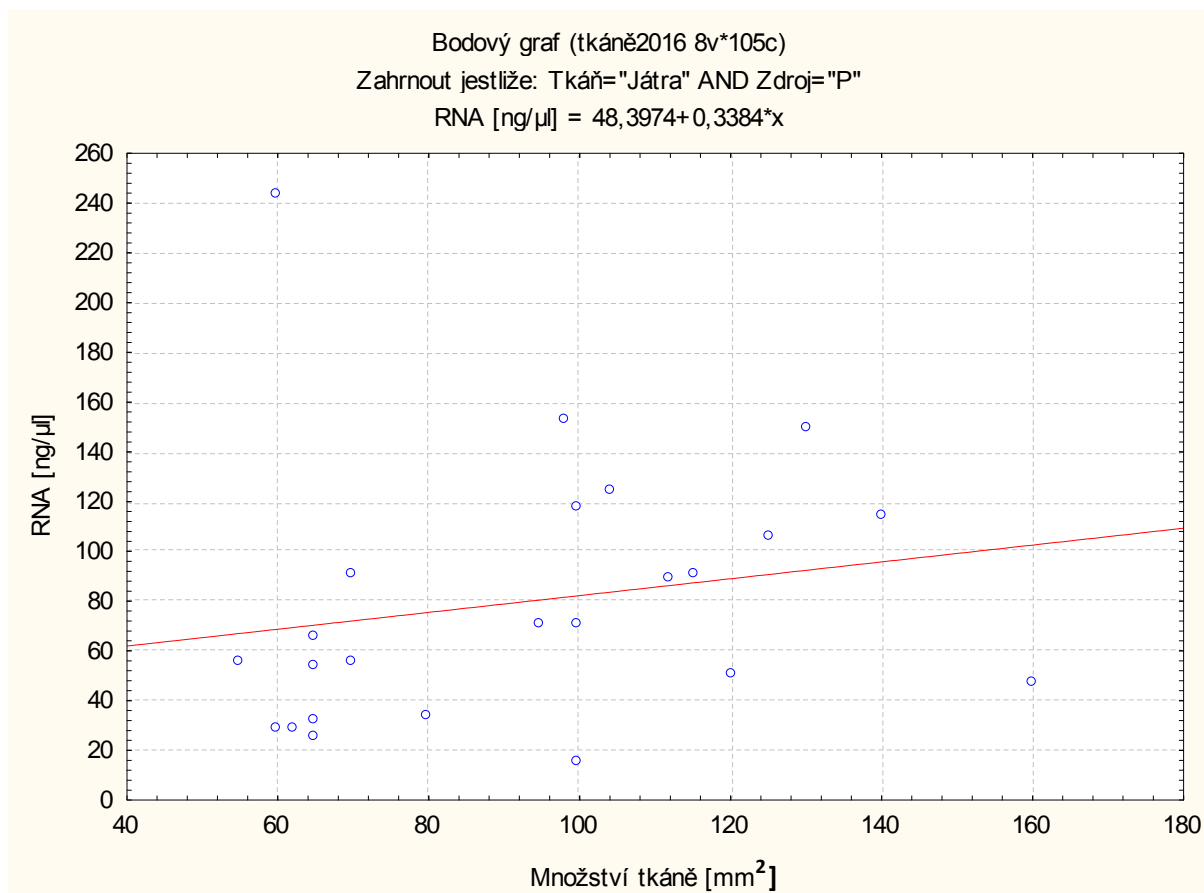
Graf 2 Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u štítné žlázy



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = -0,3581$ $p = 0,3440$

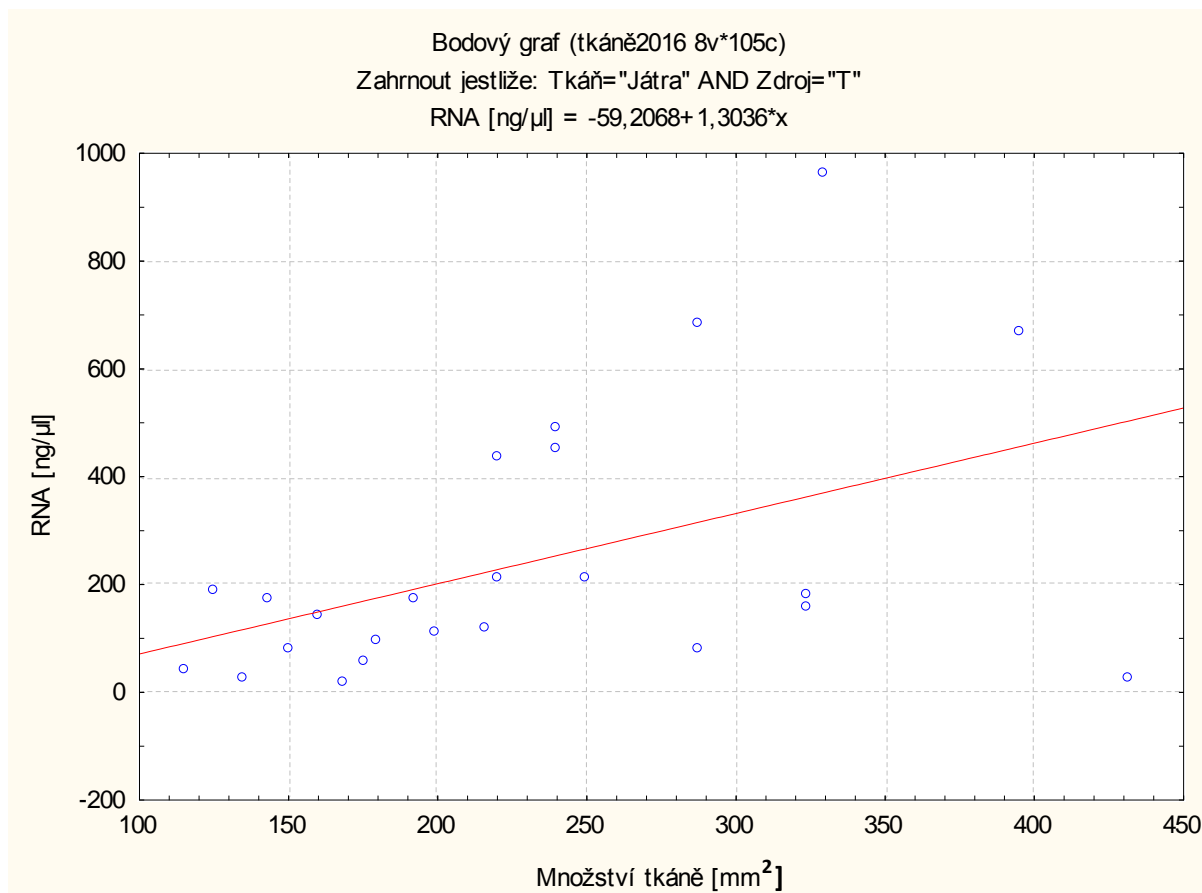
Graf 3 Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství přechodné tkáně v mm² u nádoru jater



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,1898$ $p = 0,3743$

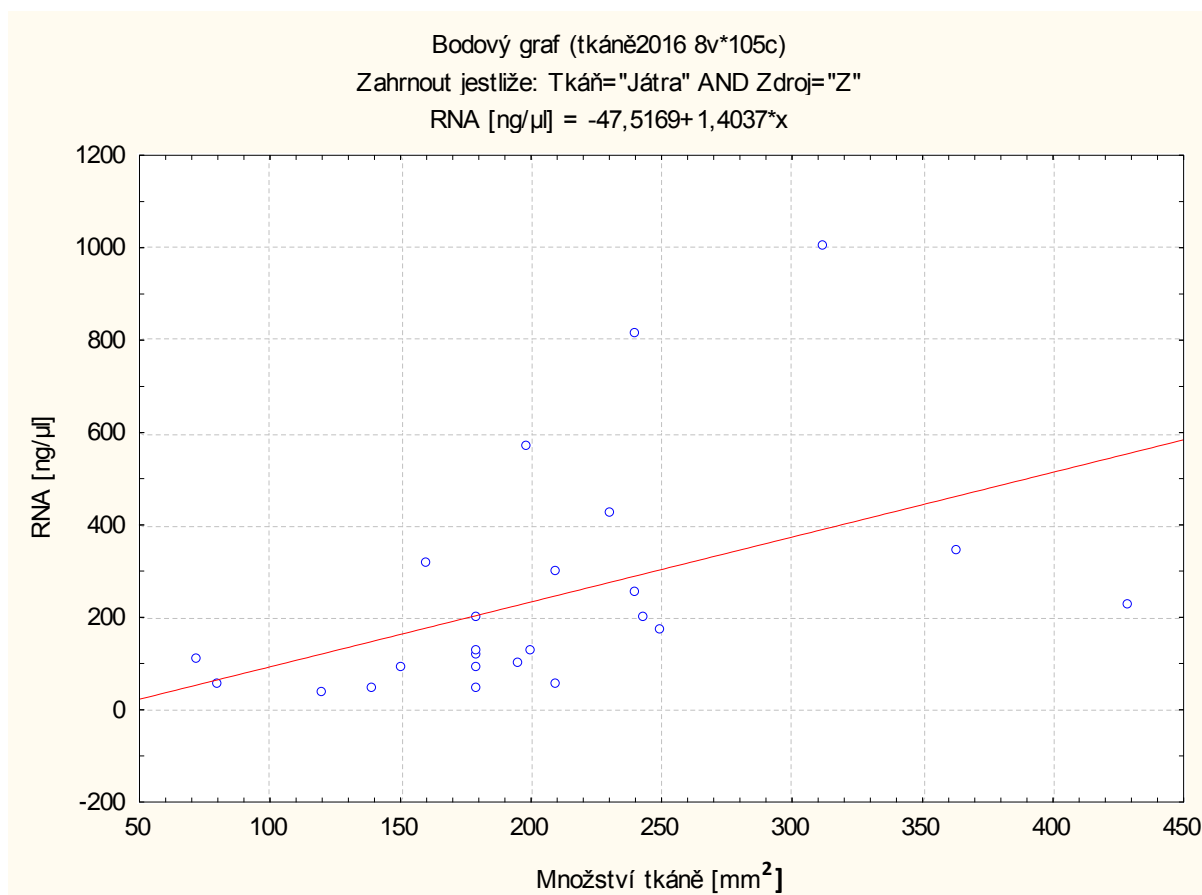
Graf 4 Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u nádoru jater



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,4515$ $p = 0,0268$

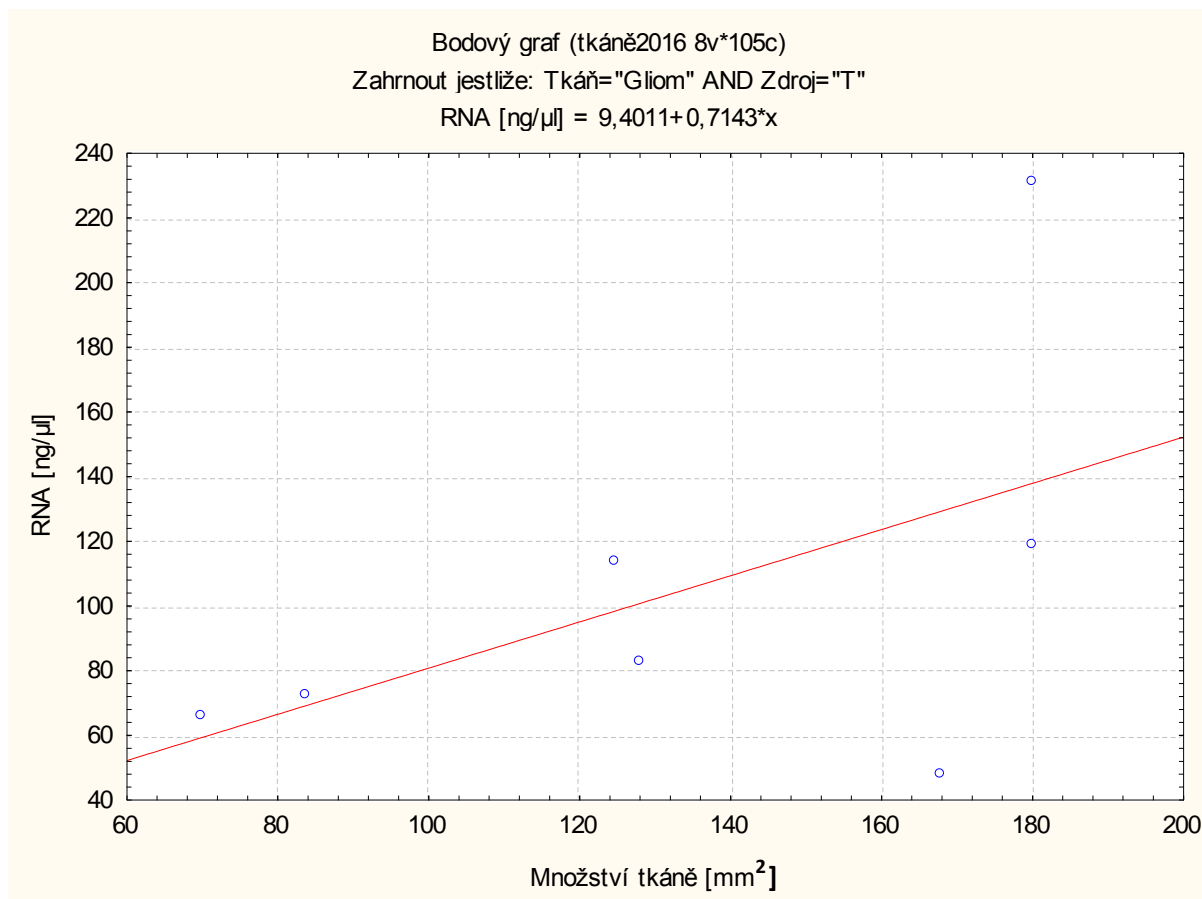
Graf 5 Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u nádoru jater



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,4565$ $p = 0,0249$

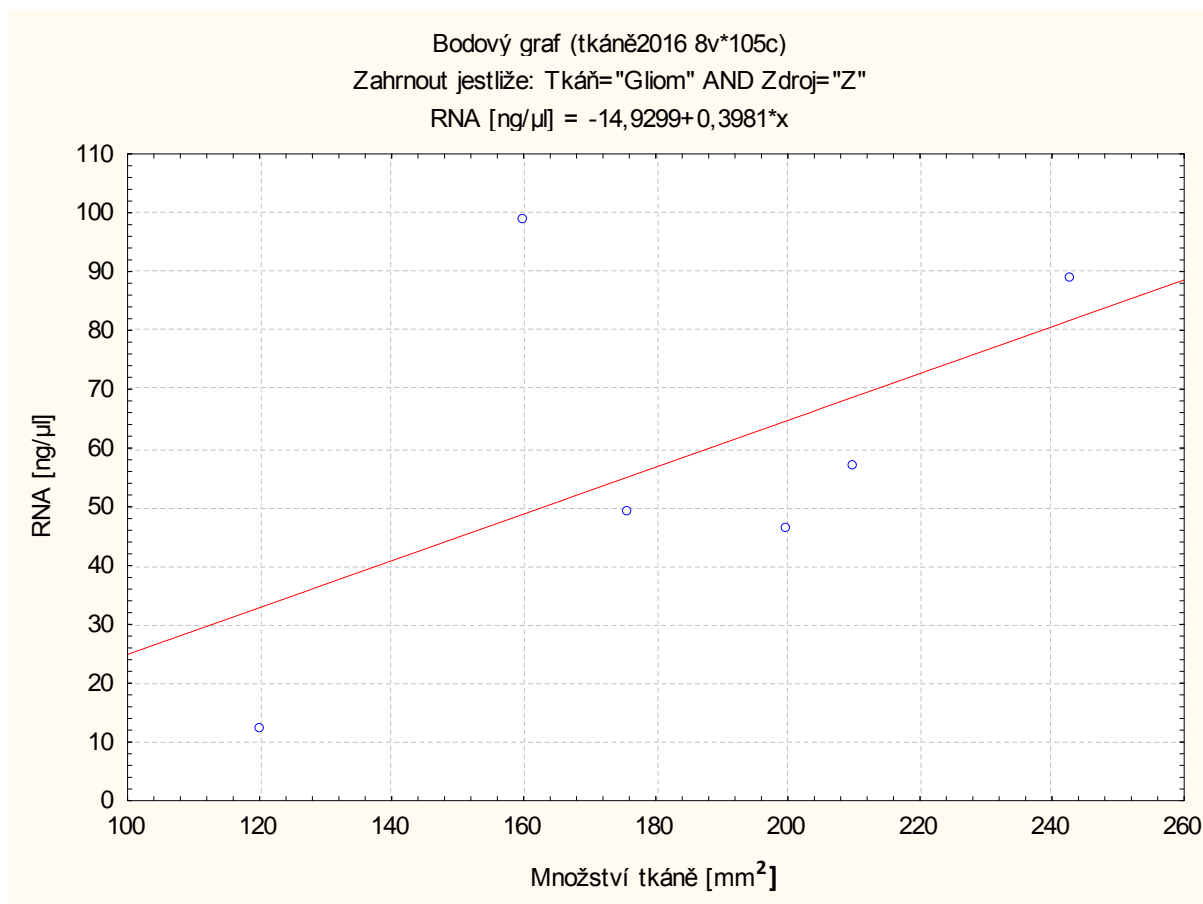
Graf 6 Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u glioblastomů



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,5255$ $p = 0,2257$

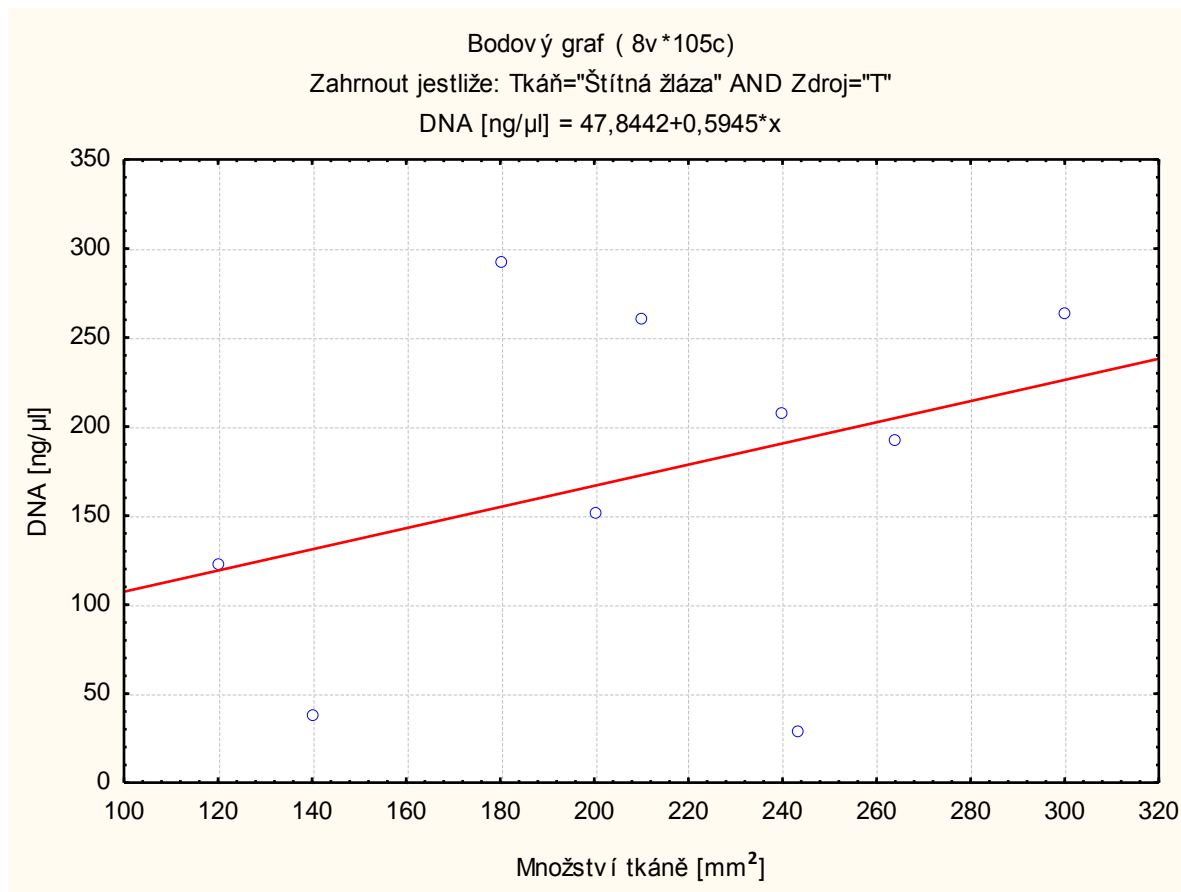
Graf 7 Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u glioblastomů



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,5427$ $p = 0,2659$

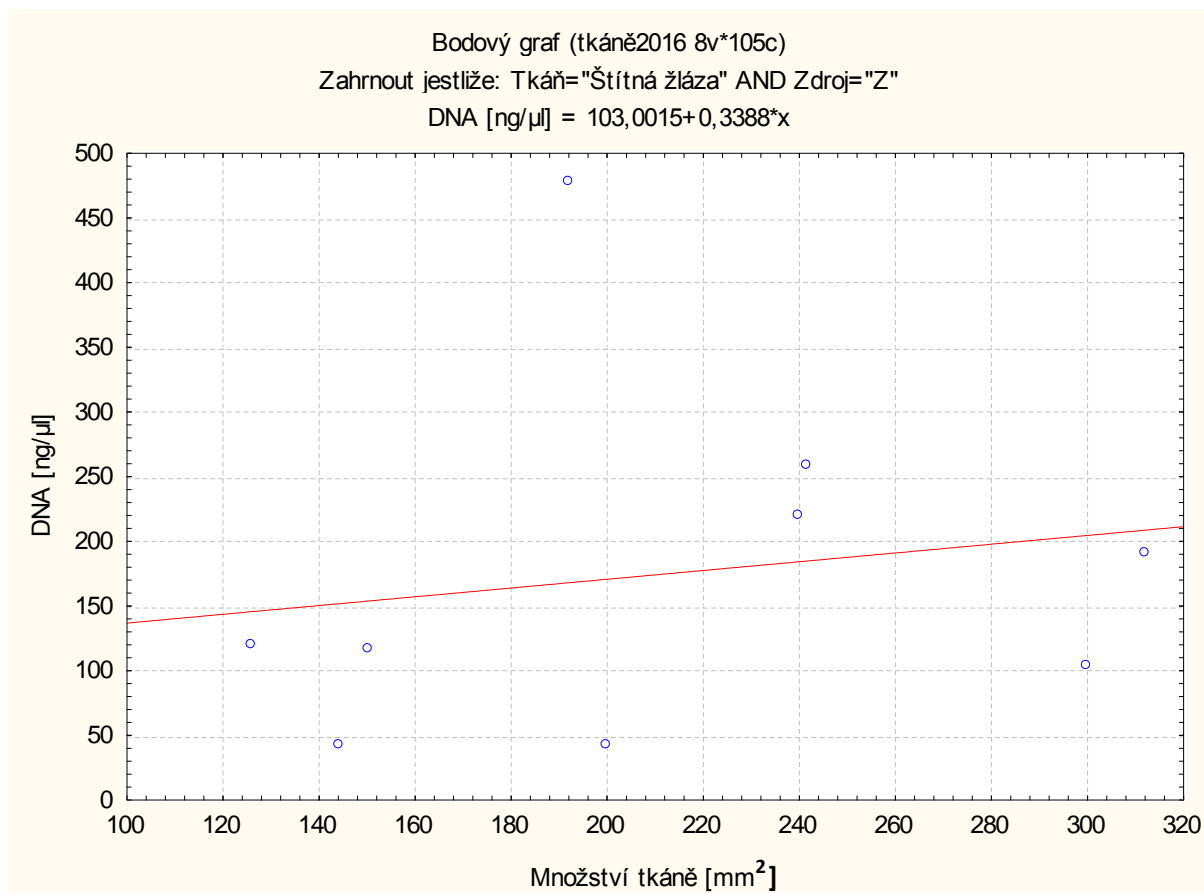
Graf 8 Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u štítné žlázy



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,3594$ $p = 0,3421$

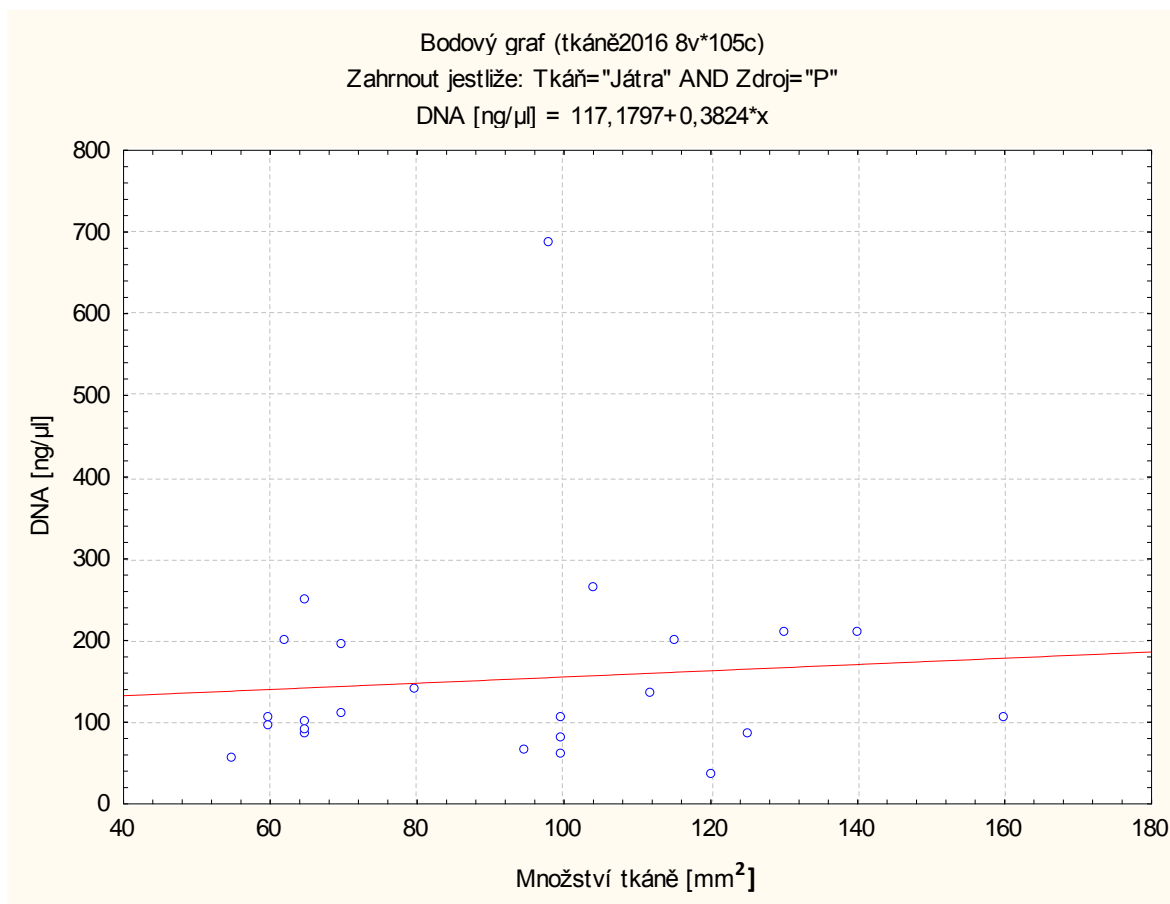
Graf 9 Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u štítné žlázy



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,1664$ $p = 0,6688$

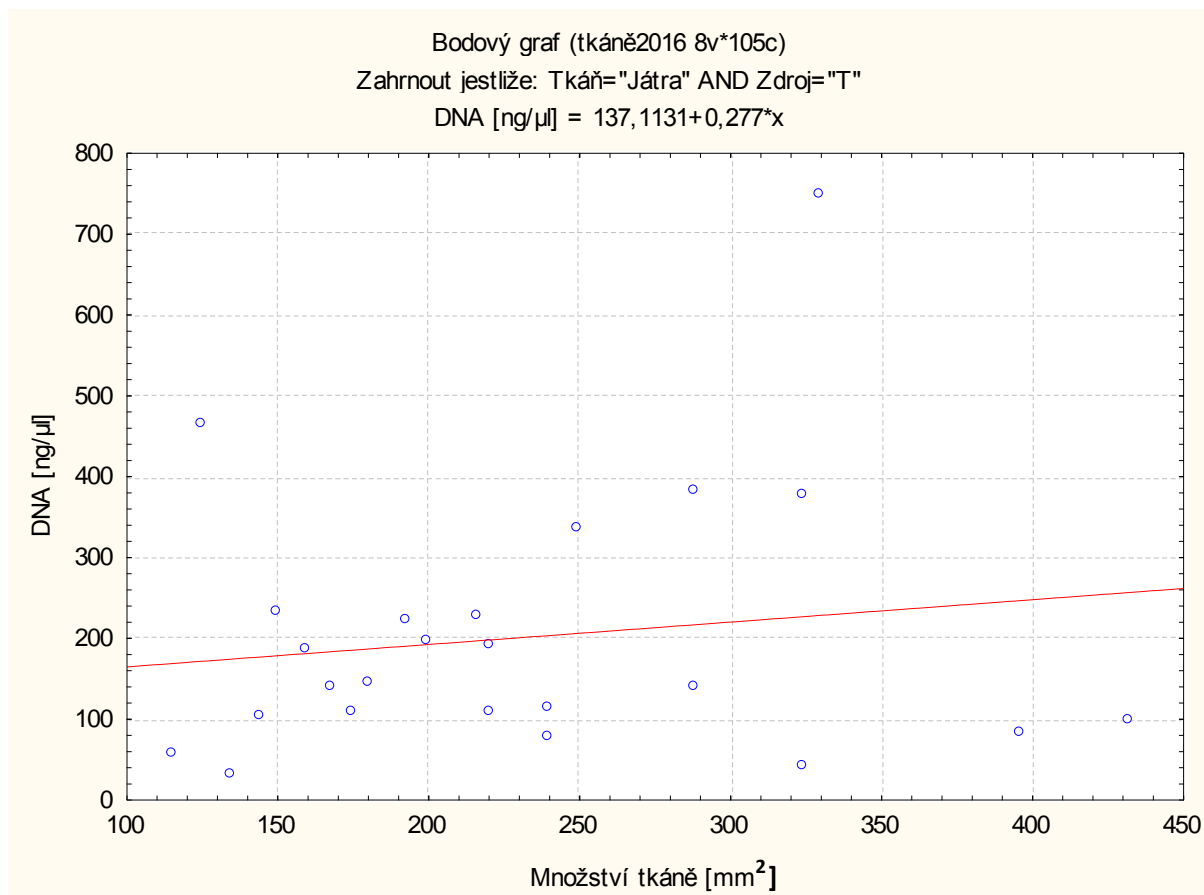
Graf 10 Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství přechodné tkáně v mm² u nádoru jater



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,0864$ $p = 0,6880$

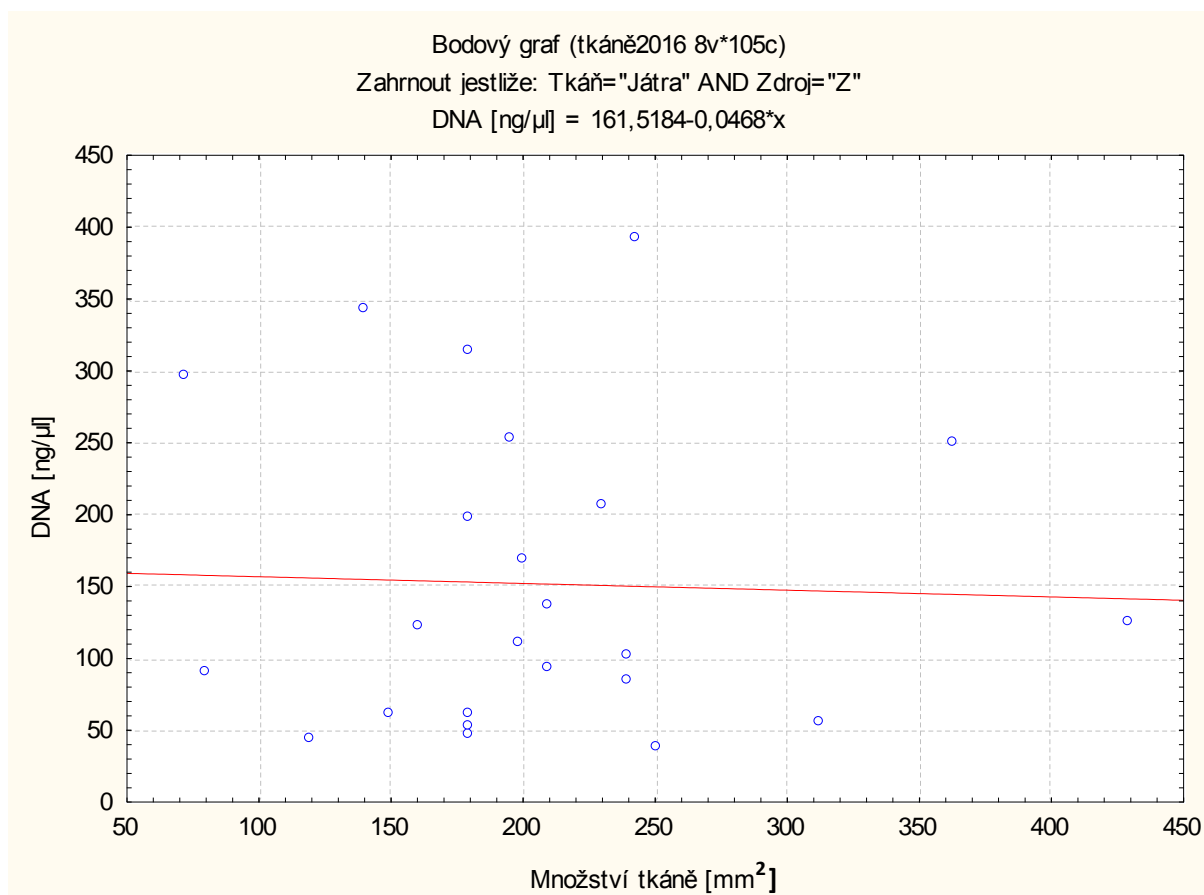
Graf 11 Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u nádoru jater



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,1451$ $p = 0,4989$

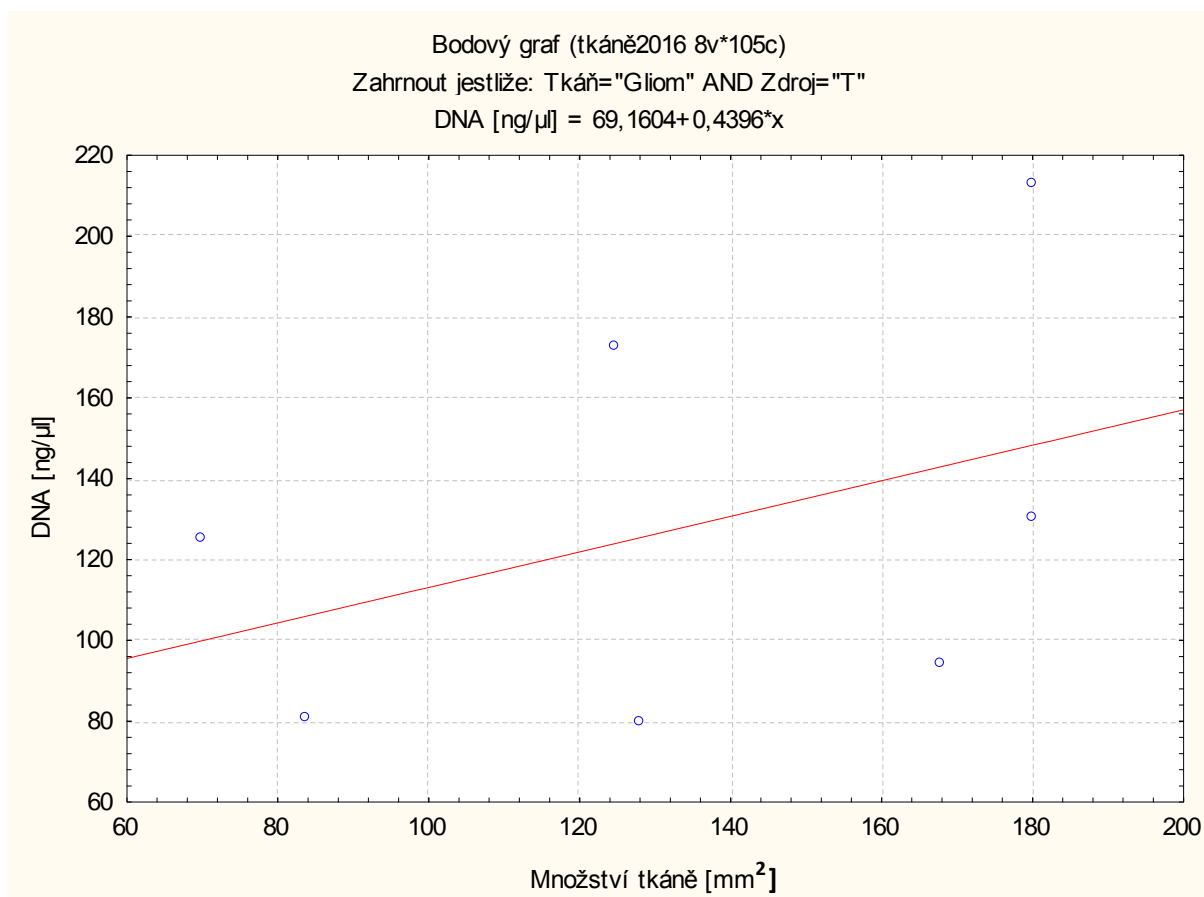
Graf 12 Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u nádoru jater



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = -0,0355$ $p = 0,8693$

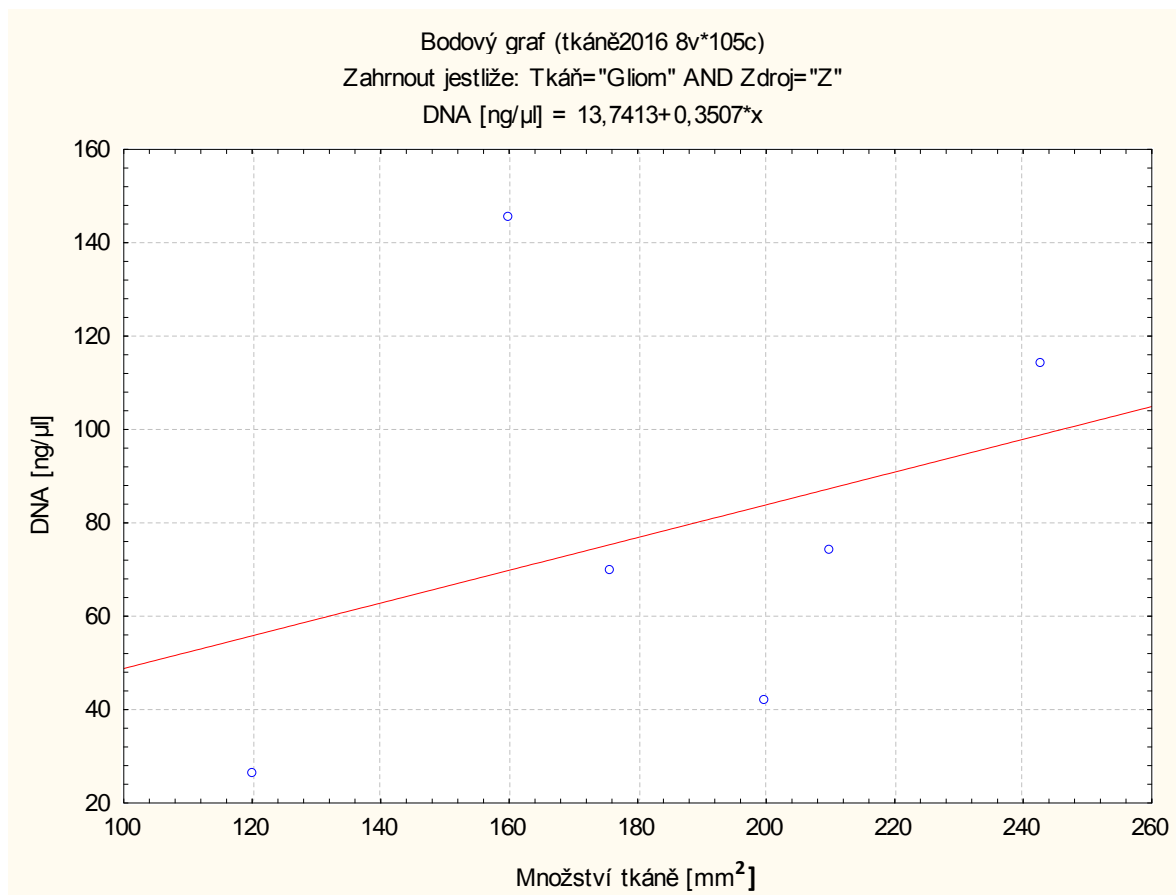
Graf 13 Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u glioblastomů



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,3957$ $p = 0,3795$

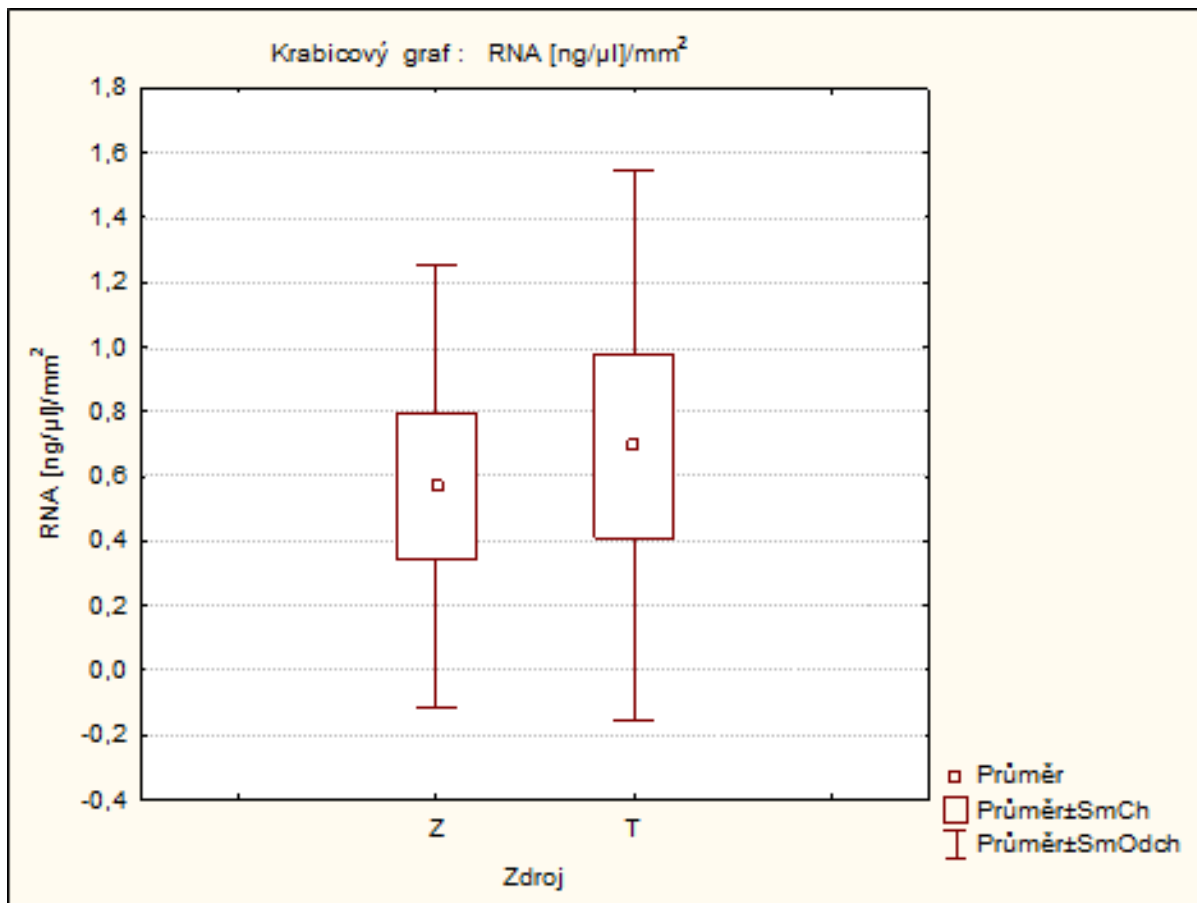
Graf 14 Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u glioblastomů



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $r = 0,3363$ $p = 0,5146$

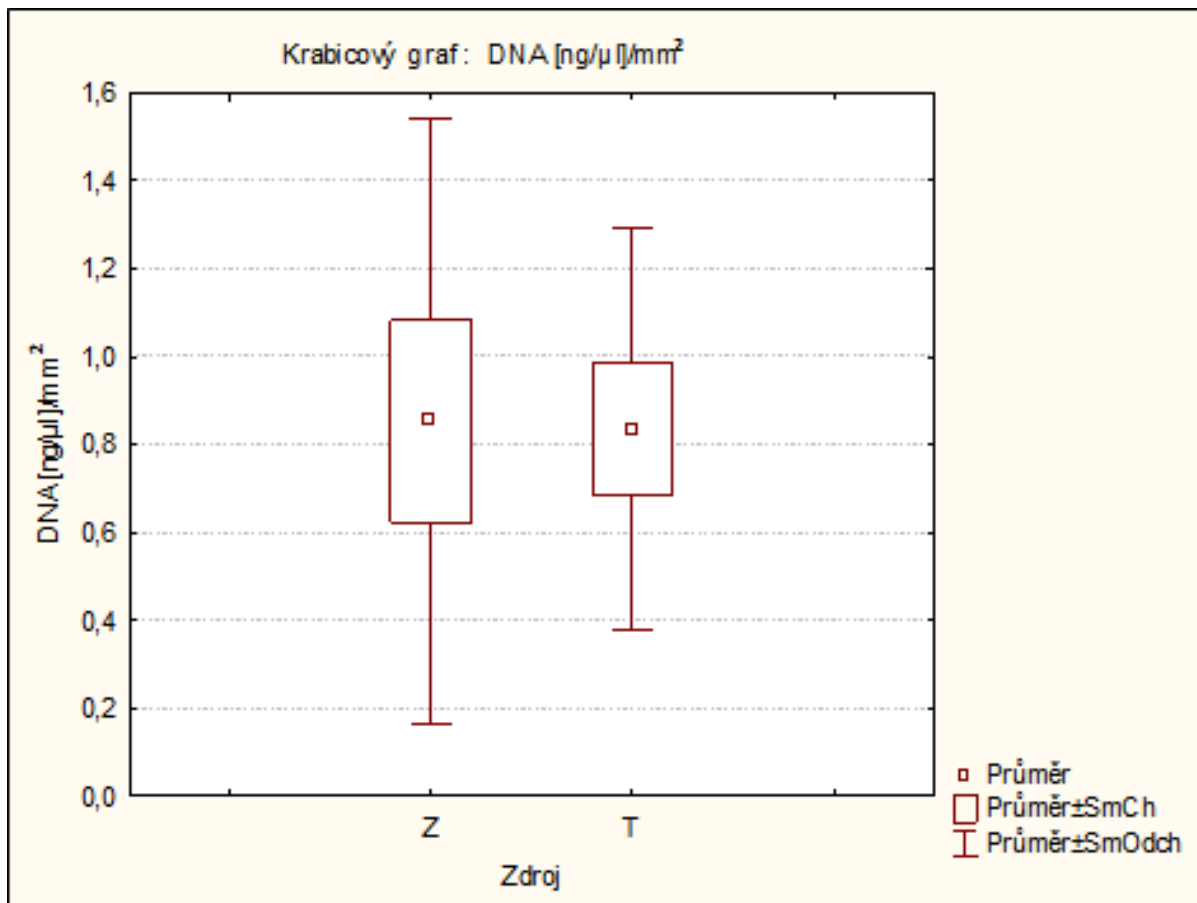
Graf 15 Krabicový graf - porovnání průměru a směrodatné odchylky RNA u štítné žlázy pomocí metody t-test (viz kapitola 5.6)



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $p = 0,736656$
Z...zdravá tkáň
T...tumor

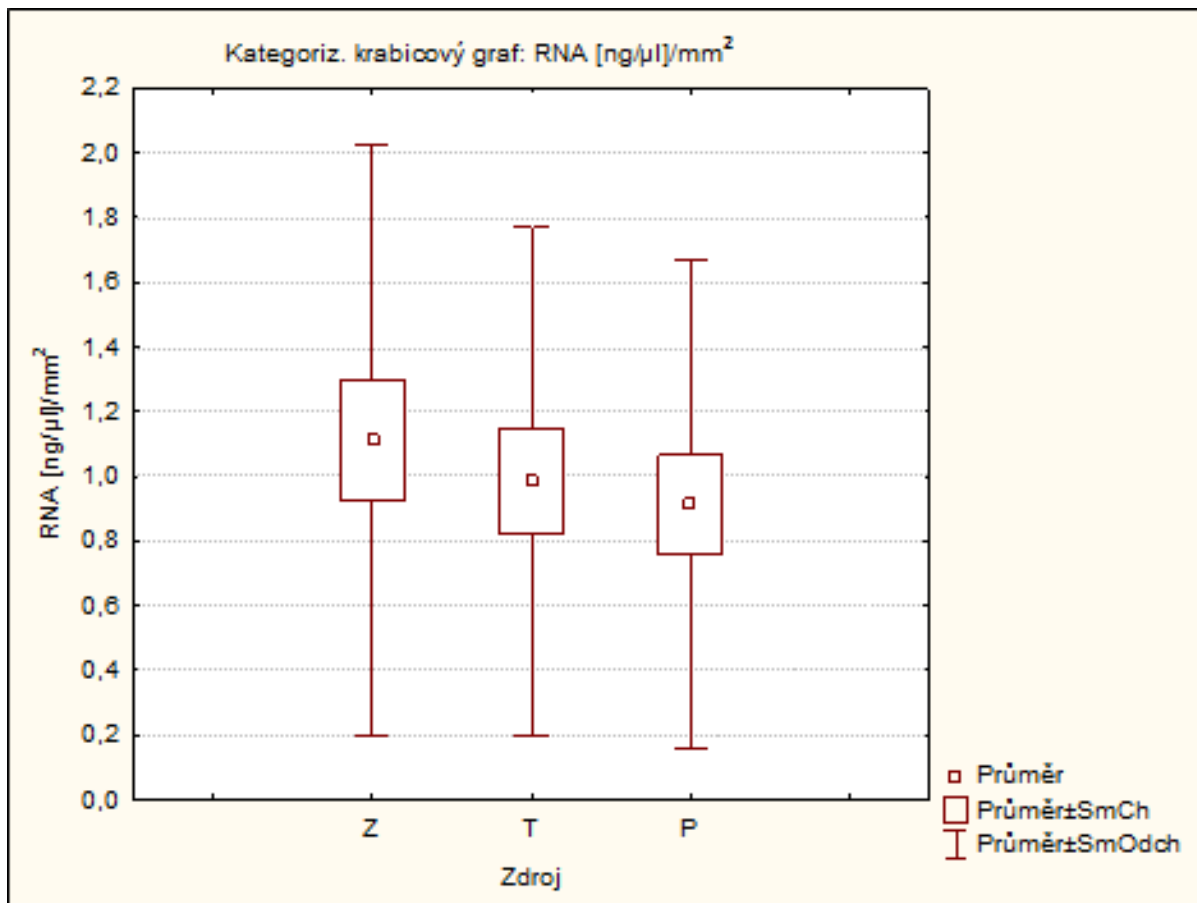
Graf 16 Krabicový graf - porovnání průměru a směrodatné odchylky DNA u štítné žlázy pomocí metody t-test (viz kapitola 5.6)



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $p = 0,951445$
Z...zdravá tkáň
T...tumor

Graf 17 Krabicový graf - porovnání průměru a směrodatné odchylky RNA u nádoru jater pomocí metody t-test (viz kapitola 5.6)



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

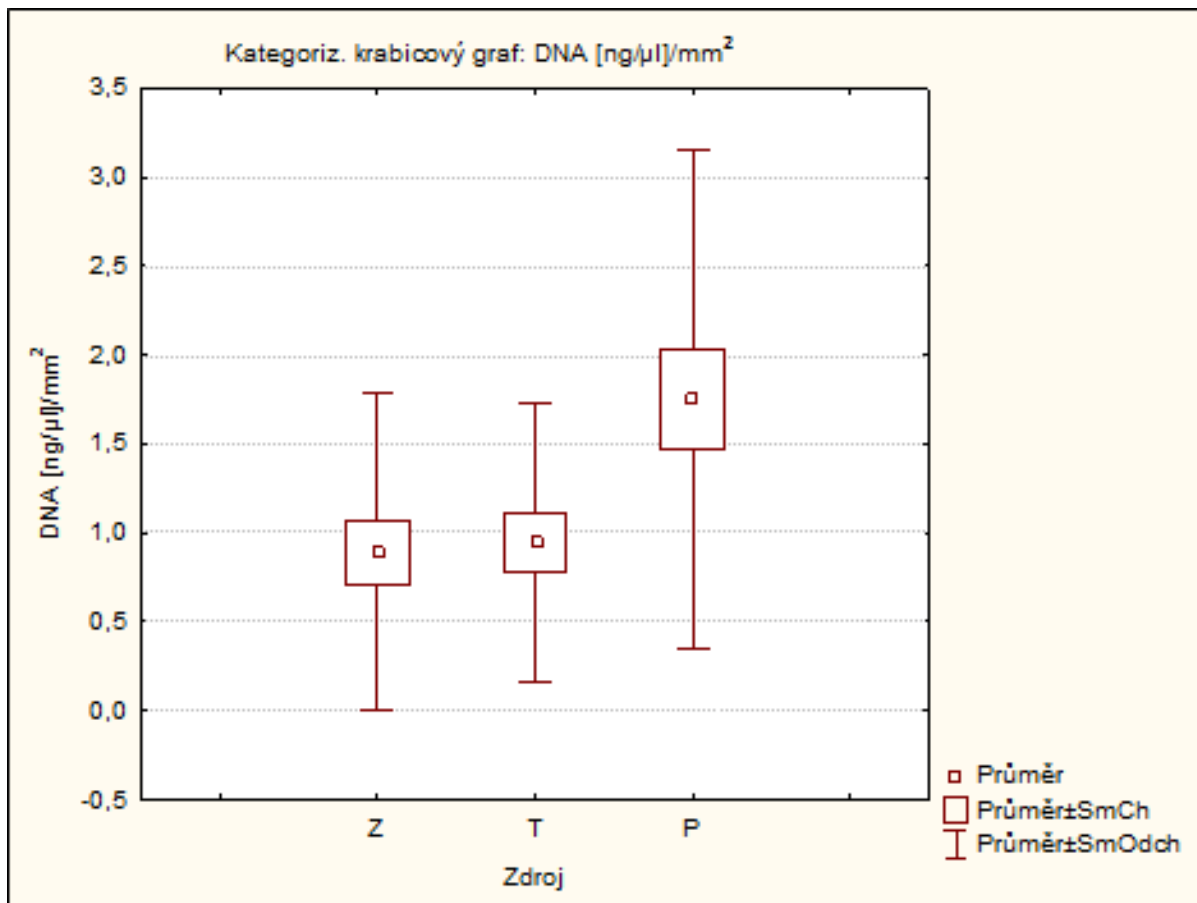
Legenda: $p = 0,693367$

Z...zdravá tkáň

T...tumor

P...přechodná tkáň

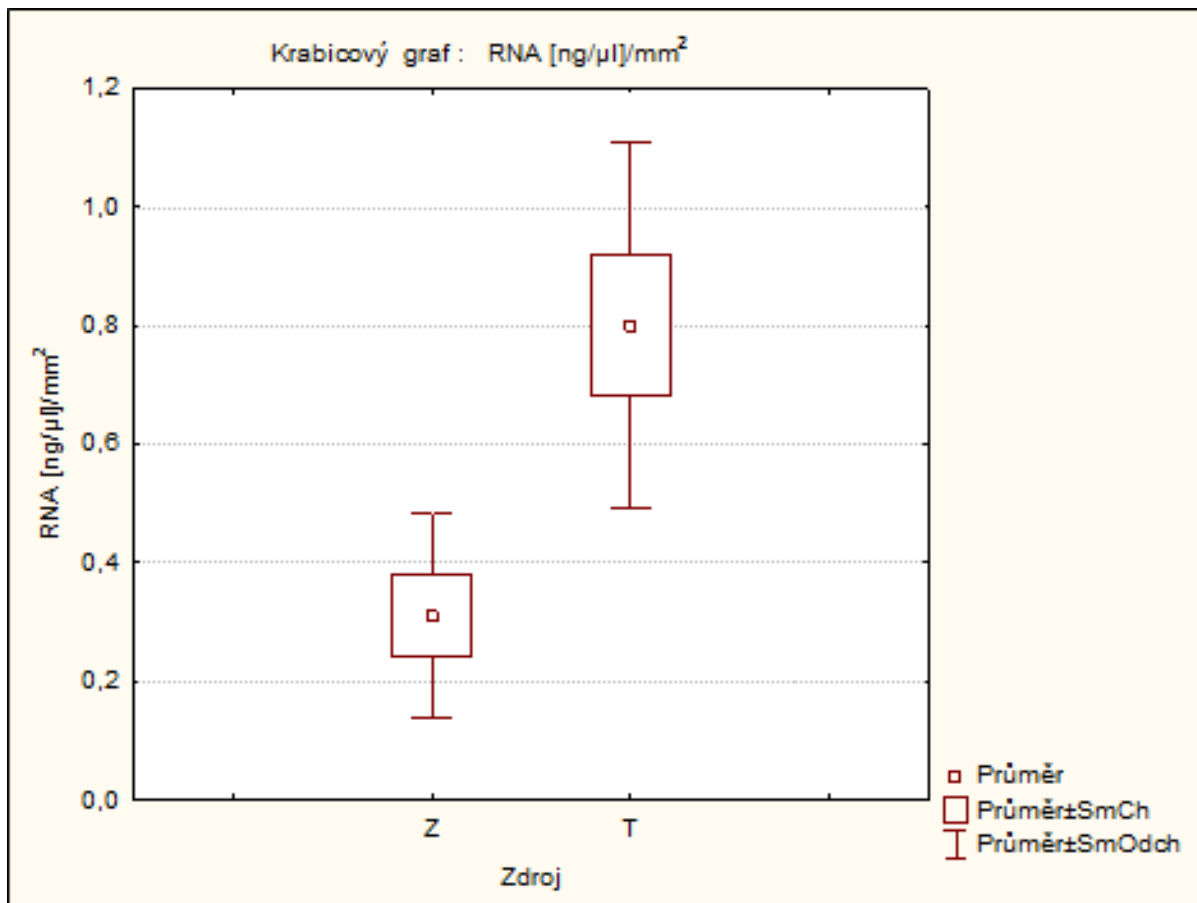
Graf 18 Krabicový graf - porovnání průměru a směrodatné odchylky DNA u nádoru jater pomocí metody t-test (viz kapitola 5.6)



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $p = 0,009473$
 Z...zdravá tkáň
 T...tumor
 P...přechodná tkáň

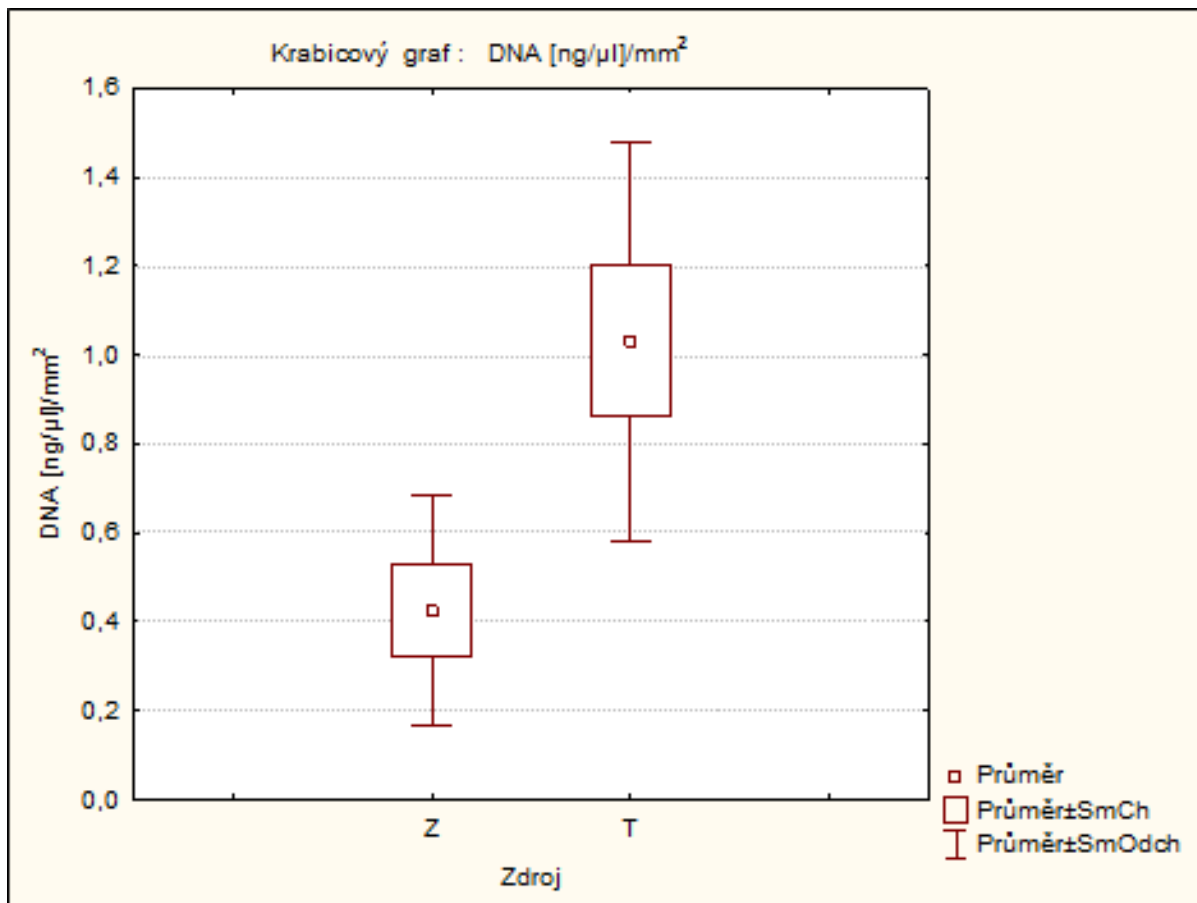
Graf 19 Krabicový graf - porovnání průměru a směrodatné odchylky RNA u glioblastomů pomocí metody t-test (viz kapitola 5.6)



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: $p = 0,005675$
Z...zdravá tkáň
T...tumor

Graf 20 Krabicový graf - porovnání průměru a směrodatné odchylky DNA u glioblastomů pomocí metody t-test (viz kapitola 5.6)



Zdroj: Statistic, program Statistica 10, na základě vlastních hodnot

Legenda: p = 0,014110
Z...zdravá tkáň
T...tumor

8 DISKUZE

Hlavním cílem práce bylo zjistit možnosti a limity izolace NK (DNA, RNA) z rutinně připravovaných histologických bločků, tzn. formalinem fixované v parafinu zalité tkáni pro použití takto izolované DNA a RNA pro následné molekulárně biologické analýzy. NK byly izolovány z FFPE tkáně štítné žlázy, nádorů jater a glioblastomů pomocí tzv. kolonkové metody soupravy AllPrep®DNA/RNA Kit firmy QIAGEN, USA.

První výzkumná otázka byla, zda je výtěžnost izolované DNA a RNA z FFPE tkáně postačující pro následné genetické analýzy. Vzhledem k vysokým výtěžkům izolací RNA z jednotlivých typů tkání (průměrná koncentrace u nádorů štítné žlázy je 119,3 ng/μl, nádorů jater 172,8 ng/μl a glioblastomů 109,8 ng/μl, při 30μl izolované RNA) je možno konstatovat, že uvedená množství jsou postačující pro stanovení exprese v řádu desítek genů (jedna reverzní transkripce vyžaduje ideálně 50 ng RNA). Tyto výsledky ukazují obrovský potenciál rutinně připravovaných parafinových bločků tkání a to jak pro genomové, tak expresní analýzy a to zejména uvědomíme-li si možnost provádění retrospektivních analýz. Na základě již provedených experimentů je možno konstatovat, že kvalita takto izolované RNA je dostačující pro stanovení exprese metodou RT real-time PCR. Stejně tak výtěžky izolované DNA dosahovaly vysokých hodnot (průměrná koncentrace u nádorů štítné žlázy je 160,4 ng/μl, u nádorů jater 184,6 ng/μl a glioblastomů 83,5 ng/μl, při 50μl izolované DNA) a to zvláště uvědomíme-li si, že obdobných výtěžků by bylo dosaženo při izolaci DNA z 200μl plné krve. Je proto možno konstatovat, že z hlediska výtěžku je tento metodický přístup k izolaci NK z parafinových bločků velice vhodný.

Druhá výzkumná otázka se týkala čistoty izolovaných NK z FFPE tkáně, zda je čistota izolovaných NK dostačující pro následné genetické analýzy. Z celkových 105 izolovaných vzorků odpovídalo při poměru A_{260}/A_{280} čisté RNA 31 vzorků (22,3%). Zbylých 74 vzorků (77,7%) bylo kontaminováno proteiny. Při poměru A_{260}/A_{230} bylo všech 105 vzorků (100%) kontaminováno organickými látkami více než by bylo vhodné a žádný tedy nesplňoval podmínky pro čistotu izolované RNA. Izolovanou DNA se nikdy nepodaří získat 100% čistou. Vždy obsahuje zbytky bílkovin. Při poměru A_{260}/A_{280} by měla čistá DNA dosahovat hodnoty vyšší než 1,8. Této hodnoty dosáhlo 85 vzorků (89,20%). Ostatní dosahovaly hodnot menších než 1,8 (20 vzorků, 10,75%). Poměr

A_{260}/A_{230} by měl být v případě čisté DNA vyšší než 2, čemuž odpovídalo 48 vzorků (40,15%). Zbylých 57 vzorků (59,85%) bylo kontaminováno a dosáhly hodnot menších než 2.

Třetí otázka se vztahovala k závislosti množství izolovaných NK a plochy (množství) řezů FFPE tkáně, ze které byla izolace provedena. U většiny vzorků se potvrdila domněnka, že čím více tkáně bylo izolováno, tím vyšší byl výtěžek izolovaných NK. Avšak statisticky signifikantně jsme uvedené potvrdili pro izolaci DNA a RNA pouze u tkáně glioblastomů. Jako ideální se ukázala plocha izolované tkáně v rozmezí cca 100 – 200 mm² (při tloušťce řezu 15 μm). U vzorků s nízkou výtěžností (méně než 15 ng/μl) se ukázalo, že zvětšování množství izolovaného materiálu často nepřináší vyšší výtěžek, což přičítáme kvalitě izolované tkáně jako takové.

Protože u některých nádorových onemocnění je již při pohledu na histologické bločky vizuálně patrný rozdíl v charakteru nádorové tkáně a zdravé tkáně, zabývali jsme se otázkou, zda nádorová tkáň, která se jeví „hustší“ poskytuje z daného množství tkáně vyšší výtěžek než zdravá tkáň. Zjistili jsme, že nelze zobecnit, že nádorová tkáň poskytuje vyšší výtěžek NK, než tkáň zdravá, avšak pro některé typy nádorů uvedené platí. Pozorovali jsme, že nádorová tkáň glioblastomů poskytuje statisticky signifikantně vyšší výtěžek než zdravá (normální) tkáň a to jak pro DNA, tak RNA. Toto zjištění je třeba brát v úvahu u některých typů tkáně z důvodu získání dostatečně velkého množství zdravé (normální) tkáně pro následné izolace DNA a RNA.

ZÁVĚRY PRO PRAXI

1. Izolace DNA a RNA pomocí izolační soupravy AllPrep®DNA/RNA Kit firmy QIAGEN , která umožňuje izolaci těchto NK z jednoho vzorku tkáně poskytuje dostatečné výtěžky pro provádění následných molekulárně biologických analýz (PCR, RT real-time PCR, expresní microarray).
2. Čistota izolovaných NK izolovaných soupravou z parafinových bločků je postačující pro následné molekulárně biologické analýzy.
3. Se vzrůstajícím množstvím izolovaného materiálu od hranice cca 100 mm² při tloušťce řezů 15μm jsme pozorovali vzrůstající výtěžnost NK. Tento vztah však nebyl statisticky signifikantní a zvláště u vzorků s nízkou výtěžností (méně než 15 ng/μl) zvyšování množství izolovaného materiálu často nepřinášelo vyšší výtěžek, což přičítáme kvalitě tkáně jako takové.
4. Obecně není možno říci, že nádorová tkáň by ze stejného množství tkáně poskytovala vyšší výtěžky izolovaných NK než zdravá (normální) tkáň z parafinových bločků, avšak pro některé typy nádorové tkáně to platí. Vyšší výtěžnost nádorové tkáně oproti zdravé byla pozorována u glioblastomů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

1. REJTHAR, Aleš, VOJTĚŠEK Bořivoj. *Obecná patologie nádorového růstu*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 206 s. ISBN 80-247-0238-x .
2. KOLÁŘ, Zdeněk a kol. *Molekulární patologie nádorů*. Olomouc: Epava, 2003. 168 s. ISBN 80-86297-15-2 .
3. ADAM, Zdeněk, KOPTÍKOVÁ, Jana, VORLÍČEK, Jiří. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. 1. vyd. Praha: Grada, 2003, 787 s. ISBN 80-247-0677-6 .
4. NUSSBAUM, Robert L., MCINNES, Roderick R., WILLARD, Huntington F., THOMPSON, James, THOMPSON, Margaret Wilson. *Klinická genetika: Thompson & Thompson*. 6. vyd. Praha: Triton, 2004, 426 s. ISBN 80-7254-475-6 .
5. KAŇKOVÁ, Kateřina a kol. *Patologická fyziologie pro bakalářské studijní programy*. Brno: Masarykova Univerzita, 2009, 164 s. ISBN 978-80-210-4923-9 .
6. *Onkogeny a protoonkogeny* [online]. Poslední změna 3.2.2016 [cit. 9.2.2016].
Dostupné z:
<http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Onkogeny_a_protoonkogeny&redirect=no>
7. PETRUŽELKA, Luboš, KONOPÁSEK, Bohuslav. *Klinická onkologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 274 s., [5] s. obr. příl. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0395-0 .
8. LONGO, Dan Louis. *Harrison's hematology and oncology*. 2nd edition. New York: McGraw – Hill Education, 2013. 831 s. ISBN 978-0 -07-181491-1 .
9. *Imunohistochemické vyšetření exprese EGFR a molekulárně genetické vyšetření KRAS* [online]. [cit. 17.2.2016].
Dostupné z: <<http://www.biopticka.cz/cz/sluzby/EGFR-KRAS.php#>>
10. ŘEHOUT, Václav, ČÍTEK, Jindřich a SÁKOVÁ, Lenka. *Genetika I.: (úvod do studia genetiky)*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2000. 256 s. ISBN 80-7040-405-1 .
11. ZVÁROVÁ, Jana a kol. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. Praha: Karolinum, 2012. 343 s. ISBN 978-80-246-2150-0 .
12. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4 .

13. *Sangerovo sekvenování* [online]. [cit. 23.1.2016]. Dostupné z:
<<http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analyza-genomickyh-a-proteomickyh-dat--analyza-sekvenci-dna--sekvenovani-genomu--sangerovo-sekvenovani>>
14. *Breast cancer* [online]. Poslední změna 21.6.2013 [cit. 22.2.2016]. Dostupné z:
<<http://www.mammaprint.co.uk/>>
15. *MammaPrint* [online]. Poslední změna 1.9.2015 [cit. 22.2.2016]. Dostupné z:
<<https://en.wikipedia.org/wiki/MammaPrint>>
16. *Klasifikace v onkologii* [online]. Poslední změna 10.5.2011 [cit. 3.3.2016].
Dostupné z: <<https://vesper001.files.wordpress.com/2011/04/klasifikace-v-onkologii1.pdf>>
17. *Izolace nukleových kyselin* [online]. Poslední změna 24.6.2004 23:00 [cit. 16.12.2015]. Dostupné z:
<<http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>>
18. *Methods in molecular biology*TM; 86. RNA isolation and characterization protocols. United States of America: Ralph Rapley, David L.Manning, 1998. 264 s. ISBN 0 - 89603-393-7 .
19. *AllPrep®DNA/RNA FFPE, Handbook*. QUIAGEN, 2010. 42 s.
20. *Lab FAQs, Find a Quick Solution*. 3rd edition. Germany: Roche. 185 s. ISBN 3 - 88630-245-8 .
21. DRÁBER Petr, PETŘÍČEK Miroslav, HAŠKOVEC Cedrik, TACHEZY Ruth, KOVÁŘOVÁ Martina, BOUBELÍK Michael, DRÁBEROVÁ Lubica. *Pokroky v PCR technologii III: RT-PCR z 0,1 ml periferní krve*. Praha: Ústav molekulární genetiky AV ČR, 1996. 111 s. Pracovní materiály semináře a praktických cvičení.
22. PEŠTA, Martin, JAVŮREK, Jan. *Současná izolace DNA a RNA ze vzorku nádorové tkáně zalité v parafinovém bločku* [videozáznam]. Plzeň: Centrum informačních technologií LFUK Plzeň, 2014. 3 DVD Video (50min 14s).

SEZNAM ZKRATEK

DNA deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

RNA ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

HIV Human Immunodeficiency Virus, Virus lidské imunitní nedostatečnosti

HPV Human Papilloma Virus, Lidský papilomavirus

EBV Epstein - Barr Virus, Epstein - Barrové virus

HBV Hepatitis B Virus, Hepatitida B

KSHV Kaposi Sarcoma - Associated Herpesvirus

EGFR Epidermal Growth Factor Receptor

mRNA messenger RNA

miRNA micro RNA

PCR Polymerase Chain Reaction, Polymerázová řetězová reakce

RT - PCR Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

cDNA complementary DNA, komplementární DNA

ELISA Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay

NK nucleic acid, nukleová kyselina

SDS dodecylsírán sodný

dd H₂O deionizovaná voda

EDTA etylendiaminotetraoctová kyselina

RNáza ribonukleáza

DNáza deoxyribonukleáza

FFPE formalin – fixed, paraffin – embedded, formalínem fixované, v parafínu zalité

DEPC diethylpyrokarbonát

NaOH hydroxid sodný

T tumor

Z zdravá tkáň (normální tkáň)

U uzel

P přechodná tkáň

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 : Parametry izolované RNA a DNA z histologických bločků nádorů štítné žlázy (str. 39)

Tabulka č. 2 : Parametry izolované RNA a DNA z histologických bločků nádorů jater (str. 40)

Tabulka č. 3 : Parametry izolované RNA a DNA z histologických bločků glioblastomů (str. 43)

Tabulka č. 4 : Hodnoty čistoty izolovaných NK, poměru A_{260}/A_{280} , počet analyzovaných vzorků 105 (str. 43)

Tabulka č. 5 : Hodnoty čistoty izolovaných NK, poměru A_{260}/A_{230} , počet analyzovaných vzorků 105 (str. 44)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 : Elektroforegram – výsledek Sangerovy metody sekvenování z automatického přístroje (str. 20)

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 : Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u štítné žlázy (str. 45)

Graf č. 2 : Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u štítné žlázy (str. 46)

Graf č. 3 : Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství přechodné tkáně v mm² u nádoru jater (str. 47)

Graf č. 4 : Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u nádoru jater (str. 48)

Graf č. 5 : Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u nádoru jater (str. 49)

Graf č. 6 : Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u glioblastomů (str. 50)

Graf č. 7 : Bodový graf - vyjádření závislosti množství RNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u glioblastomů (str. 51)

Graf č. 8: Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u štítné žlázy (str. 52)

Graf č. 9: Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u štítné žlázy (str. 53)

Graf č. 10: Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství přechodné tkáně v mm² u nádoru jater (str. 54)

Graf č. 11: Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u nádoru jater (str. 55)

Graf č. 12: Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství zdravé tkáně v mm² u nádoru jater (str. 56)

Graf č. 13: Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/μl na množství nádorové tkáně v mm² u glioblastomů (str. 57)

Graf č. 14: Bodový graf - vyjádření závislosti množství DNA v ng/ μ l na množství zdravé tkáně v mm^2 u glioblastomů (str. 58)

Graf č. 15: Krabicový graf – porovnání průměru a směrodatné odchylky RNA u štítné žlázy pomocí metody t-test (str. 59)

Graf č. 16: Krabicový graf – porovnání průměru a směrodatné odchylky DNA u štítné žlázy pomocí metody t-test (str. 60)

Graf č. 17: Krabicový graf – porovnání průměru a směrodatné odchylky RNA u nádoru jater pomocí metody t-test (str. 61)

Graf č. 18: Krabicový graf – porovnání průměru a směrodatné odchylky DNA u nádoru jater pomocí metody t-test (str. 62)

Graf č. 19: Krabicový graf – porovnání průměru a směrodatné odchylky RNA u glioblastomů pomocí metody t-test (str. 63)

Graf č. 20: Krabicový test – porovnání průměru a směrodatné odchylky DNA u glioblastomů pomocí metody t-test (str. 64)

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 : Mikrotom LEICA RM2135, Wetzlar, Německo

Příloha č. 2 : Parafinový bloček se zalitou tkání s odpovídajícím eozinovým sklíčkem.

Příloha č. 3 : Detail mikrotomu LEICA RM2135, Wetzlar, Německo. Parafinový bloček se zalitou tkání upevněný v mikrotomu.

Příloha č. 4 : Suchá lázeň, výrobek firmy TECHNE DryBlock DB – 2A dodávaný firmou EAST PORT Praha s.r.o., Praha ČR.

Příloha č. 5 : NanoDrop N - 1000 Spectrophotometer, výrobek firmy Thermo SCIENTIFIC, Wilmington, USA.

PŘÍLOHA 1

Mikrotom LEICA RM2135, Wetzlar, Německo



Foto autor

PŘÍLOHA 2

Parafinový bloček se zalitou tkání s odpovídajícím eozinovým sklíčkem.



Foto autor

PŘÍLOHA 3

Detail mikrotomu LEICA RM2135, Wetzlar, Německo. Parafinový bloček se zalitou tkání upevněný v mikrotomu.



Foto autor

PŘÍLOHA 4

Suchá lázeň, výrobek firmy TECHNE DryBlock DB – 2A dodávaný firmou EAST PORT Praha s.r.o., Praha ČR.



Foto autor

PŘÍLOHA 5

NanoDrop N - 1000 Spectrophotometer, výrobek firmy Thermo SCIENTIFIC, Wilmington, USA.

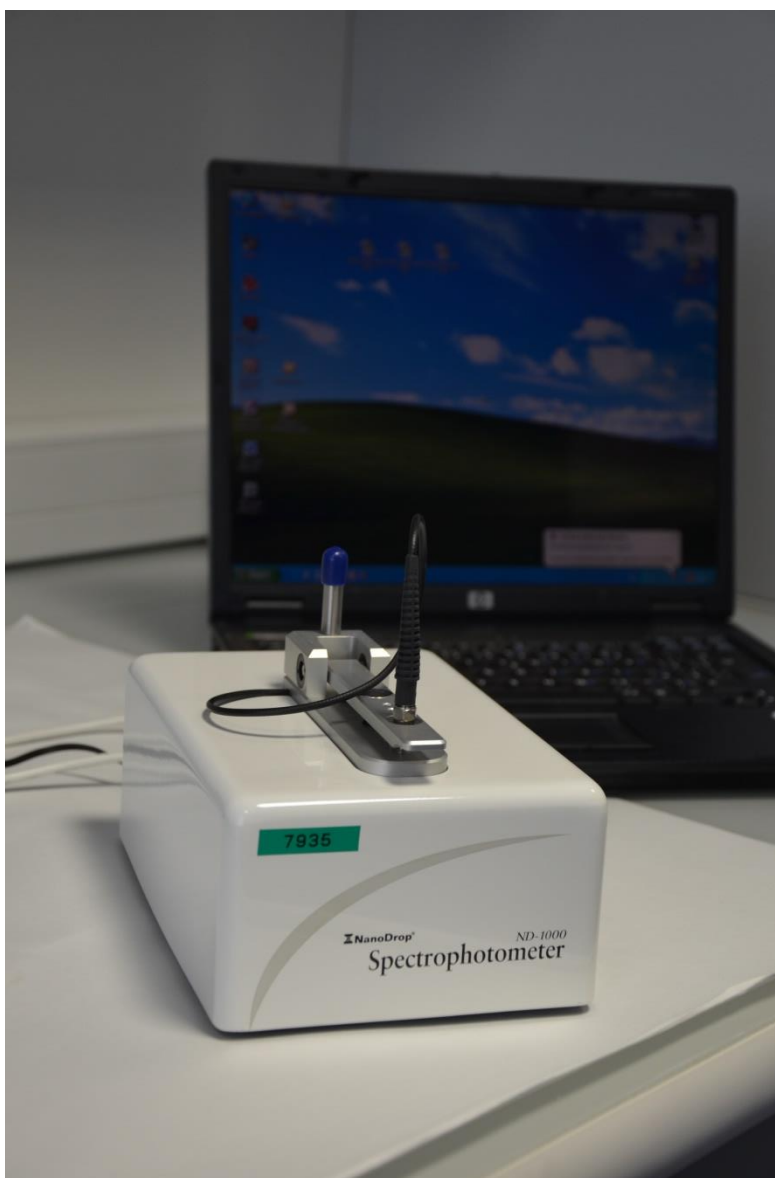


Foto autor