**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

# Detekce a molekulární charakterizace cirkulujících nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|---|---|
| Autor: | **Bc. Markéta Rožková** |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | **MUDr. Josef Srovnal, PhD.** |
| Termín odevzdání práce: | 2023 |

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

| | |
|---|---|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Markéta Rožková |
| Název práce | Detekce a molekulární charakterizace cirkulujících nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | MUDr. Josef Srovnal, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2023 |
| Abstrakt | Diplomová práce pojednává o detekci a molekulární charakterizaci cirkulujících nádorových buněk (CTC) u pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem. CTC jsou buňkami uvolňujícími se z primárního ložiska nádoru a pohybujícími se krevním řečištěm do vzdálených orgánů, kde se mohou vyvinout v metastatické ložisko. Jejich včasná detekce ze vzorku periferní krve se jeví být nadějným diagnostickým nástrojem. Následnou molekulární charakterizací genomu těchto buněk lze získat řadu důležitých informací, zejména o heterogenitě, vlastnostech a původu nádoru. Díky získaným informacím lze objevit nové terapeutické cíle, využitelné v oblasti personalizované medicíny.<br>V experimentální části práce bylo provedeno vyšetření na přítomnost cirkulujících nádorových buněk ze vzorků periferní krve pacientů s kolorektálním karcinomem. Vyšetření bylo provedeno technologií CytoTrack CT11™ založené na kombinaci fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. Mikromanipulační technikou byl proveden sběr jednotlivých detekovaných CTC a byla z nich izolována genomická DNA. Po optimalizaci amplifikace DNA byl pro amplifikaci genomu CTC zvolen kit PicoPlex®. U dvou kandidátních buněk byla provedena microarray analýza nádorově specifických chromozomálních aberací. Byla prokázána proveditelnost detekce a izolace jednotlivých CTCs a u jedné metodou microarray potvrzena přítomnost chromozomálních aberací. |
| Klíčová slova | Kolorektální karcinom, cirkulující nádorové buňky, metastáze, CytoTrack CT11™, CytoPicker™, amplifikace, microarray |
| Počet stran | 83 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

| | |
|---|---|
| Author's first name and surname | Bc. Markéta Rožková |
| Title of thesis | Detection and molecular characterization of circulating tumor cells in pacients with colorectal carcinoma |
| Type of thesis | Diploma |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | MUDr. Josef Srovnal, Ph.D. |
| The year of presentation | 2023 |
| Abstract | The diploma thesis deals with the detection and molecular characterization of circulating tumor cells (CTCs) in patients with diagnosed colorectal cancer. CTCs are cells released from the primary tumor site and move through the bloodstream to distant organs where they can develop into metastatic lesions. Their early detection from a peripheral blood sample appears to be a promising diagnostic tool. Subsequent molecular characterization of the genome of these cells can provide a lot of important information, particularly about the heterogeneity, characteristics and origin of the tumour. This information may lead to the discovery of new therapeutic targets, applicable in the field of personalised medicine.<br>In the experimental part of the work, the presence of circulating tumor cells was examined from peripheral blood samples of patients with colorectal cancer. The examination was performed with CytoTrack CT11™ technology based on a combination of fluorescence microscopy and flow cytometry. Individual detected CTCs were collected by micromanipulation technique and genomic DNA was isolated from them. After optimization of DNA amplification, the PicoPlex® kit was chosen for CTC genomic amplification. Microarray analysis of tumor-specific chromosomal aberrations was performed in two candidate cells. The feasibility of detection and isolation of individual CTCs was demonstrated and the presence of chromosomal aberrations was confirmed in one cell by microarray method. |
| Keywords | Colorectal carcinoma, circulating tumor cells, metastasis, CytoTrack CT11™, CytoPicker™, amplification, microarray |
| Number of pages | 83 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

„Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.“

V Olomouci dne 2.5.2023 Markéta Rožková

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucímu diplomové práce MUDr. Josefovi Srovnalovi, PhD. za odborné vedení práce, cenné rady a vstřícný přístup. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Ústavu molekulární a translační medicíny, zejména pak Mgr. Pavlovi Stejskalovi a Mgr. Veronice Černohorské za vytvoření příjemného pracovního prostředí, ochotu vždy poradit a za pomoc při práci v laboratoři. Diplomová práce vznikla za podpory projektů AZV NV18-03-0047 a IGA_LF UP_2023_006.

# OBSAH

**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK** **8**

**1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE** **11**

**2 TEORETICKÁ ČÁST** **13**

**2.1 Anatomická stavba tlustého střeva a konečníku** **13**

**2.2 Kolorektální karcinom** **14**

2.2.1 Epidemiologie onemocnění 14

2.2.2 Klasifikace onemocnění 16

2.2.3 Molekulárně-genetické vlastnosti onemocnění 18

2.2.4 Symptomy a diagnostika onemocnění 22

2.2.5 Rizikové faktory a prevence 23

2.2.6 Možnosti léčby 24

**2.3 Cirkulující nádorové buňky** **26**

2.3.1 Role cirkulujících nádorových buněk v procesu metastázování 27

2.3.2 Metody obohacení nádorových buněk 29

2.3.3 Metody detekce cirkulujících nádorových buněk 30

2.3.4 Molekulární charakterizace cirkulujících nádorových buněk 34

2.3.5 Využití cirkulujících nádorových buněk 37

**3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST** **39**

**3.1 Materiál a chemikálie** **39**

**3.2 Přístrojové vybavení** **40**

**3.3 Metody** **41**

3.3.1 Příprava vzorku pro detekci cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™ 41

3.3.2 Skenování vzorků technologií CytoTrack CT11™ 43

3.3.3 Sběr identifikovaných cirkulujících nádorových buněk ze CytoDiscu™ nástrojem CytoPicker™ 44

3.3.4 Amplifikace genomu cirkulující nádorové buňky amplifikačním kitem MALBAC® Single Cell WGA 45

3.3.5 Amplifikace genomu cirkulující nádorové buňky amplifikačním kitem Ampli1™ WGA 47

3.3.6 Amplifikace genomu cirkulující nádorové buňky amplifikačním kitem PicoPLEX® Single Cell WGA 50
3.3.7 Měření koncentrace vzorků Qubit™ 4 fluorometrem 52
3.3.8 Kapilární elektroforéza v analyzátoru Agilent 2100 Bioanalyzer System 53
3.3.9 Purifikace produktu PCR purifikačním kitem QIAquick® 54
3.3.10 Detekce chromozomálních aberací na celogenomové úrovni metodou microarray 55

**4 VÝSLEDKY 59**

**4.1 Detekce cirkulujících nádorových buněk technologií CytoTrack CT11™ 59**

**4.2 Sběr identifikovaných cirkulujících nádorových buněk ze CytoDiscu™ nástrojem CytoPicker™ 60**

**4.3 Optimalizace celogenomové amplifikace pro single-cell analýzu cirkulující nádorové buňky 61**

**4.4 Detekce chromozomálních aberací na celogenomové úrovni metodou microarray 67**

**5 DISKUZE 69**

**6 ZÁVĚR 75**

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 76**

## Seznam použitých zkratek

| | |
|---|---|
| 5-FU | 5-fluorouracil |
| APC | Tumor-supresorový gen adenomatózní polypózy střeva (Adenomatous polyposis coli) |
| bp | Pár bazí (base pair) |
| BRAF | Protoonkogen B-raf myšího sarkomového virového onkogenního homologu B (Rapidly accelerated fibrosarcoma isoform B) |
| CIMP | Dráha fenotypu CpG methylátoru (CpG Island methylator phenotype) |
| CIN | Dráha chromozomální nestability (Chromosomal instability pathway) |
| CD45 | Cluster of differentiation 45 |
| CD47 | Cluster of differentiation 47 |
| CDKN2A | Inhibitor cyklin-dependentních kináz 2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) |
| cDNA | Komplementární deoxyribonukleová kyselina (Complementary deoxyribonucleic acid) |
| CK | Cytokeratin |
| CNV | Variabilní počet kopií (Copy Number Variation) |
| CpG | Část DNA složená z cytosinu (C) a guanosinu (G) vázaných fosfátem (p) |
| CRC | Kolorektální karcinom (Colorectal carcinoma) |
| CT | Počítačová tomografie (Computed tomography) |
| CTC | Cirkulující nádorová buňka (Circulating tumor cell) |
| ctDNA | Cirkulující tumorová DNA (Circulating tumor DNA) |
| Cy | Cyanin |
| DAPI | Fluorescenční barvivo 4',6-diamidin-2-fenylindol |
| DCC | Tumor-supresorový gen (Deleted in colorectal cancer gene) |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid) |
| dsDNA | Dvouvláknová DNA (Double-stranded DNA) |
| EGFR | Receptor epidermálního růstového faktoru (Epidermal growth factor receptor) |
| EMA | Evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicine Agency) |
| EMT | Epiteliálně-mezenchymální tranzice (Epithelial to mesenchymal transition) |
| EpCAM | Adhezní molekula epiteliálních buněk (Epithelial cell adhesion molecule) |

| | |
|---|---|
| EPISPOT | Epiteliální imunospot (Epithelial immunospot) |
| FAP | Familiární adenomatózní polypóza (Familial adenomatous polyposis) |
| FAST | Skenovací technologie (Fiber-optic array scanning technology) |
| FDA | Úřad pro potraviny a léčiva (Food and Drug Administration) |
| FITC | Fluorescein isothiokyanát (Fluorescein isothiocyanate) |
| FOLFOX | Kombinace oxaliplatiny, 5-fluorouracilu a leukovorinu |
| gDNA | Genomová deoxyribonukleová kyselina (Genomic deoxyribonucleic acid) |
| GDP | Guanosindifosfát (Guanosine-5'-diphosphate) |
| GFP | Zelený fluorescenční protein (Green fluorescent protein) |
| GLOBOCAN | Online databáze poskytující globální statistiky týkající se rakoviny (Global Burden of Cancer) |
| GSK3 | Glykogensyntáza-kináza-3 (Glycogen synthase kinase 3) |
| GTP | Guanosintrifosfát (Guanosine-5'-triphosphate) |
| HER2 | Humánní epidermální receptor 2 (Human epidermal growth factor receptor 2) |
| hMLH1 | Gen zapojený v missmatch repair (Human MutL homolog 1) |
| hPMS2 | Gen zapojený v missmatch reapir (Human postmeiotic segregation increased 2) |
| hMSH2/6 | Gen zapojený v missmatch repair (Human MutS homolog 2) |
| HNPCC | Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (Hereditary non-polyposis colorectal carcinoma) též známý jako Lynchův syndrom |
| HS | Vysoká citlivost (High Sensivity) |
| IGF-1R | Receptor inzulínu podobnému růstovému faktor 1 (Insulin-like growth factor 1 receptor) |
| IORT | Intraoperační radioterapie (Intraoperative radiotherapy) |
| K-ras | Homolog virového onkogenu Kirstenova potkanního sarkomu (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) |
| lncRNA | Dlouhá nekódující ribonukleová kyselina (Long noc-coding ribonucleic acid) |
| LV | Leukovorin |
| MDA | Amplifikace s násobným vytěsněním řetězce (Multiple displacement amplification) |

| | |
|---|---|
| MMR | Reparace chybného párování (Missmatch repair) |
| mRNA | Mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger ribonucleic acid) |
| MSI | Dráha mikrosatelitní nestability (MicroSatellite Instability pathway) |
| p16/21/53 | Protein 16/21/53 |
| PBS | Fosfátem pufrovaný solný roztok (Phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) |
| PDX | Xenograft odvozený od pacienta (Patient derived xenografts) |
| qPCR | Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative Polymerase Chain Reaction) |
| rcf | Relativní centrifugační síla (Relative centrifugal force) |
| RNA | Ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid) |
| rpm | Počet otáček za minutu (Rounds per minute) |
| RT-PCR | Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) |
| SMAD | Gen zapojený do signalizace TGF-β (Small mothers against decapentaplegic gene) |
| SNHG11 | Hostitelský gen malé jadérkové ribonukleové kyseliny 11 (Small Nucleolar Ribonucleic Acid Host Gene 11) |
| TGF-β | Transformující růstový faktor β (Transforming growth factor β) |
| TNM | Klasifikační systém nádorů používaný pro stanovení rozsahu nádoru (T–Tumor), metastáz v regionálních mízních uzlinách (N–Node) a vzdálených metastáz (M–Metastasis) |
| TCF/LEF | T buněčný faktor/ lymfoidní spouštěcí faktor (T cell-specific transcription factor/Lymphoid enhancer-binding factor) |
| UICC | Mezinárodní unie pro kontrolu rakoviny (Union of International Cancer Control) |
| VEGF | Vaskulární endotelový růstový faktor (Vascular endothelial growth factor) |
| VEGFR | Receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor (Vascular endothelial growth factor) |
| WGA | Celogenomová amplifikace (Whole genome amplification) |
| Wnt | Signální dráha Wingless/Integration |

# 1 Úvod a cíle práce

Kolorektální karcinom (CRC) je jedno z nejčastějších nádorových onemocnění, jenž je ročně diagnostikováno téměř 2 milionům pacientů. Mortalita tohoto onemocnění celosvětově dosahuje zhruba 935 000 úmrtí ročně, čímž obsazuje druhou příčku mezi nádorovými onemocněními s nejvyšší mortalitou, a to hned po karcinomu plic (dostupné z https://gco.iarc.fr/today).

V závislosti na stádiu onemocnění se v léčbě kolorektálního karcinomu přistupuje k chirurgické resekci nádoru v kombinaci s chemoterapií či radioterapií. I přes radikální výkon s kurativním záměrem často u pacientů přetrvává riziko výskytu cirkulujících nádorových buněk v krevním řečišti a možný rozvoj metastáz. (Thorsteinsson a kol., 2011).

Cirkulující nádorové buňky (CTC) jsou uvolňovány z primárního ložiska nádoru, dále putují krevními a lymfatickými cévami na vzdálené místo, kde se mohou vyvinout v metastázu, která mnohokrát bývá příčinou úmrtí pacienta. Přítomnost těchto buněk v krevním řečišti by se však dala využít jako nadějný nástroj na poli diagnostiky a monitoringu. Informace získané detekcí a charakterizací CTC by mohly napomoci posunu od konvenčních metod terapie, které postihují všechny dělící se buňky v těle, k zacílené a personalizované léčbě. Detekce a charakterizace CTC prováděná z tzv. tekuté biopsie je navíc ve srovnání s dosud prováděnou tkáňovou biopsií minimálně invazivní a je možné ji provádět s větší pravidelností (Alix-Panabières & Pantel, 2013; Magbanua & Park, 2017).

V současné době dochází k mohutnému rozvoji detekčních metod, které by dokázaly přítomnost těchto buněk ze vzorku periferní krve odhalit. Naráží však na řadu překážek, a to zejména na vzácný výskyt a heterogenitu CTC. V této diplomové práci byla pro detekci využita detekční technologie CytoTrack CT11™, jež kombinuje přednosti průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Tato detekční technologie je díky speciálně vyvinutému systému CytoPicker™ kompatibilní s metodami molekulární charakterizace (Markussen, 2017). Kompatibilita s molekulární charakterizací je stěžejní, protože je jejím provedením získána řada užitečných informací, včetně údajů o mutačním stavu nádorových buněk pacienta nebo o získané rezistenci nádorových buněk vůči aplikované terapii. (Lowes & Allan, 2014).

## Cíle práce

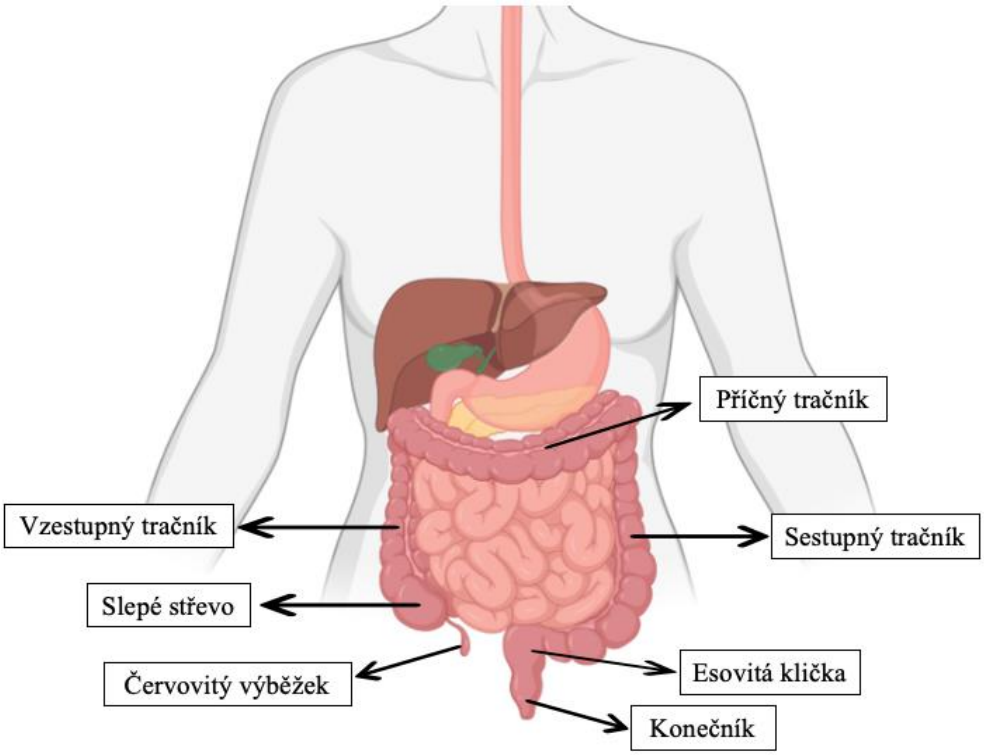
1. Analyzovat vzorky krve pacientů s CRC a identifikovat CTCs pomocí detekční technologie CytoTrack CT11™.
2. Optimalizovat mikromanipulační techniku sběru CTCs nástrojem CytoPicker™ a optimalizovanou technikou izolovat identifikované CTC.
3. Optimalizovat a porovnat WGA kity Ampli1™, MALBAC® a PicoPlex® s využitím referenčního vzorku gDNA a viabilních sortovaných buněk CCRF-CEM.
4. Provést izolaci DNA a celogenomovou amplifikaci na vybraných pacientských vzorcích.
5. Ověřit pomocí microarray metody přítomnost nádorově specifických chromozomálních aberace ve vybraných CTCs.

# 2 Teoretická část

## 2.1 Anatomická stavba tlustého střeva a konečníku

Tlusté střevo (*Intestinum crassum*) představuje poslední úsek trávící trubice dosahující délky 1,2–1,5 m a průměru 7–8 cm, který se směrem ke konečníku (*rectum)* postupně zmenšuje. V této části střeva je přijímán kašovitý obsah z tenkého střeva, jenž je dále zahušťován a zpracováván ve stolici. Na procesech formování střevního obsahu ve stolici hnilobnými a kvasnými procesy se podílí i mikroorganismy, jež jsou stálou součástí střevního obsahu (Hudák, Kachlík a kol., 2015).

Tlusté střevo (Obr. 1) začíná v pravé jámě kyčelní vakovitým rozšířením slepého střeva (*caecum)* s napojeným, slepě zakončeným červovitým výběžkem (*appendix vermiformis*). Dále stoupá kraniálně jako vzestupný tračník (*colon ascendens*) a pod játry přechází pravým tračníkovým ohbím do příčného tračníku (*colon transversum*). Příčný tračník vytváří pod slezinou levé tračníkové ohbí, z nějž směřuje dolů po levé straně břišní dutiny jako tračník sestupný (*colon descendens*). Tračník sestupný vyúsťuje do malé pánve, kde se stáčí v oddíl zvaný esovitý tračník (*colon sigmoideum*). Posledním úsekem střeva je konečník (*rectum*), které je ukončeno řitním kanálem (*canalis analis*) (Krška a kol., 2021).




*Obr. 1:* Vyobrazení jednotlivých částí tlustého střeva (překresleno pomocí aplikace Biorender podle Hudák, Kachlík a kol., 2015).

Histologická stavba stěny tlustého střeva odpovídá obecnému schématu trávící trubice. Je složena ze čtyř vrstev: sliznice, podslizničního vaziva, svaloviny a serózy tlustého střeva. Sliznice (*tunica mucosa*) je kryta jednovrstevným cylindrickým epitelem, nenese klky a je tvořena četnou lymfatickou tkání s maximem v céku (apendixu). V epitelu sliznice a žlázách tlustého střeva se vyskytuje více druhů buněk jako jsou enterocyty, hlenotvorné pohárkové buňky a četné žlázky (Lieberkühnovy žlázky). Další vrstvou je řídké podslizniční vazivo tvořené lymfatickou tkání a plexus submucosus. Pod podslizničním vazivem je svalovina tvořená z vnitřní cirkulární a zevní podélné svalové vrstvy. Vnější vrstvou stěny tlustého střeva je peritoneální povlak zvaný seróza, který vybíhá v povrchové výběžky (*appendices epiploicae*) (Čihák, 2019; Krška a kol., 2021).

## 2.2 Kolorektální karcinom

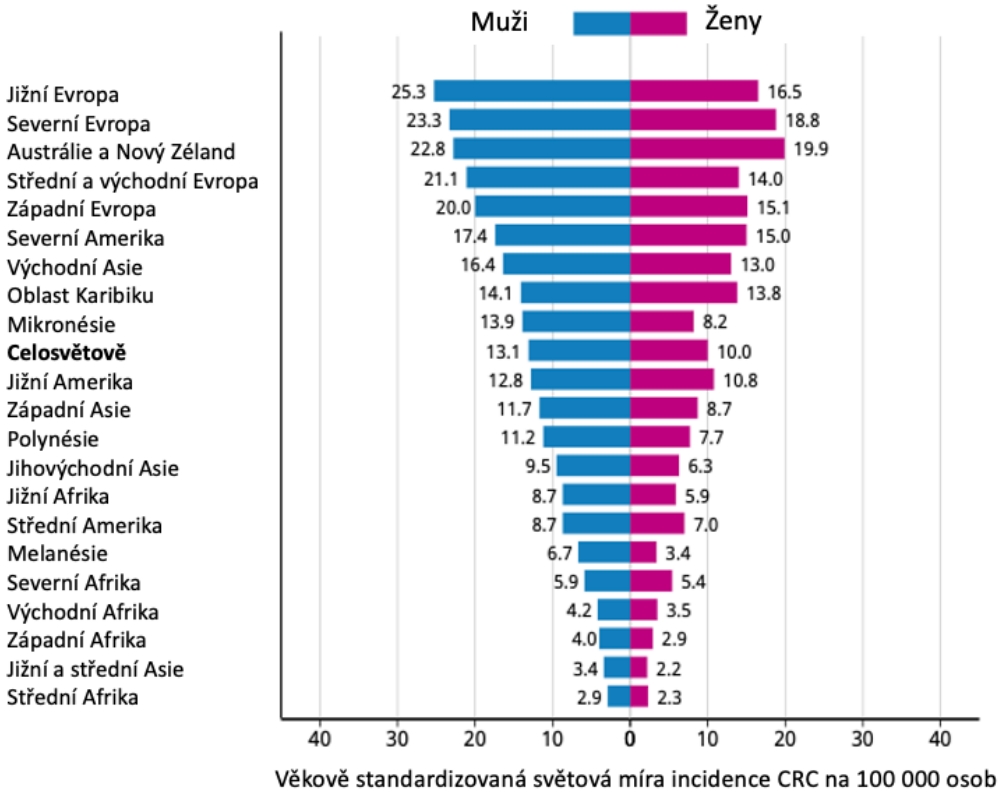
Kolorektální karcinom je nejčastějším zhoubným onemocněním trávícího ústrojí. K jeho vzniku dochází benigní proliferací slizničních epiteliálních buněk do výrůstků tzv. adenomových polypů, které vystýlají tlusté střevo. Malignizací adenomu vzniká karcinom, z nějž se oddělují nádorové buňky, které pronikají do krevního či lymfatického systému a jsou roznášeny do okolních orgánů (Rawla a kol., 2019). Ve vyspělých zemích se jedná se o třetí nejčastěji diagnostikovaný maligní novotvar u mužů a druhý nejčastější u žen (převzato z https://gco.iarc.fr/today). V České republice je tato malignita druhým nejběžnějším nádorovým onemocněním nejen u žen (bezprostředně po karcinomu prsu), ale dokonce zaujímá druhou příčku ve frekvenci diagnostikovaných případů i u mužů, a to hned po karcinomu prostaty (dostupné z www.svod.cz). Celosvětově na následky tohoto onemocnění zemře zhruba 935 000 pacientů ročně, což z onemocnění činí druhou nejčastější příčinu úmrtí způsobenou v důsledku nádorového bujení (převzato z https://gco.iarc.fr/today).

### 2.2.1 Epidemiologie onemocnění

Okolo konce 19.století byl výskyt kolorektálních malignit relativně neobvyklým jevem. Počátkem 20. století začala incidence CRC strmě stoupat, a to zejména s výrazným socioekonomickým rozvojem zemí a se změnou životního stylu populace (Keum & Giovannucci, 2017). Dnes je kolorektální karcinom po rakovině prsu a plic třetí nejčastější příčinou morbidity související s rakovinou. Podle dat GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) bylo v roce 2020 celosvětově potvrzeno zhruba 19,3 milionů pacientů postižených nádorovým onemocněním, z nichž téměř 10 milionů na následky onemocnění

zemřelo. Z celkové mortality pak podle poskytnutých dat náleželo zhruba 10 % nádorům tlustého střeva a konečníku (převzato z https://gco.iarc.fr/today).

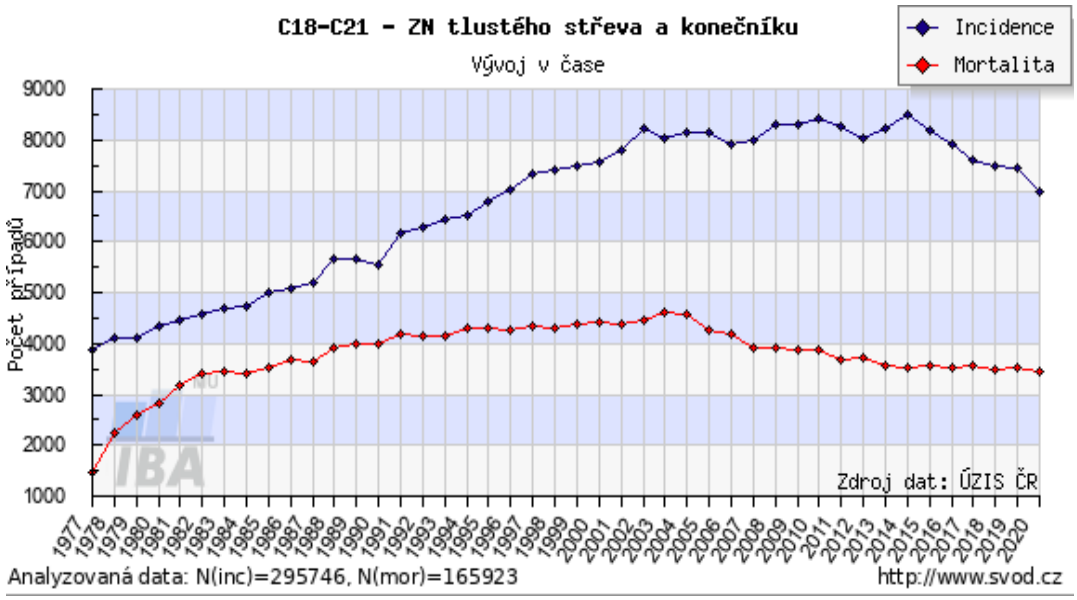
Výskyt CRC je velmi variabilní v závislosti na regionu. Nejvyšší incidenci onemocnění jsou vystaveny vyspělé země zejména Austrálie, Nový Zéland, Japonsko, většina států Evropy a Severní Ameriky. Naopak v méně rozvinutých zemích Afriky, Asie (vyjma Japonska), Latinské Ameriky, Karibiku, Melanésie, Mikronésie a Polynésie je incidence značně nižší (Obr. 2) (Keum & Giovannucci, 2017).




*Obr. 2:* Přehled celosvětové míry incidence kolorektálního karcinomu u mužů a žen podle dat GLOBOCAN z roku 2020 (Graf převzat a upraven ze stránky https://gco.iarc.fr/today).

Česká republika je z hlediska incidence CRC srovnatelná s průměrem dalších evropských zemí, ale v celosvětovém měřítku je nadprůměrná. Zátěž populace tímto onemocněním je v České republice vysoká a kolorektální karcinom je ročně diagnostikován zhruba 7700 lidem, z čehož zhruba 3400 v následku onemocnění umírá (Obr. 3) (převzato z www.svod.cz; www.kolorektum.cz). Vyšší incidence onemocnění je v České republice totožně jako v celosvětovém měřítku potvrzena u mužského pohlaví. Podle posledních dat webového portálu www.svod.cz z roku 2020 uvádějí zhruba 4077 potvrzených případů u mužů a 2893 případů u žen (převzato z www.svod.cz).

Ačkoliv je celosvětově zátěž populace tímto onemocnění stále velmi vysoká, díky nedávným pokrokům ve screeningu a časné detekci onemocnění lze ve vyspělých zemích sledovat trend postupného snižování mortality až o 1 % ročně, a to i navzdory rostoucí incidenci (Venugopal & Carethers, 2022).




*Obr. 3:* Incidence a mortalita u pacientů s kolorektálním karcinomem v České republice v letech 1977–2020 (Obrázek převzat z webové stránky https://svod.cz).

### 2.2.2 Klasifikace onemocnění

K náležitému posouzení vlastností primárního nádoru a k zahájení účinné léčby je nezbytné nádorové onemocnění správně klasifikovat. Pro charakteristiku kolorektálního karcinomu byly vyvinuty důmyslné klasifikační systémy, z nichž v klinické praxi se nejčastěji přistupuje k tzv. TNM klasifikačnímu systému nebo méně k Dukesově klasifikaci. Tyto klasifikační systémy hrají klíčovou roli v umožnění predikce přežití, volbě vhodné terapie a k vyhodnocení dosažených léčebných výsledků (Rosen & Sapra, 2021).

**TNM klasifikační systém**

TNM je ucelený klasifikační systém hojně využívaný ke stanovení rozsahu primárního nádoru (T–tumor), k popisu postižení regionálních lymfatických uzlin (N–nodes) a k potvrzení přítomnosti vzdálených metastáz (M–metastasis) primárního nádoru. Díky tomuto klasifikačnímu nástroji je možné provádět tzv. „staging“, tedy určení rozsahu nádoru, a to na základě jeho invaze do jednotlivých vrstev stěny tlustého střeva (Tab. 1) (Rosen & Sapra, 2021).

*Tab. 1:* TNM klasifikace pro vyhodnocení stádia kolorektálního karcinomu (přepracováno podle Lipská, 2009; Jablonská, 2000).

| **Primární tumor (T)** | |
|---|---|
| **Tx** | Primární nádor nemůže být vyloučen |
| **T0** | Primární nádor nenalezen |
| **Tis** | In situ karcinom – neprorůstá mukózu |
| **T1** | Invaze nádoru přes muscularis mucosae do submukózy |
| **T2** | Invaze nádoru do muscularis propria |
| **T3** | Invaze nádoru skrze muscularis propria do subserózy nebo do perikolické či perirektální tkáně |
| **T4** | Prorůstání nádoru viscerálním peritoneem a/nebo do dalších orgánů a struktur |
| **Postižení regionálních lymfatických uzlin (N)** | |
| **Nx** | Malé množství tkáně |
| **N0** | Bez metastáz v regionálních uzlinách |
| **N1** | 1–3 metastázy v perikolických nebo perirektálních lymfatických uzlinách |
| **N2** | Metastázy ve 4 nebo více perikolických nebo perirektálních lymfatických uzlinách |
| **Vzdálené metastázy (M)** | |
| **Mx** | Přítomnost vzdálených metastáz nemůže být posouzena |
| **M0** | Vzdálené metastázy nejsou přítomny |
| **M1** | Vzdálené metastázy jsou prokázány |

### Dukesova klasifikace

Tento stagingový systém je jedním z nejstarších užívaných systémů u kolorektálního karcinomu. Tato klasifikace vychází z histologického vyšetření karcinomu v resekovaném střevě (Holubec a kol.,2004). Po modifikaci tohoto systému, která byla provedena Turnbullem a kol. v roce 1967, se pacienti řadí do 4 skupin A–D (Tab. 2) v závislosti na hloubce invaze nádoru jednotlivými vrstvami sliznice tlustého střeva (Turnbull a kol., 1967). Kvůli určitým nedostatkům Dukesovy klasifikace je považována za obsoletní a je doporučováno klasifikovat dle TNM (Zavoral a kol., 2013).

*Tab. 2:* Korelace mezi stádii dle UICC, TNM a Dukesovou klasifikací (převzato z Holubec a kol.,2004).

| **Stádium podle UICC** | **TNM klasifikace** | | | **Dukesova klasifikace** |
|---|---|---|---|---|
| **0** | Tis | N0 | M0 | – |
| **I** | T1 | N0 | M0 | A |
| | T2 | N0 | M0 | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **II** | T3 | N0 | M0 | B |
| | T4 | N0 | M0 | |
| **III** | Tx | N1–2 | M0 | C |
| **IV** | Tx | Nx | M1 | D |

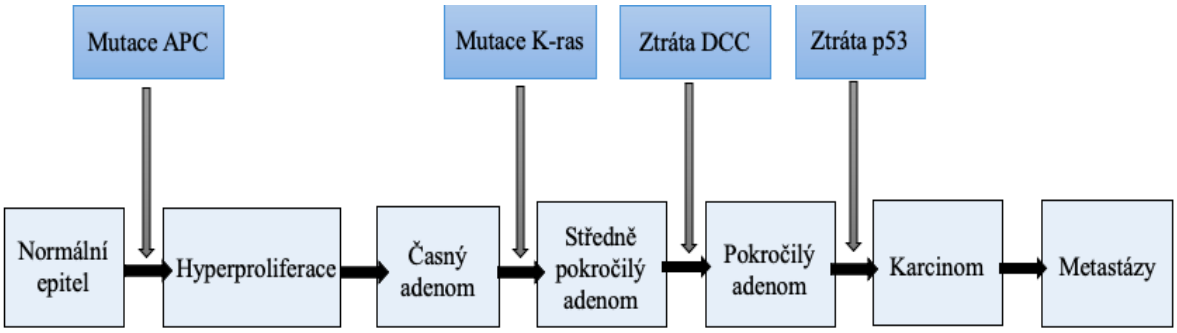
**Grading**

V rámci charakterizace kolorektálního karcinomu, ale i ostatních nádorů se společně s TNM klasifikací provádí tzv. „grading“ neboli určení stupně malignity na základě diferenciace nádorových buněk. Zpravidla jsou uváděny čtyři stupně diferenciace, přičemž o nejnižší stupeň se jedná v případě, že mají buňky nádoru relativně obvyklý tvar, a tedy jsou i dobře diferencované. Naopak neoplazie vyššího stupně malignity disponují abnormálně tvarovanými buňkami, což vypovídá o jejich špatné diferenciaci (Rosen & Sapra, 2021).

### 2.2.3 Molekulárně-genetické vlastnosti onemocnění

Z genetického hlediska rozdělujeme formy kolorektálního karcinomu podle původu mutace na hereditární, familiární a sporadické. Pro sporadickou formu CRC jsou typické bodové mutace v jednotlivých somatických buňkách, které se objevují až v průběhu života a pro jejich přeměnu v nádorovou buňku musí dojít k mutaci obou alel. Naopak hereditární forma CRC je způsobena vysoce penetrantní mutací v zárodečné buňce, která ovlivní jednu z alel mutovaného genu a je přítomna ve všech buňkách jedince. K transformaci na nádorovou buňku pak zbývá pouze mutagenní zásah ve zbývající druhé alele (Mármol a kol., 2017). Skupina karcinomů s familiárním výskytem se projevuje zvýšenou kumulací CRC u příbuzných jedinců způsobenou pravděpodobně vystavením se specifickým, negenetickým, rizikovým faktorům v kombinaci s vícečetnými mutacemi s nízkou penetrancí (Slabý a kol., 2015).

Průlomem v chápání etiologie kolorektální tumorigeneze bylo sestavení vícestupňového genetického modelu (Obr. 4) vědci Vogelsteinem a Fearonem znázorňující defektní změny v onkogenech a tumorových supresorech, které prokazatelně korelují s progresí karcinomu tlustého střeva a konečníku (Fearon & Vogelstein, 1990). Mutace ve výše zmíněných genech jsou součástí dráhy chromozomální nestability (CIN) a jejich objev zprostředkoval základ pro molekulární klasifikaci kolorektální karcinogeneze.

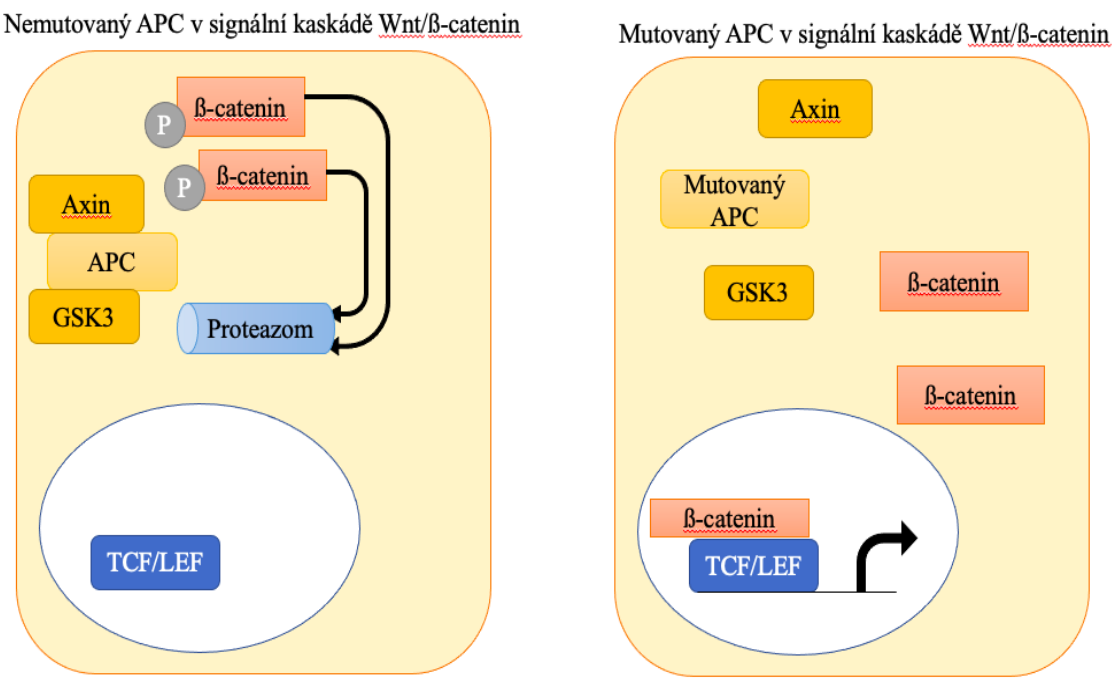



*Obr. 4:* Model dle Vogelsteina a Fearona (publikovaný v roce 1990), který znázorňuje korelaci mutací ve čtyřech genech se stádiem sekvenční linie adenom–karcinom, což je základní princip vývoje kolorektálního karcinomu (Obrázek překreslen a zjednodušen podle Ihnáta, 2021).

V současnosti je však jasné, že je kolorektální karcinom heterogenním onemocněním a k rozvoji karcinomatózní tkáně může docházet i jinými molekulárními mechanismy jako například dráhou mikrosatelitní nestability navozenou mutací genu pro opravu chybného párování DNA nebo fenotypovou dráhou CpG methylátoru (Harrison & Benzinger, 2011).

**Dráha chromozomální nestability (CIN)**

Za původem až 85 % případů CRC stojí chromozomální instabilita, jež se vyznačuje akumulací numerických nebo strukturálních chromozomálních abnormalit. V časných stádiích onemocnění (Obr. 4) je navození chromozomální nestability důsledkem narušení kontrolních bodů replikace DNA a mitotického vřeténka, což vyúsťuje ve vymanění se z přirozené regulace buněčného cyklu v buňkách kolorektální sliznice. Narušení regulace může být vyvoláno mutacemi genu *Adenomatous polyposis coli* (*APC*) lokalizovaném na dlouhém raménku chromozomu 5q21. Mutace genu se projeví předčasným vznikem stop kodonu, posunem čtecího rámce a zkracováním výsledného proteinu APC, jež v buňce plní funkci nádorového supresoru v signální dráze Wnt/ β-catenin (Obr. 5). V této signalizační kaskádě zaujímá protein APC nezastupitelnou roli, neboť spolu s Axinem a GSK3 formuje komplex, který udržuje v normě hladinu cytoplazmatického β-cateninu prostřednictvím jeho fosforylace, ubikvitinace a proteozomální degradace. V případě mutované formy *APC* je degradace β-cateninu snížena na minimum a nefosforylovaný β-catenin se translokuje do jádra. Nukleární β-catenin svou nepřetržitou aktivitou v řízení transkripce genů jako kupříkladu DNA vazebného transkripčního faktoru rodiny LEF/TCF narušuje regulaci kontrolních mechanismů buňky a aktivuje transkripci onkogenu *MYC*, což významně podporuje invazivitu a růst tumoru.




*Obr. 5:* Vlevo je vyobrazena dráha Wnt/β-catenin v případě, že gen APC nebyl mutován. V tomto případě se dochází k vytvoření komplexu Axin/ APC/ GSK3 a následné fosforylaci β-cateninu, který je posléze degradován v proteazomu a tím je permanentně snižována jeho hladina. Naopak vpravo je situace po mutaci genu APC, v jejímž důsledku nevzniká komplex Axin/APC/GSK3 a nefosforylovaný β-catenin se translokuje do jádra (na obrázku znázorněno bíle), kde interaguje s TCF/LEF, čímž je narušována regulace kontrolních mechanismů. (Obrázek je překreslen a upraven podle Logan & Nusse, 2004).

Následkem germinální mutace v nádorovém supresoru *APC* se u lidí rozvíjí hereditární onemocnění zvané familiární adenomatózní polypóza (FAP). Toto onemocnění s autozomálně dominantní dědičností se klinicky projevuje vznikem stovek až tisíců adenomových polypů, z nichž je vysoké procento schopno rozvinout se v adenokarcinom (Worthley & Leggett, 2010).

V pokročilejších stádiích (Obr. 4) vývoje adenomu může dojít k další významné mutaci, a to genu *K-ras*, který se nachází na krátkém raménku 12.chromozomu (12p12). Protein K-ras, často taktéž uváděný pod označením p21, je řazen do rodiny proteinů Ras a původně byl identifikován jako homolog virového onkogenu Kirstenova potkaního sarkomu. Podstatou tohoto membránově ukotveného enzymu je svojí GTPázovou aktivitou hydrolyzovat aktivní GTP na inaktivní GDP, čímž se podílí na transdukci intracelulárního signálu a aktivaci signalizace EGFR. V okamžiku, kdy je gen *K-ras* postižen mutací, (nejčastěji bodovou substitucí v kodonech 12, 13 a 64) se proteiny K-Ras hromadí v aktivní formě navázané na GTP. Důsledkem je konstitutivně aktivní stav a aktivace proliferativních

signálních drah. Mezi genové cíle K-ras náleží cyklin D1, DNA-methyltransferázy a VEGF. (Lipská, 2009; Tan a kol., 2012). V neposlední řadě byly v pozdních stádiích vývoje adenomu zaznamenány i ztráty alel na chromozomu 18q21, na kterém jsou umístěny i gen *DCC*, *SMAD2* a *SMAD4*. Poslední dva zmíněné se podílejí na signální dráze TGF-β zapojenou do regulace růstu a apoptózy (Worthley & Leggett, 2010).

Ve fázi přechodu z adenomu na adenokarcinom (Obr. 4) může docházet i k poškození v genu p53, který je známý jako „strážce genomu“ a to především díky jeho schopnosti pozastavit buněčný cyklus ve fázi G1 a poskytnout tak buňce dostatek času na opravu DNA, při závažnějších poškozeních dokonce navodit programovanou buněčnou smrt.

**Mikrosatelitní instabilita (MSI)**

Mikrosatelitní instabilita se vyznačuje abnormálně zvýšeným či sníženým počtem krátkých repetičních jednotek v jednoduchých mikrosatelitních sekvencích DNA. K rozvoji MSI dochází selháním reparačního systému Mismatch repair (MMR), pro jehož bezchybnou činnost je důležitá funkčnost nejméně 4 opravných genů – *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS2* specificky se spojujících za vzniku funkčních heterodimerů. Podstatou MMR je kontrolovat správnost replikace DNA a v případě vzniku drobných inzercí či delecí tyto nukleotidové záměny v sekvenci opravit. Zárodečná mutace v některém z těchto opravných genů vyústí nejen v nahromadění somatických mutací, nýbrž i ve změnu v sekvenci mikrosatelitů a vzniku MSI.

Defekt MMR systému je příčinou rozvoje Lynchova syndromu neboli Hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC). Podobně jako FAP se HNPCC dědí autozomálně dominantním způsobem, s tím rozdílem, že HNPCC zahrnuje vývoj pouze jednotlivých kolorektálních adenomů či karcinomů, klinicky prakticky nerozeznatelných od sporadických nádorů. U většiny případů Lynchova syndromu byla zaznamenána přítomnost MSI, jež může sloužit jako predikční marker mutací v MMR, avšak je nutno brát v potaz, že absence MSI nevylučuje přítomnost HNPCC (Vyzula & Žaloudník, 2007; Lipská, 2009). Kromě dědičné formy nádoru může k chybám v MMR systému docházet i u sporadických karcinomů kolorekta, a to zejména ke ztrátě funkce *hMLH1*. Příčinou této ztráty funkce je obvykle hypermethylace promotoru *hMLH1* v nádorové tkáni zapříčiněná mutacemi v genu *BRAF*, zejména mutací V600E (Steinke a kol., 2013).

**Fenotypová dráha CpG methylátoru (CIMP)**

CIMP dráha je zodpovědná za asi 15 % všech sporadických případů CRC, což z ní činí druhou nejběžnější cestu ke vzniku sporadického CRC. Principem této dráhy je navození nestability skrze epigenetické změny v genech. To vyvolá změnu v regulaci jejich genové exprese, aniž by jakkoliv došlo ke změně sekvence DNA genů. Obvykle se jedná o hypermethylaci CpG dinukleotidu v promotorech CpG ostrůvkových lokusů vedoucí k epigenetické inaktivaci tumorsupresorových genů (Worthley & Leggett, 2010). Geny ovlivněné CIMP mají v buňce většinou velmi důležitou funkci, např. gen *CDKN2A* je gen kódující nádorový supresor p16 nebo *hMLH1* plnící v buňce úlohu genu pro opravu chybného párování bází (Mojarad a kol., 2013). I přesto, že CIMP v mnohých ohledech sdílí charakteristiky CIN a MSI, je nutno zmínit, že se značně odlišuje histologickými rysy, zejména v premaligní lézi. U CRC vyvíjejících se cestou CIMP je pozorován obzvláště tzv. přisedlý vroubkovaný adenom a stopkatý vroubkovaný adenom, které histologicky odpovídají adenomům s morfologickými rysy hyperplastických polypů (Rhee a kol., 2017; Lipská, 2009).

### 2.2.4 Symptomy a diagnostika onemocnění

Symptomatologie závisí na lokalizaci nádoru ve střevě a též na jeho rozsahu. Obecně se však za klinicky nejvýznamnější symptomy rozvíjejícího se nádoru tlustého střeva a konečníku považují obtíže jako krvácení, změny ve vyprazdňování, bolesti v oblasti dolního gastrointestinálního traktu, bezdůvodný úbytek hmotnosti a anémie z nedostatku železa. Kromě výše zmíněných příznaků však mohou pacienti čelit i jiným obtížím jako je ztráta chuti k jídlu, plynatost, nevolnost, zvracení a únava (Mello a kol., 2020; Büchler a kol., 2017). Drtivá většina výše zmíněných symptomů suspektních na CRC se však běžně vyskytuje i u benigních gastrointestinálních onemocnění, což vede k jejich banalizaci pacientem, a tedy i k pozdní diagnostice onemocnění (Astin a kol., 2011). Časné odhalení onemocnění komplikuje i skutečnost, že většina pacientů je v časném stádiu asymptomatických a klinická manifestace je způsobena až pokročilým karcinomem (Jablonská, 2000).

Vývoj nádoru tlustého střeva doprovází série histologických, morfologických a genetických změn, jichž se využívá při screeningu a diagnostice. Současná onkologická diagnostika klade důraz na brzké rozpoznání novotvarů, a to i v asymptomatickém nebo prekancerózním stádiu. Nynějším zlatým standardem diagnostiky kolorektálního karcinomu

je kolonoskopie. Hlavním přínosem tohoto instrumentálního vyšetření je vizualizace celého tračníku a rekta a možnost provést biopsii prekancerózní nebo nádorové léze během vyšetření. Naopak jako značné nevýhody tohoto přístupu se jeví invazivita a dyskomfort zákroku. Je možné provést neinvazivní diagnostické techniky jako fekální imunohistochemické testování, vyšetření okultního krvácení ve stolici, flexibilní sigmoidoskopii nebo CT kolonoskopii, čímž je pacientovi poskytnuto větší pohodlí. Použití těchto metod v praxi je však zatíženo vysokou mírou falešně pozitivních výsledků (Yuan a kol., 2022; Büchler a kol., 2017).

Nelze opomenout ani moderní metodu známou pod pojmem tekutá biopsie. Jde o prakticky neinvazivní přístup analýzy cirkulujících nádorových markerů v krvi nebo jiných tělesných tekutinách. Nejenže poskytuje vyšší komfort pacientům, ale rovněž skýtá lepší pohled na heterogenitu nádoru a na sledování vývoje onemocnění v reálném čase (Poulet a kol., 2019). V současnosti jde o zcela nový přístup s nadějnou aplikační perspektivou, který je objektem zájmu mnoha studií včetně této diplomové práce.

### 2.2.5 Rizikové faktory a prevence

Existuje mnoho prokazatelných individuálních vlastností nebo návyků, které jsou považovány za rizikové faktory vzniku kolorektálního karcinomu. První skupina rizikových faktorů je člověkem neovlivnitelná a spadá pod ni například zvyšující se věk pacienta. Že se skutečně jedná o riziko dokazuje i fakt, že 90 % nově diagnostikovaných pacientů již překročilo věkovou hranici 50 let. U člověka staršího 65 let je pravděpodobnost, že mu bude diagnostikována kolorektální neoplazie třikrát vyšší ve srovnání s člověkem ve věkovém rozmezí 50–64 let, a dokonce třicetkrát vyšší ve srovnání s člověkem, který dosud nedosáhl 50 let (Sawicki a kol., 2021). Významný vliv na rozvoj onemocnění má i pohlaví, přičemž vyšší incidence je připisována mužům, u kterých jde v desíti zemích světa dokonce o nejčastěji diagnostikované rakovinné onemocnění (Rawla a kol., 2019). Kromě věku a pohlaví se mezi neovlivnitelné rizikové faktory řadí i osobní a familiární anamnéza. Vyššímu riziku jsou vystaveni zejména jedinci mající příbuzenstvo s pozitivní anamnézou na CRC nebo jedinci trpící některým z chronických zánětlivých onemocnění střev.

Význačnou roli v prudkém nárůstu incidence onemocnění zaujímají i ovlivnitelné rizikové faktory, a to obzvláště stravovací návyky (vysoký příjem červeného a zpracovaného masa), fyzická nečinnost, nadměrná konzumace alkoholu, kouření cigaret, obezita a s ní spojené metabolické důsledky (Johnson a kol., 2013).

Základním kamenem primární prevence, jejímž účelem je snížení incidence CRC a zlepšení veřejného zdraví je zahájení diety bohaté na obsah vlákniny, zvýšení fyzické aktivity, snížení konzumace alkoholu, omezení kouření tabáku a stresu. Doporučenou strategií sekundární prevence je provádět preventivní screeningové vyšetření, které se doporučuje zahájit u všech dospělých starších 50 let nebo dříve u jedinců s pozitivní osobní či rodinnou anamnézou (Brenner & Chen, 2018).

### 2.2.6 Možnosti léčby

Díky rozsáhlému výzkumu a zavedením preventivních screeningových programů se výrazně podařilo snížit mortalitu onemocnění. Navzdory těmto zlepšením je stále téměř čtvrtina případů CRC diagnostikována v pokročilých stádiích s vyvinutými metastázami, typicky v játrech a plicích. Účelem léčby je dosáhnout maximálního zmenšení až odstranění nádoru a potlačit jeho další růst a šíření. Pro docílení maximální redukce a stabilizace nádoru se zpravidla přistupuje k jeho úplné chirurgické resekci často v kombinaci s multimodálními léčebnými strategiemi jako chemoterapií a radioterapií (Xie a kol., 2020).

**Chemoterapie**

Pokrokem v protinádorové léčbě CRC bylo zavedení cytotoxických chemoterapeutik do systémové léčby. Důležitými cytostatiky jsou látky jako oxaliplatina, irinotekan, ale pilířem z hlediska aplikace do klinické praxe jsou fluorpyrimidiny, a to obzvlášť 5-fluorouracil (5-FU). O zapojení tohoto fluorovaného analogu pyrimidinu do standardní léčby se začalo uvažovat zejména pro jeho schopnost inkorporovat se do genetického materiálu nádorové buňky rychleji než do nukleové kyseliny normální buňky. 5-FU vstupuje do buňky stejným transportním mechanismem jako uracil a v intracelulárním prostoru bývá metabolizován na látky jako fluorodeoxyuridinmonofosfát, fluorodeoxyuridintrifosfát a fluorouridintrifosfát. Tyto metabolity se poté chybně inkorporují do vlákna RNA nebo DNA za současné inhibice enzymu thymidylátsyntetázy. Reakce katalyzované tímto enzymem poskytují thymidylát, který hraje nezastupitelnou roli při replikaci a opravách DNA. Pro potencování maximální účinnosti se k 5-FU přidávají redukované foláty, nejčastěji leukovorin (LV). LV je derivátem kyseliny folinové a zvyšuje cytotoxické účinky 5-FU v rakovinných buněčných liniích inhibicí produkce thymidylátsyntázy. Vedle kontinuální aplikace 5-FU s LV se při léčbě CRC často přistupuje i k současné aplikaci oxaliplatiny (FOLFOX).

Vedle protirakovinné aktivity byla však u 5-fluorouracilu zaznamenána i řada nežádoucích účinků jako neurotoxicita, kardiotoxicita, nauzea, dermatologické problémy, alopecie, hematopoetická deprese a další. Kromě vedlejších účinků se tato léčebná strategie potýká i s problémem chemorezistence kolorektálního karcinomu vůči těmto cytostatikům (McQuade a kol., 2017).

**Radioterapie**

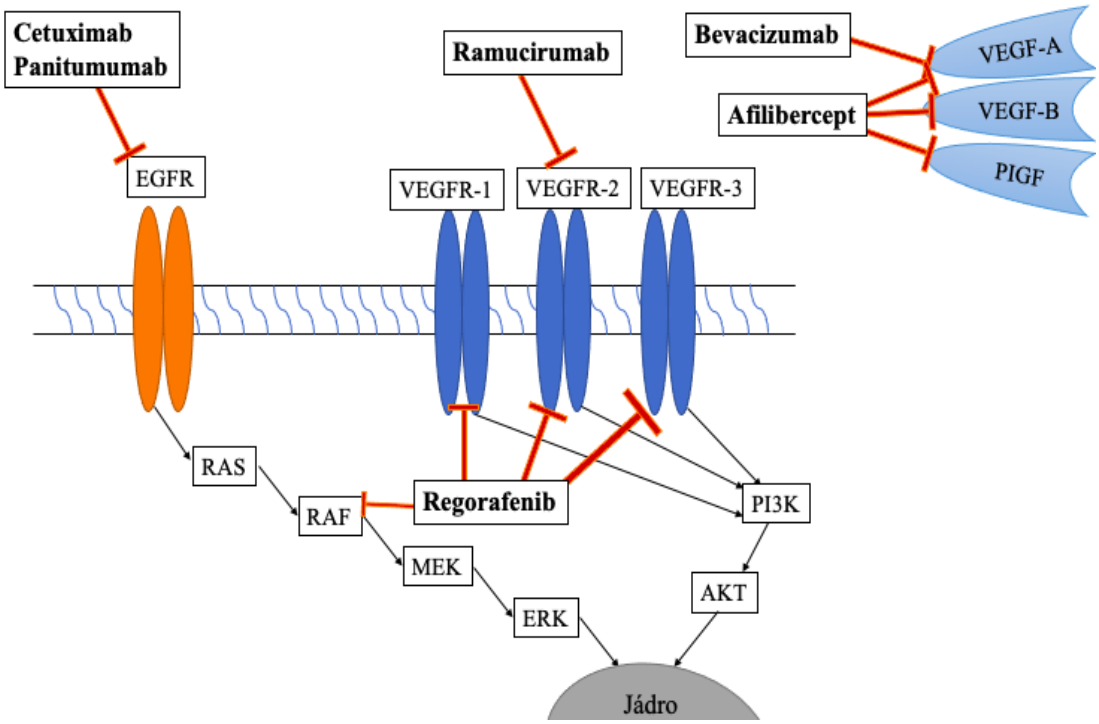
Radioterapie je vedle chirurgického zákroku základním kamenem léčby zejména u rakoviny rekta. Principiálně je založena na dodání vysoké dávky ionizační energie do nádorové tkáně, což vede k letálnímu narušení struktur zasažených buněk. Vzhledem ke stavu pacienta může být prováděna několika způsoby: předoperačně, intraoperačně, pooperačně, ale i zcela samostatně, a to zejména u pacientů neschopných podstoupit chirurgický výkon. Předoperační externí radioterapie je využívána zejména u inoperabilních nádorů a jejím cílem je navodit sekundární operabilitu nádoru. Pooperační externí radioterapie je využívána zejména pokud je při chirurgické resekci zjištěn větší rozsah nádoru, než bylo původně předpokládáno. Významným omezením před i pooperační radioterapie je nemožnost aplikovat vyšší dávku radiačního záření kvůli toxicitě pro okolní tkáně (Lipská, 2009; Adam a kol., 2010).

Jako cenný přístup při léčbě karcinomu rekta se osvědčilo zavedení intraoperační radioterapie (IORT), tedy ozařování lůžka nádoru přímo během chirurgického výkonu. Velkým pozitivem aplikace adjuvantní IORT je přímé a specifické zacílení vysokých dávek záření do oblastí s vysokým potenciálem recidivy za současného odstínění radiosenzitivních struktur. Využití metody v klinické praxi se však potýká s problémy jako je ekonomická náročnost techniky, ale i s organizačními a technickými problémy (Mirnezami a kol., 2013; Ihnát, 2021).

**Cílená terapie**

Cílená terapie je termínem pro aplikaci malých molekul, zejména monoklonálních protilátek nebo tyrosinkinázových inhibitorů, které jsou zaměřené na inhibici signálních drah zprostředkovávajících iniciaci, progresi a migraci nádorových buněk. Podle článku Yuan-Hong Xieho a kolektivu z roku 2020 je prozatím pro léčbu CRC k dispozici devět cílených terapií, které jsou schváleny orgány FDA a EMA: cetuximab, panitumumab, bevacizumab, ramucirumab, regorafinib, ziv-aflibercept, pembrolizumab, nivolumab a ipilimumab (Obr. 6) (Xie a kol., 2020).

Zejména monoklonální protilátky cetuximab a panitumumab nachází velké využití, protože nadprodukce EGFR je detekována až u 85 % nádorů tlustého střeva a konečníku. Jejich inhibičním působením na EGFR receptor je pozastavena buněčná proliferace a nádorové buňky jsou nuceny spustit programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Také účinky rekombinantní humanizované protilátky bevacizumabu se v léčbě projevily jako velmi efektivní a v kombinaci s chemoterapií zlepšují medián přežití o 4–5 měsíců. Bevacizumab působí na VEGF-A, což je významný regulátor angiogeneze (Adam a kol., 2010). Ve schématu nevyobrazené protilátky pembrolizumab, nivolumab a ipilimumab působí jako cílená terapie imunitního kontrolního bodu, jejímž úkolem je potlačit pokus nádorových buněk uniknout dohledu T lymfocytů (Xie a kol., 2020).




*Obr. 6:* Molekulární cíle vybraných monoklonálních protilátek (v obrázku uvedeny tučně) schválených FDA a EMA v nádorové buňce (překresleno podle Seeber & Gastl, 2016).

## 2.3 Cirkulující nádorové buňky

Úmrtí většiny pacientů s rakovinou tlustého střeva a konečníku bývá zřídkakdy způsobeno samotným primárním nádorem. Častěji dochází k úmrtí pacienta v důsledku zasažení jiných životně důležitých orgánů sekundárním nádorovým ložiskem neboli metastázou. Na vzniku takového metastatického ložiska se podílí buňky se schopností uvolnit se z primárního mikroprostředí a volně se šířit cévním řečištěm za potenciálním metastatickým místem. Tyto buňky se označují jako cirkulující nádorové buňky (CTC). O jejich existenci se poprvé

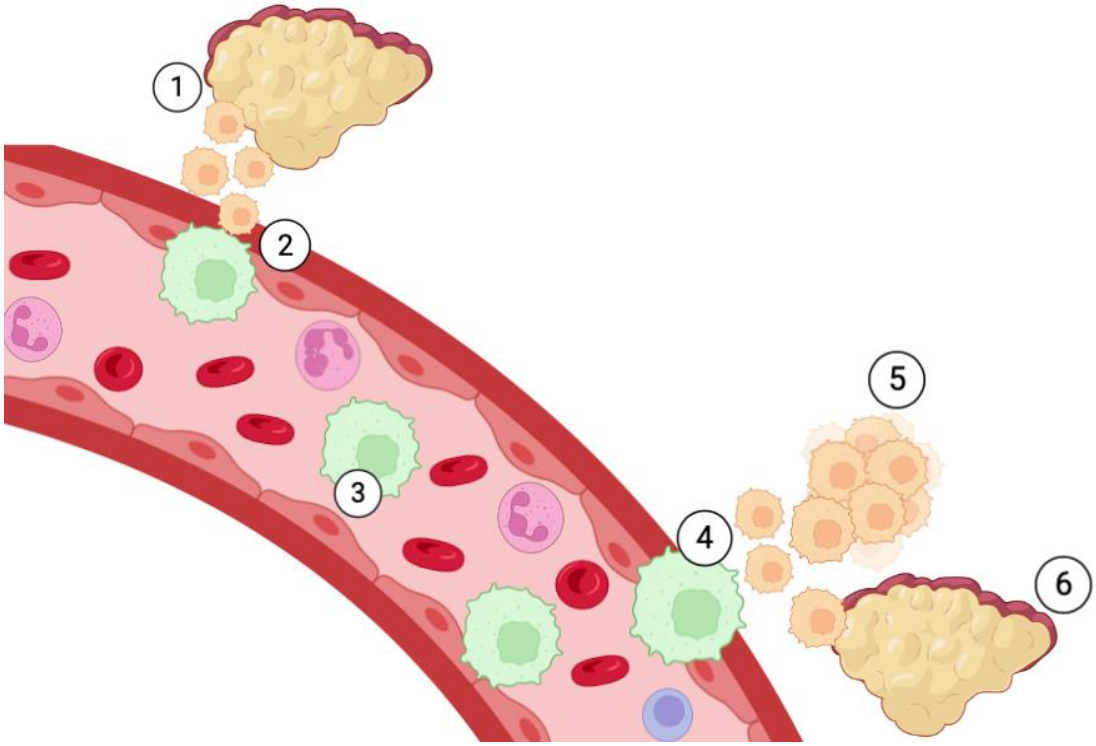
zmiňuje v roce 1869 lékař Thomas Ashworth, který provedl pitvu pacienta se sarkomem hrudníku. V krevním řečišti pacienta pozoroval cirkulující buňky, které se svým tvarem, velikostí a vzhledem shodovaly s buňkami primární léze. Zásluhou Ashworthova průlomového objevu se podařilo pozdějšími studiemi potvrdit, že oběhová soustava je základní cestou transportu cirkulujících nádorových buněk, a že jsou CTC jedním z hybatelů v procesu tvorby metastáz (Chinen, 2021). Tyto buňky jsou krví unášeny jednak samostatně nebo se ojediněle shlukují do tzv. CTC klastrů. Takové shluky představující konglomerát nádorových buněk a dalších typů buněk (krevní destičky, imunitní buňky či fibroblasty) jsou sice mimořádně vzácné, ale byl u nich odhadnut až padesátkrát vyšší metastatický potenciál ve srovnání se samostatně se šířícími CTC (Fabisiewicz & Grzybowska, 2017).

### 2.3.1 Role cirkulujících nádorových buněk v procesu metastázování

Typický maligní nádor obsahuje miliony až miliardy mutantních nádorových buněk. Mutace pohánějí nejen jejich růst, nýbrž i dělení a invazi do lokální tkáně. Značné množství buněk nabývá metastatického charakteru, tedy schopnosti oddělit se od hmoty primárního nádoru, migrovat okolními tkáněmi a vstupovat do krevního řečiště či lymfatického systému. Pouze některé z nich jsou však schopny adaptovat se ve vzdáleném orgánu, kde mohou buď několik let přežívat ve stádiu nádorové dormance nebo proliferovat a vyvinout se v metastázy.

Diseminaci rakovinných buněk do krevního řečiště předchází jejich migrace lokálním mikroprostředím a jejich následný průnik neboli intravazace bazálními membránami a stěnou endotelu. Buňky intravazují jednak pasivní cestou, kdy jsou doslova „vytlačeny“ do krevní cirkulace mechanickými silami, třením a růstem nádoru, ale i aktivní cestou, ke které často využívají tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT). U buněk podstupujících EMT dochází sérií molekulárních změn k reverzibilnímu přechodu z epiteliálního na mezenchymální charakter buňky. To buňce umožňuje být pohyblivější, invazivnější, a navíc být daleko odolnější vůči následným smykovým silám a srážkám s krevními buňkami. Jakmile dojde k uvolnění rakovinných buněk do krevní cirkulace musí se i nadále potýkat s řadou přirozených překážek, které brání metastatickému procesu (Dasgupta a kol., 2017). Mimo výše zmíněné smykové napětí musí také unikat dohledu imunitního systému, čehož CTC u kolorektálního karcinomu dosahují up-regulací CD47, jež je chrání před útokem makrofágů a dendritických buněk. V neposlední řadě musí také CTC předcházet formě programované buněčné smrti zvané anoikis. Za fyziologických podmínek by totiž oddělení buňky od matrice a absence jakékoliv jiné interakce s okolím znamenala

automatické spuštění apoptózy prostřednictvím výše zmíněného procesu anoikis. CTC má však vyvinutý mechanismus rezistence vůči anoikis díky aktivované tropomyosin kináze B (TrkB), která CTC umožňuje přežít v tekuté suspenzi (Joosse a kol., 2015). Ve chvíli, kdy CTC dosahuje optimálního prostředí pro adaptaci, opouští krevní oběh připojením se na endotel a podstupuje transendoteliální migraci. Proces, kterým buňka proniká z krevního oběhu zpět do epitelu se nazývá extravazace (Obr. 7) a po jejím dokončení maligní buňky zpět exprimují epiteliální fenotyp procesem mezenchymálně-epiteliální tranzice (MET), která jim umožňuje pokračovat v kolonizaci a vytvořit metastatický nádor ve vzdáleném orgánu, nejčastěji v kostech, mozku, játrech nebo plicích (Yu a kol., 2011; Joosse a kol., 2015).




*Obr. 7:* Znázornění procesu metastázování nádorových buněk:

(1) Transport nádorových buněk z primární léze okolním mikroprostředím.

(2) Intravazace nádorových buněk do krevního řečiště, tyto buňky mohou podstoupit proces EMT, kdy dochází k přeměně z epiteliální buňky (oranžově značené buňky) na mezenchymální charakter buňky (zeleně značené buňky).

(3) Tranzit CTC (zeleně znázorněné buňky) vaskulaturou

(4) Extravazace buněk v optimálním prostředí, nádorové buňky mohou podstoupit proces MET, kdy dochází k přechodu z mezenchymálních znaků (zeleně značené buňky) na epiteliální znaky (oranžově značené buňky), následně může dojít k více možnostem:

(5) Rakovinná dormance (klidové stádium nádorových buněk)

(6) Rozvoj nové metastatické léze (Obrázek upraven a překreslen podle Dasgupta a kol., 2016 pomocí aplikace Biorender).

### 2.3.2 Metody obohacení nádorových buněk

Kvůli nízké koncentraci buněk karcinomu v krevním řečišti je nutné, aby jejich detekci předcházel krok obohacení, který má za cíl zvýšit citlivost testu. Obohacení je založeno na morfologických aspektech CTC a je tradičně prováděno centrifugací za využití hustotního gradientu. Po odstředění vzorku v centrifuze dochází k rozdělení krevní tekutiny na jednotlivé frakce podle hustoty krevních elementů. Těžší částice jako erytrocyty se usazují na dně zkumavky, naopak plazma setrvává v horní části zkumavky. CTC se pak spolu s leukocyty a trombocyty nachází těsně nad erytrocytární frakcí v tenkém prstenci známém pod označením „buffy coat“.

Pro odlišení krvetvorných a nádorových buněk je možno přistoupit k metodám využívajících jejich fyzikálních rozdílů a sice rozdílné velikosti, ale i náboje nebo migračních vlastností (Man a kol., 2011). Rozdílných velikostí využívá metoda filtrace přes polykarbonátovou membránu. Leukocyty obecně dosahují velikosti okolo 8–11 μm a jsou propouštěny skrze membránu, zatímco nádorové buňky jsou obvykle větší a bývají membránou zadrženy. Filtrace buněk sice zachovává jejich integritu, ale citlivost této metody se jeví být spornou, neboť CTC mohou vykazovat odchylku ve velikosti a být propuštěny filtrem spolu s leukocyty (Gerges a kol., 2010).

Dalším ze způsobů, jak lze technicky náročný požadavek odlišení podobně vyhlížejících populací CTC a běžných leukocytů překonat, je zavedením imunologických postupů založených na vlastnostech protilátek. Nádorové buňky nejenže neexprimují leukocytární antigen CD45, který je běžně přítomný na povrchu bílých krvinek, ale navíc specificky exprimují řadu povrchových antigenů. Díky jejich přítomnosti mohou být buňky odděleny od zbytku krevního obsahu selektivní vazbou protilátky na tento povrchový antigen.

Poněvadž je většina nádorů původem epiteliální, tak se nejužívanějším a prakticky univerzálním antigenem a markerem pro imunomagnetické obohacení nádorových buněk stala adhezní molekula epiteliálních buněk (EpCAM). Především u karcinomů původem z tlustého střeva, prsu, plic a prostaty vykazuje EpCAM zvláště vysoké hladiny exprese (EpCAM+). Přestože zůstává EpCAM nejčastěji využívaným markerem pro selekci CTC a jeho užitečnost byla ověřena řadou studií, správnost výsledků po jeho využití jako biomarkeru má své limitace. V průběhu EMT totiž nabývají buňky mezenchymálních znaků,

a tudíž může dojít k vymizení exprese EpCAM. Postup značně komplikuje rovněž variabilita v genové expresi EpCAM (Keller a kol., 2019; Lin a kol., 2021).

Ačkoliv expresi EpCAM detekujeme u většiny CTC, byla odhalena i existence ojedinělých případů nádorových onemocnění, které mají nízkou hladinu exprese tohoto markeru nebo ho neexprimují vůbec ($EpCAM^{-}$). Takové subpopulace buněk byly potvrzeny kupříkladu u rakovinného onemocnění prostaty a paradoxně byla taková buněčná populace prokázána i u některých podtypů rakoviny prsu. Přítomnost $EpCAM^{-}$ nádorových buněk se jeví být problémem zejména z hlediska jejich detekce, protože většina detekčních metod spoléhá na přítomnost EpCAM+ buněk. Skutečnost, že existují i $EpCAM^{-}$ buňky tedy znamená, že může být falešně podhodnocen reálný počet CTC (Lampignano a kol., 2017).

Rozšířenými biomarkery epiteliálních malignit jsou rovněž cytokeratiny (CK). CK náleží do rodiny intermediárních filamentových proteinů a jejich primární funkcí je poskytovat epiteliálním buňkám ochranu před mechanickým poškozením a neméně důležité jsou taktéž v zajištění pohybu a intracelulární komunikace (Rückert a kol., 2010; Bouchalová a kol., 2016). Z hlediska manipulace se vzorky je značně atraktivní vlastností CK jejich tendence se v intracelulárním prostředí spojovat do relativně stabilních komplexů. Zvýšení jejich stability umožňuje krevní vzorek vystavovat vícenásobným cyklům zmrazení a rozmrazování, aniž by došlo k narušení struktur CK (Linder a kol., 2010). Třebaže využití cytokeratinu jako biomarkeru skýtá řadu výše zmíněných pozitiv, byl nedávnými studiemi prokázán jejich výskyt v mononukleárních buňkách periferní krve i v kostní dřeni zdravých jedinců (Bouchalová a kol., 2016).

### 2.3.3 Metody detekce cirkulujících nádorových buněk

Jakmile je dokončeno obohacení vzorků o cirkulující nádorové buňky, přistupuje se k jejich detekci, izolaci a následné charakterizaci. Díky technologickému rozmachu v posledních letech je již k dispozici široká škála detekčních metod. Hlavním požadavkem, jež by metody měly splňovat, je zachování integrity detekované CTC umožňující následnou molekulární analýzu. Detekční metody se dále odlišují v zapojení kroku obohacení do jejich průběhu. Některé vyžadují, aby byl krok obohacení proveden zcela samostatně, jiné kombinují kroky obohacení s detekcí. Některé dokonce pracují zcela bez obohacení, aby předešly nechtěnému úbytku v počtu CTC.

Je několik způsobů, jak lze detekční metody CTC kategorizovat. V této kapitole budou členěny do dvou hlavních přístupů, a to přímé detekce mikroskopickým

zobrazováním a nepřímé detekce molekulárními přístupy (Tab. 3) (Alunni-Fabbroni & Sandri, 2010).

*Tab. 3:* Přehled vybraných metod detekujících cirkulující nádorové buňky.

| Proces identifikace | Metoda detekce |
|---|---|
| **Cytometrické techniky přímé detekce** | Cell Search<br>EPISPOT<br>CTC čipy<br>FAST<br>CytoTrack CT11™ |
| **Techniky nepřímé detekce na principu PCR** | RT-PCR |

#### 2.3.3.1 Cytometrické techniky přímé detekce cirkulujících nádorových buněk

**Cell Search®**

Poloautomatizovaná platforma CellSearch®, jež dosud jako jediná z metod prošla validací a schválením pro klinické použití americkou vládní agenturou FDA, je jednou z technologií určených k monitoringu vzácné nádorové populace buněk pomocí monoklonální protilátky zacílené na povrchově specifický marker EpCAM. CellSearch® je schválen FDA pro detekci CTCs u pacientů s metastatickým karcinomem tlustého střeva, prsu a prostaty (Tjensvoll a kol., 2014; Wang a kol., 2016).

Podstatou metody je imunomagnetické obohacení EpCAM pozitivních buněk přidáním magnetických ferrofluidních nanočástic navázaných na anti-EpCAM protilátky do 7,5 ml plné krve a následná imunocytochemická identifikace buněk založená na principu jejich značení diferenciálními fluorescenčními protilátkami. Fluorescenční protilátky selektují neporušené jaderné buňky pozitivní na přítomnost CK a vylučují kontaminující bílé krvinky zacílením na jejich leukocytární antigen CD45. Nakonec zaškolený pracovník identifikuje a spočítá všechny buňky vykazující fenotyp EpCAM pozitivní/CK pozitivní/CD45 negativní pomocí automatizovaného fluorescenčního mikroskopu (Adams a kol., 2015; Beije a kol., 2015). Ač vykazuje systém CellSearch® vysokou reprodukovatelnost a využitelnost ve výzkumu nádorových nemocí, stále je považován za relativně hrubý nástroj měření pro jeho nižší detekční limity. Test nebyl schopen zachytit přítomnost CTC až u 50 % pacientů s potvrzeným metastatickým karcinomem prostaty (Chikaishi a kol., 2017; Lu a kol., 2013).

**EPISPOT**

Nevšedním funkčním testem detekujícím životaschopné klinicky relevantní CTC obohacené deplecí leukocytů je EPISPOT. Tato procedura využívá nitrocelulózové membrány potažené protilátkami, na níž se krátkodobě kultivuje vzorek potenciálně obsahující nádorové epiteliální buňky, které běžně uvolňují specifické proteinové struktury. Proteiny secernované živými nádorovými buňkami jsou zachyceny primárními protilátkami upevněnými na membráně a zbylé nezachycené buňky jsou odmyty. Pozitivní signál je pak vysílán díky sekundární protilátce s navázaným fluorochromem. Test EPISPOT má potenciál rozšířit znalosti například metastatických pochodů, a to detekcí viabilních CTC secernujících VEGF. Lze předpokládat, že je tato skupina buněk významně zapojena v procesu neoangiogeneze. Tvorba nových krevních cév je jedním z faktorů, bez níž se nádorová buňka vyvíjející se v metastázu neobejde (Alix-Panabières & Pantel, 2015).

**CTC čipy**

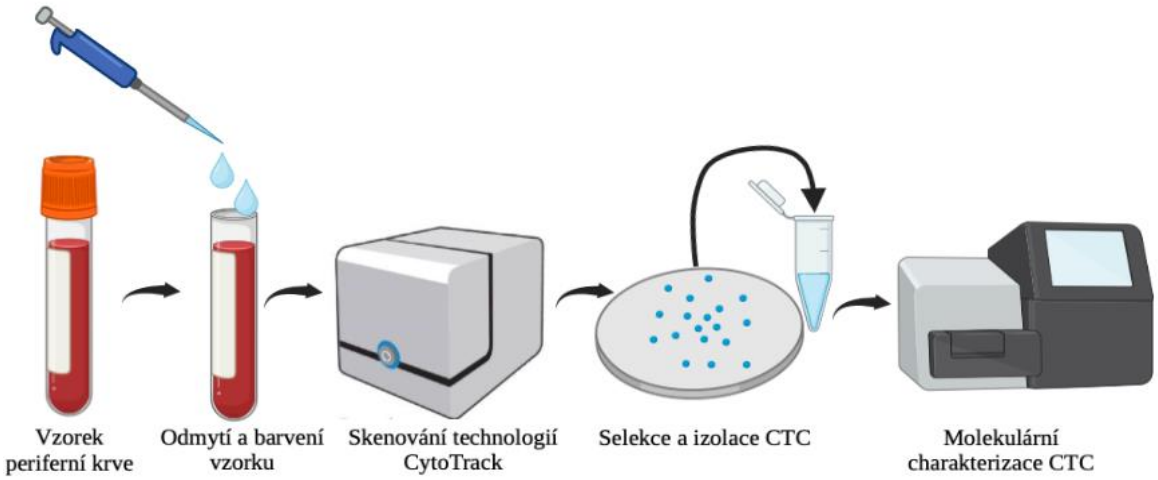
Zcela jedinečnou mikrofluidní technologií detekce jsou CTC čipy. Jedná se o silikonové čipy o velikosti standartního mikroskopického sklíčka s vytištěným systémem kanálků pomocí 3D printingu. Čipy jsou potaženy protilátkami proti adhezní molekule epiteliálních buněk (EpCAM). Plná krev pacienta je pneumaticky tlačena systémem kanálků. Výsledkem tohoto procesu je vysoce účinné zachycení CTC k povrchu funkcionalizovaným protilátkami. Nádorový charakter zachycených buněk je potvrzen prostřednictvím barvení, které je odlišuje od nespecificky vázaných leukocytů (Sequist a kol., 2009).

**FAST**

Další unikátním postupem detekce je skenovací technologie FAST. Jedná se o ultrarychlý automatizovaný digitální mikroskopický systém, jehož klíčovou vlastností je jeho schopnost lokalizovat imunofluorescenčně značené vzácné subpopulace buněk na skleněném substrátu rychlostí až 300 000 buněk za sekundu (Gerges a kol., 2010). Principiálně je technologie založena na působení argonového iontového laseru, který excituje fluorescenci ve značených buňkách. Prostřednictvím svazku optických vláken je emitovaná fluorescence shromažďována v optice se zorným polem dosahujícím velikosti až 50 mm. Díky vysoké rychlosti skenování lze analyzovat velké objemy vzorků, a to bez potřeby jakéhokoli purifikačního nebo obohacovacího kroku, čímž je minimalizováno riziko ztráty buněk (Hsieh a kol., 2006; Alunni-Fabbroni & Sandri, 2010).

**CytoTrack CT11™**

Technologie vysokokapacitního automatizovaného skenování CytoTrack CT11™ kombinuje přednosti průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Pacientovi je odebrán vzorek plné krve o objemu 7,5 až 15 ml a v laboratoři je ze vzorku následnou gradientovou separací vyizolován buffy coat. Cílové buňky ve vzorku jsou obarveny DAPI fluorescenčně značenými protilátkami pro jádro, anti-CK a anti-CD45 a jsou naneseny na speciálně upravený skleněný CytoDisc™ s mnohem větším průměrem, než má běžné mikroskopické sklíčko, což umožňuje pojmout monovrstvu přinejmenším 100 miliónů buněk. Buňky jsou na disku imobilizovány odpařením vzorku a takto připravený disk je upevněn do skeneru. Součástí systému CytoTrack CT11™ je systém CytoPicker™, který slouží ke sběru buněk z disku a jejich přesunutí do zkumavek umožňující následnou molekulární charakterizaci jednotlivých CTCs (Obr. 8) (Ferreira a kol., 2016; Cho a kol., 2018). Na rozdíl od konkurenčních technologií je CytoTrack CT11™ zcela nezávislý na kroku obohacení CTCs, čímž je sníženo riziko falešně pozitivních nebo negativních výsledků. Tato metoda je kompatibilní s technologiemi pro molekulární charakterizaci jednotlivých buněk pomocí Single Cell PCR a sekvenačních technik, což poskytuje klinicky relevantní informace o heterogenitě nádorů (Markussen, 2017). Metoda CytoTrack CT11™ byla využita v experimentální části této práce.




*Obr. 8:* Na obrázku je znázorněn postup zpracování vzorku krve, detekce CTC pomocí vysokokapacitního automatizovaného systému CytoTrack CT11™ a izolace nástrojem CytoPicker™ (Obrázek byl překreslen podle Markussen, 2017, pomocí aplikace Biorender).

#### 2.3.3.1 Metody nepřímé detekce CTC molekulárními přístupy

Pro nepřímou detekci životaschopných CTC jsou rovněž běžně využívány techniky na bázi polymerázové řetězové reakce, jejichž hlavním cílem je amplifikace a detekce nádorově specifické nukleové kyseliny. K amplifikaci cílových mRNA v CTC je využita reverzně-transkriptázová PCR (RT-PCR), v jejímž průběhu dochází k syntéze cDNA z mRNA zprostředkované reverzní transkriptázou a amplifikaci požadovaného genu. RT-PCR se vyznačuje vysokou citlivostí a specifitou, jíž lze dosáhnout prostřednictvím návrhu oligonukleotidových primerů cílených na nádorově specifické geny. Navíc RT-PCR poskytuje i vysokou účinnost, neboť lze celogenomovou DNA nebo RNA amplifikovat i analyzovat během jediného experimentálního kroku a může být analyzováno několik molekulárních cílů během stejné reakce. I tato molekulární metoda naráží na jistá omezení, a to zejména na lyzační krok zahrnutý v PCR experimentu, který znemožňuje následné spočítání a analýzu jednotlivých CTC. Navíc kvůli možné přítomnosti pseudogenů, nízko úrovňové všudypřítomné transkripce v nenádorových buňkách anebo kontaminace vzorku je vysoká citlivost metody paradoxně nevýhodná, jelikož by mohla vést k falešné pozitivitě. V neposlední řadě také u většiny solidních nádorů neexistuje žádný tkáňově specifický marker (Gerges a kol., 2010). Velkého zlepšení v analýze CTC bylo dosaženo zavedením kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR), která umožňuje rozlišení mezi transkripty z autentických CTC a kontaminujících nenádorových buněk či pseudogenů, stále však neposkytuje přesné posouzení počtu CTC ve vzorku (Alunni-Fabbroni & Sandri, 2010).

### 2.3.4 Molekulární charakterizace cirkulujících nádorových buněk

Detekce cirkulujících nádorových buněk sice nabízí odhad celkové metastatické zátěže pacienta s nádorovým onemocněním, ale bez následného provedení molekulární charakterizace genomu těchto buněk je studie ochuzena o důležitá klinicky relevantní data, například o možnost sledování efektu použité terapie. Charakterizací genomového profilu lze identifikovat nové terapeutické cíle, získat řadu poznatků o mechanismech rezistence CTC vůči terapii nebo o původu primárního nádoru. Mohla by také přispět k lepšímu pochopení procesu metastázování a zlepšení stratifikace pacientů pro jednotlivé přístupy personalizované léčby zaměřené na prevenci metastatického relapsu (Lianidou & Markou, 2011).

Důležitost informací získaných molekulární charakterizací může dokazovat například práce Hayashiho a kol., jež se věnovala významu genové exprese Her-2 v CTCs

ve vztahu k prognóze onemocnění. Studie potvrdila existenci Her-2 pozitivních CTC u Her-2 negativních karcinomů prsu a popsala možný vliv těchto buněk na rezistenci k léčbě. (Hayashi a kol., 2012).

V posledních letech dochází ke zdokonalování „omických“ metod na single-cell úrovni neboli na úrovni jednotlivých buněk. Analýza na single-cell úrovni je ve výzkumu rakoviny nedocenitelným nástrojem, neboť umožňuje více nahlédnout do genetické heterogenity mezi jednotlivými nádorovými buňkami. Protože však jediná buňka zpravidla neobsahuje dostatek genetického materiálu pro molekulární charakterizaci, je prakticky před každou takovou biomolekulární analýzou nezbytným krokem provedení amplifikace celého genomu (WGA) (Babayan a kol., 2017).

V současné době je na trhu nabízeno několik komerčních souprav pro amplifikaci genetického materiálu, vhodných i v případě velmi malého vstupního množství gDNA. Většinu komerčních amplifikačních kitů lze na základě jejich mechanismu dělit do dvou kategorií, a to na metody s teplotním cyklem, respektive založené na PCR, a na metody s izotermickou amplifikací. Princip metody s teplotním cyklem spočívá v ligování sekvence primerů na sestřiženou DNA nebo v použití degenerovaných oligonukleotidů jako primerů. Maximálního výkonu metoda dosahuje, pokud je do protokolu před PCR amplifikaci zařazena i pre-amplifikační izotermální fáze založená na amplifikaci násobným vytěsněním řetězce (MDA). Na kombinaci MDA s PCR reakcí jsou principiálně založeny i komerční kity PicoPlex® a MALBAC® testované v experimentální části diplomové práce. Zbývajícím testovaným kitem byl Ampli1™, během jehož amplifikační reakce dochází k fragmentaci genomu sadou restrikčních enzymů a ligaci adaptérů na lepivé konce, po níž následuje amplifikace s exponenciálním teplotním cyklem.

To, jakým směrem se bude ubírat výběr amplifikačního kitu často závisí na dalším plánovaném použití amplifikačního produktu. Kupříkladu pro detekci jednonukleotidových polymorfismů se přistupuje spíše k využití amplifikačních kitů na principu MDA, pro detekci CNV je spíše vhodný kit založený na PCR reakci (Borgström a kol., 2017).

Po úspěšné amplifikaci se přistupuje k provedení molekulární charakterizace. Ta poskytuje vhled do genomových profilů CTC zavedením řady technik využívajících imunofluorescenci, komparativní genomovou hybridizaci, mikročipové technologie, fluorescenční in situ hybridizaci, multiplexní RT-PCR či sekvenování nové generace (Cortés-Hernández a kol., 2020).

Imunofluorescencí jsou CTC vyšetřovány na úrovni proteinů prostřednictvím specificky cílených protilátek, kterými již byla prokázána exprese mnoha markerů včetně

HER2, EGFR, prostatického specifického antigenu, androgenního, progesteronového či estrogenového receptoru. Zlatým standardem imunofluorescenční charakterizace je již zmíněný systém CellSearch®, který využívá tří komerčně dostupných markerů ke zkoumání exprese HER2, EGFR nebo IGF-1R u CTC. Značnou výhodou imunofluorescenčního přístupu je schopnost vizuálně potvrdit, že se jedná o expresi v CTC, a ne v kontaminující buňce. Navíc je možné vizualizovat variace v hladinách exprese proteinů, a to u mnoha zájmových proteinů souběžně. Samozřejmě využití fluorescence přináší i jisté nevýhody jako omezenou citlivost a obtížnou standardizaci interpretace výsledků. Ačkoliv je imunofluorescence účinným nástrojem pro charakterizaci, jejím výstupem jsou pouze kvalitativní data. Vzhledem k heterogenní povaze tumorových buněk by při absenci kvantitativní analýzy mohlo dojít ke ztrátě důležitých informací (Lowes & Allan, 2014).

Vedle charakterizace na bázi proteinů lze CTC analyzovat i na bázi jejich nukleových kyselin. Na genomické úrovni jsou hojně využívány mikročipové technologie (z angl. microarrays), a to především komparativní genomové hybridizační čipy (aCGH). Jedná se o celogenomový screening s vysokým rozlišením poskytující informace o specifických změně počtu kopií, specifických mutačních variantách nebo globálních genomických změnách na úrovni DNA (Lowes & Allan, 2014). Předností microarrays je automatizovaná analýza s možností porovnání více profilů (například srovnání profilů CTC pacientů odpovídajících a neodpovídajících na léčbu). Kromě toho jsou nesporně slibným přístupem pro identifikaci prognostických a diagnostických markerů maligních onemocnění, pro vyšetření aberace genů nebo počtu kopií u CTC. Avšak je nutné brát v úvahu jejich omezenou schopnost detekce např. balancovaných translokací (Shinawi & Cheung, 2008; Lowes & Allan, 2014).

S mohutným rozvojem na poli sekvenování se také hojně začalo přistupovat k aplikování sekvenačních technik nové generace do oblasti klinické genomiky rakovinných buněk zejména pro rychlost a vysokou citlivost těchto technik. Tento účinný nástroj pro analýzu genomových aberací může být využit jak na sekvenaci genomické DNA, tak na sekvenování transkribovaných úseků RNA. Častěji se přistupuje ke zpracování na úrovni RNA, kdy se z CTC extrahuje veškerá mRNA a transkribuje se do cDNA. Následně je metodou PCR amplifikována pomocí primerů specifických pro mutantní, respektive cílovou oblast. Přístupem sekvenování jsou otestovány změny nukleotidu v oblastech jako KRAS, BRAF, p53, EGFR a dalších. Oproti jiným technikám charakterizace je sekvenování výhodné pro schopnost identifikovat široké spektrum genetických změn kupříkladu substituce, inzerce nebo delece bází, změny počtu kopií, přeuspořádání genů a další. I takto

drobné aberace mohou vést k fenotypovým změnám a mohou sehrát důležitou roli ve volbě dalších léčebných postupů. V budoucnu by nejpřednějším klinickým přínosem genomového sekvenování CTC mohlo být pozorování vývoje onemocnění v reálném čase, protože celogenomové respektive celoexomové sekvenování poskytuje řadu relevantních údajů o mutačním stavu definovaného genového panelu a cílovou mutaci lze těmito metodami identifikovat v relativně krátkém čase. Nalezené mutace ovšem nutně nemusí předpovídat aktivaci či inaktivaci odpovídající molekulární dráhy. Pro odhalení složitých mechanismů řídících vývoj nádorového bujení se směřuje ke komplexní multi-omické analýze vygenerováním jak genomických dat, tak i proteomických, epigenomických, metabolomických a transkriptomických dat (Angerilli a kol., 2021; Lowes & Allan, 2014).

### 2.3.5 Využití cirkulujících nádorových buněk

Cirkulující nádorové buňky skýtají obrovský potenciál pro jejich využití ve výzkumu rakoviny i v klinické praxi.

Velká pozornost je věnována vývoji nové terapeutické strategie, jež by byla založena na eliminaci CTC v krevním oběhu. Ovlivnění jejich expanze do sekundárních lézí by mohlo vést ke snížení nádorové zátěže pacientů a s tím spojené úmrtnosti. Selektivním odstraněním CTC se zabývala studie Kima a kol., která využila CTCs exprimujících GFP a injikovala je do myší. Eliminace byla provedena speciálně vyvinutou metodikou fotodynamické terapie. Výsledky prokázaly snížení počtu CTCs v krevním řečišti, pozastavení metastatického procesu a potvrdily prodloužení doby přežití myší (Kim a kol., 2018).

Významnou prognostickou hodnotu by mohl mít pro klinickou praxi také samotný počet CTCs. U některých typů nádorů, například prsu, prostaty, ale i tlustého střeva byl již počet CTCs potvrzen jako efektivní prognostický marker (Harouaka a kol., 2013). Jako prognosticky užitečná prokázala i jeho aplikace u pacientů s karcinomem plic. Bylo dokázáno, že u pacientů s metastatickým malobuněčným karcinomem plic hodnota přesahující 5 CTCs v 7,5 ml krve korelovala se zhoršenou prognózou onemocnění (Krebs a kol., 2011).

Vzhledem k minimálně invazivní povaze tekuté biopsie, a tedy i možnosti opakovaného odběru v krátkém časovém úseku se taktéž nabízí využití CTCs jakožto farmakodynamických biomarkerů při sledování odpovědi na léčbu. V reakci na prokázání dědičné či získané rezistence k terapii by bylo možné včas zasáhnout zavedením jiného léčebného postupu.

Hlubší charakterizace CTCs by také mohla nalézt využití na poli personalizované medicíny, kde by usnadnila zavedení efektivnější individualizované léčebné strategie. (Magbanua & Park, 2017). Konkrétně u pacientů s kolorektálním karcinomem bylo srovnávací analýzou tekuté biopsie odhaleno, že dalším léčebným přístupem by mohlo být zacílení na lncRNA SNHG11 (Xu a kol., 2020).

Na popularitě rovněž nabývá využití CTCs k vytvoření xenograftů odvozených od pacientů (PDX), které nachází uplatnění při charakterizaci biomarkerů, při preklinickém hodnocení účinnosti léků nebo na poli personalizované medicíny. Ve srovnání se stávajícími konvenčními metodami nabízí využití CTC pro generování PDX nezávislost na chirurgickém odběru vzorků a možnost vytvoření experimentálních modelů stejného pacienta v různých stádiích onemocnění (Williams a kol., 2015).

Velkým příslibem je také implementace cirkulující nádorové DNA (ctDNA) do klinické praxe. Jedná se o DNA uvolněnou do krve apoptózou nebo nekrózou nádorových buněk vylučovaných z primárních nebo metastatických lézí. Její potencionální využití tkví v krátké životnosti ctDNA, což umožňuje monitorování její hladiny v reálném čase. Toho lze v praxi zužitkovat pro včasné odhalení nádorového bujení, a to provedením komplexního krevního testu založeného na detekci mutací a měření hladin proteinů souvisejících s nádory (Heidrich a kol., 2021).

Navzdory nespočetným možnostem, které tekutá biopsie nabízí, se však její zavedení do klinické praxe potýká i s řadou obtíží. Hlavní technologickou výzvou je mimořádně vzácný výskyt CTC v krevním vzorku a případné zastínění jejich přítomnosti hematopoetickými buňkami, které se ve vzorku nachází ve výrazném nadbytku. Jedná se o zhruba jednu CTC na pozadí až miliardy okolních fyziologicky se vyskytujících krvinek. Jejich identifikace vyžaduje extrémně vysokou analytickou citlivost a specifičnost (Alix-Panabières & Pantel, 2013).

# 3 Experimentální část

## 3.1 Materiál a chemikálie

**Biologický materiál**

Cirkulující nádorové buňky byly detekovány a izolovány ze vzorku periferní krve o objemu 10 ml ve zkumavce Cell-free DNA Streck odebrané pacientům s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem. Se souhlasem pacientů byly tyto vzorky poskytnuty Krajskou nemocnicí Tomáše Bati ve Zlíně, Fakultní nemocnicí v Ostravě a Vojenskou fakultní nemocnicí v Praze. V rámci DNA laboratoře ÚMTM byl poskytnut náhodný anonymizovaný vzorek nádorové DNA, který byl využit jako referenční vzorek pro porovnání výtěžnosti amplifikačních kitů. Dále byly využity sortované viabilní buňky CCRF-CEM, buněčná linie karcinomu ovaria IGR-1 a buněčná linie kolorektálního karcinomu SW480 poskytnuty laboratoří tkáňových kultur ÚMTM.

**Spotřební materiál**

- Cell-Free DNA Blood Collection Tubes® (Streck, Inc., USA)
- CellSave® Preservative Tubes (Streck, Inc., USA)
- Chip Priming Station (Agilent Technologies, USA)
- CytoCover™ (2C A/S, Dánsko)
- CytoDisc™ (2C A/S, Dánsko)
- CytoPicker™ (2C A/S, Dánsko)
- Vacuette zkumavky s obsahem $K_2EDTA$ (Greiner Bio-One, Rakousko)
- 15ml falkony (Eppendorf, Německo)
- 0,2ml stripy (Life Technologies, USA)
- 1,5ml zkumavky (Eppendorf, Německo)
- 2ml mikrozkumavky (Eppendorf, Německo)
- 0,5ml zkumavky Qubit™, katalogové číslo Q32856 (ThermoFisher Scientific, USA)
- Pipetovací špičky s filtrem (Eppendorf, Německo)
- 0,2ml PCR zkumavky (Eppendorf, Německo)
- QIAquick® Spin Columns (QIAGEN, Nizozemsko)
- Sada pipet (Eppendorf, Německo)

**Chemikálie**

- Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent technologies, USA)
- Ampli1™ Whole Genome Amplification kit (Menarini Silicon Biosystems, Itálie)
- Chlornan sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- CT Reagent Kit B: součástí sady je anti-CD45, anti-EpCAM a anti-CK protlátka (2C A/S, Dánsko)
- CytoScan® Optima HD Array Kit a Reagent Kit Bundle (Affymetrix, USA)
- Ethanol 70%
- FACS™ Lyzační roztok 10x koncentrovaný (BD Biosciences, USA)
- FixoGum® (Marabu, Německo)
- Hovězí sérový albumin (BSA), katalogové číslo 44155Y (VWR International, USA)
- Invitrogen™ Qubit™ Assay kit (ThermoFisher Scientific, USA)
- MALBAC® Single Cell Whole Genome Amplification kit (YIKON Genomics, Čína)
- MiliQ voda (Sigma Aldrich, USA)
- Mounting medium (DuoLink®, Velká Británie)
- Nuclease-free water Ambion™ (ThermoFisher Scientific, USA)
- PicoPLEX® Single Cell WGA Kit v3 (Takara Bio Inc., USA)
- Qubit™ Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA)
- QIAquick® PCR purifikační kit (QIAGEN, Nizozemsko)
- Solný roztok fosfátem pufrovaný (PBS) 10x, katalogové číslo 44057Y nebo ekvivalentní (VWR International, USA)

V případě potřeby na přípravu 1 litru 10x koncentrovaného PBS:

- 80 g chloridu sodného (Mikrochem, Slovensko)
- 2 g chloridu draselného (Lach-Ner, Česká republika)
- 15.4 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, Česká republika)
- 2 g dihydrogenfosforečnanu draselného (VWR Chemicals, USA)
- $H_2O$ RNA kvality

## 3.2 Přístrojové vybavení

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)
- Centrifuga 5804R včetně rotoru (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Německo)

- Combispin centrifuga/vortex (Biosan, Lotyšsko)
- CytoTrack CT11™ (CytoTrack ApS, Dánsko)
- Promývací stanice FS450 (ThermoFisher Scientific USA)
- GeneChip Scanner 3000 7G (ThermoFisher Scientific, USA)
- Hybridizační pec (ThermoFisherScientific, USA)
- IKA vortex mixer (Agilent Technologies, USA)
- Laminární box HeraSave20 (ThermoFisher Scientific, USA)
- Minitřepačka výkyvná 3D (VWR International, USA)
- Minicentrifuga ROTILABO® Uni-fuge s rotorem pro PCR mikrozkumavky (Roth, Německo)
- PCR termocykler MasterCycler® Nexus (Eppendorf, Německo)
- Termocykler T Professional Basic Gradient (Biometra, Německo)
- Qubit™ 4 Fluorometr (ThermoFisher Scientific, USA)
- UV/VIS spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA)
- Váhy (Scaletec, Indie)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., USA)

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Příprava vzorku pro detekci cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™

**Izolace buffy coatu**

Vzorek periferní krve byl z přijaté odběrové zkumavky Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc., USA) přelit do 15ml plastové zkumavky řádně označené číslem vzorku, pořadím odběru a datem zpracování. Zkumavky byly centrifugovány 15 minut při 2500 x g a pokojové teplotě. Centrifugací došlo k rozčlenění krevního vzorku na frakci erytrocytů, nad ní na buffy coat a na plazmu. Vzniklá frakce plazmy byla odebrána do 2ml zkumavek a archivována, případný přebytek plazmy byl odstraněn a ve zkumavce bylo ponecháno zhruba 0,5 ml plazmy. Do nové opět řádně označené 15ml plastové zkumavky bylo odebrán buffy coat se zhruba 2 ml erytrocytární frakce.

**Lýza erytrocytů**

K vyizolovanému buffy coatu bylo přidáno 8 ml 1xFACS lyzačního roztoku a vzorek byl inkubován po dobu 15 minut při pokojové teplotě na výkyvné třepačce. Zkumavky se vzorky byly následně centrifugovány po dobu 15 minut a 4000 x g při pokojové teplotě. Finálním krokem bylo odstranění supernatantu opatrným slitím do kádinky na odpad, případné přebytky supernatantu ve zkumavce byly odsáty pipetou.

**Barvení CT Reagent Kitem B**

Zkumavka s barvivem byla centrifugována po dobu 15 minut při 2500 x g a pokojové teplotě. K peletě vzniklé v předchozím kroku lyzováním erytrocytů bylo přidáno 100 µl barvící směsi. Buněčná peleta byla v roztoku resuspendována nasáváním do špičky pipety a jejím vypouštěním zpět do zkumavky. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu ve tmě při teplotě 2 až 8 °C.

**Promývání**

Ke vzorku bylo přidáno 10 ml 1% BSA ředěného 1x PBS (vychlazený na 2 až 8 °C) a po uzavření falkony byl vzorek několikrát promíchán převrácením falkony. Vzorek byl následně inkubován po dobu 5 minut ve tmě při teplotě 2 až 8 °C. V dalším kroku byla provedena centrifugace po dobu 15 minut při 4000 x g a 8 °C. Supernatant byl odstraněn slitím do kádinky na odpad, zbylý supernatant odpipetován. Bylo přidáno 0,5% BSA ředěného 1x PBS o objemu zhruba 3 ml do každého vzorku a buněčná peleta byla pipetou rozsuspendována. Do falkony byl doplněn roztok naředěného 0,5% BSA v 1x PBS tak, aby byl celkový objem roztoku ve falkoně 10 ml. Falkony se vzorkem byly centrifugovány opět po dobu 15 minut a 4000 x g při 8 °C a poté byl stejným postupem jako po předchozí centrifugaci odstraněn supernatant. K buněčné peletě byl přidán 1 ml MiliQ vody a peleta byla pipetou rozsuspendována.

**Nanášení buněčné suspenze na CytoDisc™**

Celý objem vzorku byl nanesen na CytoDisc™. Pipeta byla uchopena do vodorovné polohy a špičkou pipety byl vzorek rozprostřen krouživými pohyby po celé ploše CytoDiscu™, zároveň byly vynechány asi 1cm okraje disku. CytoDisc™ s naneseným vzorkem byl inkubován ve tmě, při pokojové teplotě v laminárním boxu zhruba 2 hodiny, než došlo k vysušení disku. Do středu CytoDiscu™ bylo přidáno 370 µl Mounting media, poté byl disk překryt krycím sklem CytoCover™ a lehkým přitlačením krycího skla k disku bylo

médium rozprostřeno po ploše disku, případně byly vytlačeny vzduchové bubliny. Okraje CytoCoveru™ byly zalepeny jedním tahem k CytoDiscu™ pomocí lepidla FixoGum vrstvou tenkou zhruba 4 mm a disk byl ponechán k usušení v laminárním boxu minimálně po dobu 45 minut. Zalepený a vysušený disk byl buď skladován v lednici při 2 až 8 °C nebo rovnou skenován.

### 3.3.2 Skenování vzorků technologií CytoTrack CT11™

Před každým skenováním byl CytoDisc™ z obou stran očištěn od zbytků lepidla a nečistot dezinfekčními ubrousky. Následně byl připevněn do otočného ramene uvnitř skeneru a byl stabilizován pomocí pružné svorky. Po zajištění vzorku bylo víko skeneru uzavřeno a v softwaru bylo spuštěno navigování vzorku na poloměr 30 mm a úhel 0°. U každého vzorku bylo na 5 výchozích bodech pomocí kanálu DAPI provedeno zaostření obrazu objektivem 20x/0,75. Před započetím skenování byly nastaveny parametry skenování (Tab. 4).

*Tab. 4:* Nastavené parametry pro skenování technologií CytoTrack CT11™. *(mW – miliwatt, rpm – otáčky za minutu z angl. rounds per minute)*

| Parametr | Nastavená hodnota |
|---|---|
| **Rychlost** | 160 rpm |
| **Míra vzorkování** | 1 μm/vzorek |
| **Šíře skenování** | 50 μm |
| **Start radius** | 1 mm |
| **Stop radius** | 56 mm |
| **Výkon laseru** | 2 mW |

Současně byl vyměněn 20x/0,75 objektiv za skenovací objektiv s parfokální vzdáleností 0,40 (20x/0,40). Následovně bylo spuštěno skenování vzorku. Po doběhnutí skenovacího módu byla provedena analýza signálů nalezených skenerem neboli hotspotů. Byl přenastaven objektiv zpět na 20x/0,75. Bylo zkontrolováno, zda je správně provedeno nastavení parametrů kamerového systému (Tab. 5).

*Tab. 5:* Nastavení parametrů optických kanálů FITC, DAPI, Cy5 a EpCAM *(dB – decibel, FITC – fluoresceinizothiokyanát, DAPI – 4,6-diamin-2-fenylindol, Cy – cyanin).*

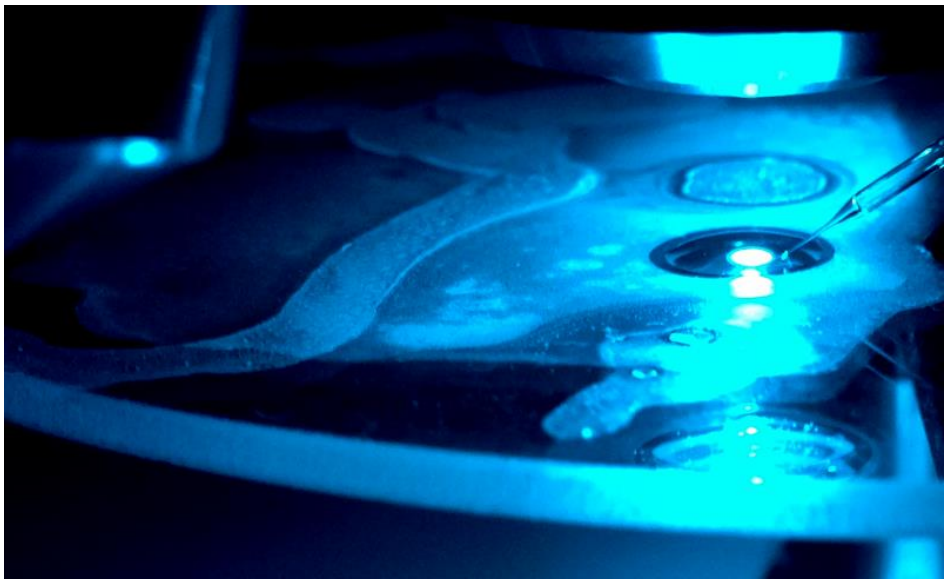
| Kanál | Zisk (dB) | Expoziční doba (µsec) |
|---|---|---|
| **FITC** | 0 | 64 |
| **DAPI** | 0 | 16–32 |
| **Cy5** | 10 000 | 256 |
| **Cy3** | 10 000 | 128 |

Následně byly vyhodnoceny všechny nalezené hotspoty a klasifikovány do jednotlivých tříd. Ty, které nesplňovaly vlastnosti charakteristické pro nádorovou buňku byly zamítnuty.

### 3.3.3 Sběr identifikovaných cirkulujících nádorových buněk ze CytoDiscu™ nástrojem CytoPicker™

Ze CytoDiscu™ byla odstraněna vrstva FixoGum lepidla a disk byl vložen do Petriho misky, ve které byl zcela zalit PBS. Po uplynutí 15 minut byl disk vytažen a byl z něj odstraněn CytoCover™ jeho pomalým posunováním do strany a následným zvednutím směrem nahoru. Následně byl disk v laminárním boxu vysoušen po dobu minimálně 1 hodiny ve tmě. V následujícím kroku následovala příprava pipetovacího systému otáčením kolečka na čerpadle ve směru hodinových ručiček byl pumpován olej do kapiláry do doby, než v kapiláře nezůstal žádný vzduch. Pipeta byla vložena do držáku kapiláry a byla utěsněna pomocí kovové svorky tak, aby směřovala při pohledu shora mírně doprava a dolů k disku. Poté byl pumpován olej do pipety, dokud nedosahoval 1 cm od hrotu. V softwaru CytoTrack byl zapnut program „CellPicking motion“, byl nastaven objektiv 20x/0,40, byl zapnut filtr FITC a pipeta byla navigována do vysílaného paprsku světla. Posledním krokem před samotným sběrem buněk bylo nastavení pipety do středu zorného pole přepnutím na objektiv 4x/0,10 a posouváním pipety do středu horizontálního zorného pole a směrem k vrcholu vertikálního zorného pole. Po správném nastavení pipety byl přepnut objektiv na 20x/0,40 a do skeneru byl umístěn disk určený pro výběr buněk. Byla nalezena potencionální nádorová buňka, která byla určena k odebrání. Filtr byl přepnut na DAPI/FITC, aby byla buňka dobře viditelná. Pro zjednodušení odběru bylo naneseno malé množství média do místa, kde se vybraná buňka nachází. Do shodného místa byla spuštěna i špička pipety (Obr. 9), díky níž byla jemnou manipulací buňka uvolněna z povrchu sklíčka. Poté bylo otáčeno s kolečkem na čerpadle proti směru hodinových ručiček, čímž byla buňka pomalu

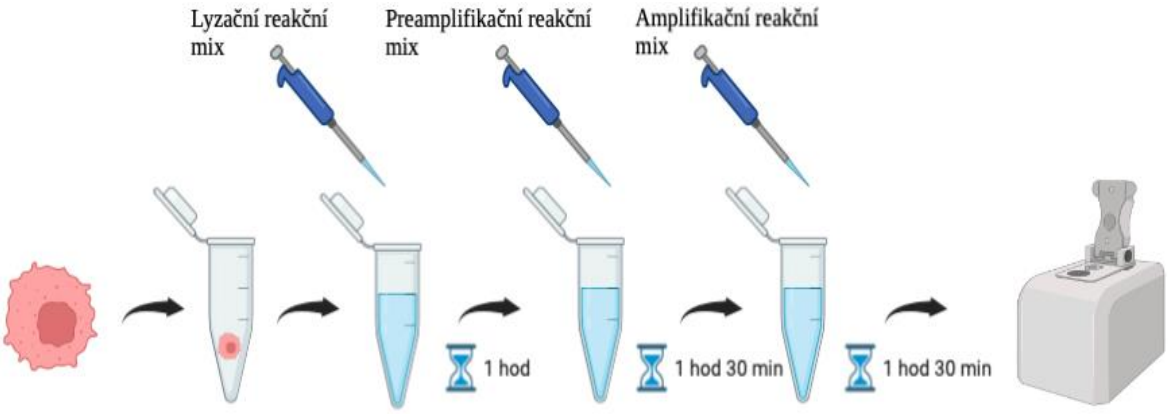
vtažena do otvoru pipety. V závěrečném kroku byla nasátá buňka uvolněna do mikrozkumavky a odstředění ke dnu zkumavky skladována ve tmě při 4 °C.



*Obr. 9:* Na snímku je zobrazeno správné nastavení špičky pipety ve všech osách. Hrot pipety směřuje těsně k povrchu disku s fixovaným vzorkem do kapky naneseného média. Špička v nastavení jako na snímku výše je připravena k provedení izolace buňky.

### 3.3.4 Amplifikace genomu cirkulující nádorové buňky amplifikačním kitem MALBAC® Single Cell WGA

Amplifikace MALBAC® Single Cell amplifikačním kitem byla provedena ve třech hlavních krocích, kterými byly buněčná lýze, pre-amplifikace a samotná amplifikace (Obr. 10).




*Obr. 10:* Pracovní postup amplifikace pomocí MALBAC® Single Cell WGA kitu včetně časové náročnosti jednotlivých kroků (obrázek vytvořen aplikací Biorender).

Před provedením experimentu bylo potřebné připravit si jednak pozitivní kontrolu, kterou byla gDNA dodaná DNA laboratoří ÚMTM zředěná Nuclease-free vodou na výslednou

koncentraci 30 pg/µl, ale taktéž negativní kontrolu, kterou byla Nuclease-free voda. K 1 µl pozitivní i negativní kontroly byly navíc přidány 4 µl lyzačního pufru. Všechny níže uvedené složky potřebné pro přípravu reakčních směsí, byly dodány jako součást MALBAC® Single Cell WGA kitu.

Zároveň bylo v průběhu celého experimentu dodržováno několik důležitých pravidel:

- Vzorek byl mezi jednotlivými kroky promícháván vortexem a stáčen na centrifuze.
- Reakční komponenty byly přidávány do zkumavky, do které byla původně izolována CTC.
- Pracovní prostor byl důkladně vysterilizován.
- Víko termocykleru bylo předehřáto na teplotu 105 °C.
- Pipetováni bylo prováděno co možná nejrychleji a bylo prováděno do ústí zkumavky.
- Po každém pipetování byla zkumavka neprodleně uzavřena.

**Lyzační krok:** Byla připravena reakční směs pro lýzu buněk a to spojením 5 µl lyzačního pufru a 0,1 µl lyzačního enzymu pro každou reakci. Z výsledného produktu bylo 5 µl přidáno nejen k buněčnému vzorku, jehož objem rozpuštěný v PBS nepřesahoval 1 µl, ale i ke kontrolám. Vzorky byly inkubovány v předehřátém termocykleru podle návodu níže (Tab. 6).

*Tab. 6:* Návod společnosti Yikon k nastavení termocykleru pro provedení lyzačního kroku u amplifikace genomu CTC MALBAC® Single Cell WGA kitem.

| **Lyzační krok** | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **50 °C** | 50 minut | |
| **80 °C** | 10 minut | 1 cyklus |
| **4 °C** | Na neurčito | |

**Preamplifikační krok:** Prvním krokem byla opět příprava pre-amplifikační reakční směsi kombinací 30 µl pre-amplifikačního pufru a 1 µl pre-amplifikačního enzymu. Obsah zkumavky byl řádně propipetován a 30 µl čerstvě připravené směsi bylo přidáno jak k buněčnému vzorku, tak i ke kontrolním vzorkům. Vzorky byly inkubovány v termocykleru podle nastaveného pre-amplifikačního programu (Tab. 7).

*Tab. 7:* Návod společnosti Yikon k nastavení termocykleru pro provedení pre-amplifikačního kroku u amplifikace genomu CTC MALBAC® Single Cell WGA kitem.

| Preamplifikační krok | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **94 °C** | 3 minuty | 1 cyklus |
| **20 °C** | 40 sekund | 8 cyklů |
| **30 °C** | 40 sekund | |
| **40 °C** | 30 sekund | |
| **50 °C** | 30 sekund | |
| **60 °C** | 30 sekund | |
| **70 °C** | 4 minuty | |
| **95 °C** | 20 sekund | |
| **58 °C** | 10 sekund | |
| **4 °C** | Na neurčito | 1 cyklus |

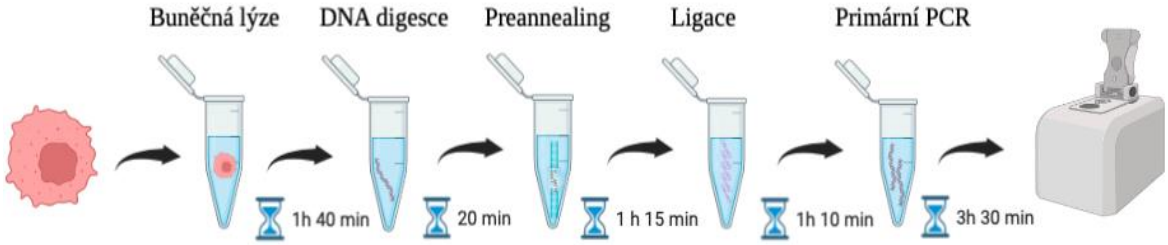
**Amplifikační krok:** I v amplifikačním kroku byla primárně připravena amplifikační směs a to přidáním 0,8 µl amplifikačního enzymu k 30 µl amplifkačního pufru. Obsah zkumavky byl řádně promíchán vortexem a 30 µl směsi bylo přidáno k pre-amplifikačním produktům. Vzorky byly umístěny do termocykleru a byla spuštěna amplifikační reakce podle návodu uvedeného níže (Tab. 8).

*Tab. 8:* Návod společnosti Yikon k nastavení termocykleru pro provedení amplifikačního kroku u amplifikace genomu CTC MALBAC® Single Cell WGA kitem.

| Amplifikační krok | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **94 °C** | 30 sekund | 1 cyklus |
| **94 °C** | 20 sekund | 17 cyklů |
| **58 °C** | 30 sekund | |
| **72 °C** | 3 minuty | |
| **4 °C** | Na neurčito | 1 cyklus |

### 3.3.5 Amplifikace genomu cirkulující nádorové buňky amplifikačním kitem Ampli1™ WGA

Průběh amplifikace Ampli1™ WGA kitem zahrnuje pět kroků: buněčná lýze, DNA digesce, preannealing, ligace a primární PCR reakce (Obr. 11).




*Obr. 11:* Pracovní postup amplifikace pomocí Ampli1™ kitu včetně časové náročnosti jednotlivých kroků. (obrázek vytvořen aplikací Biorender).

Pro přesnější vyhodnocení výsledků experimentu byly kromě testovaného vzorku amplifikovány i vzorky pozitivní a negativní kontroly. Jako negativní kontrola byl použit 1 µl Ampli1™ vody a jako pozitivní kontrola byl užit 1 µl vzorku s obsahem DNA o koncentraci 1 ng/µl poskytnutý DNA laboratoří ÚMTM. Všechny typy reagentů, enzymů a pufru popsaných níže v návodu byly součástí Ampli1™ kitu a byly pro jednodušší manipulaci s kitem řádně označeny číslicemi. Objemy uvedené v návodu níže jsou určeny pro provedení 10 reakcí. Současně byla během experimentu dodržována stejná pravidla jako u předchozího amplifikačního kitu (viz kapitola 3.3.4).

**Lyzační krok:** Lyzační krok byl započat přípravou lyzační reakční směsi napipetováním 2 µl Ampli1™ reakčního pufru 1, 1,3 µl Ampli1™ reagentu 2, 1,3 µl Ampli1™ reagentu 3, 2,6 µl Ampli1™ enzymu 1 a 12,8 µl Ampli1™ vody. Ke každému buněčnému vzorku a ke kontrolám bylo přidáno vždy 2 µl lyzační směsi. Vzorky byly přeneseny do termocykleru a byla zahájena inkubace podle návodu níže (Tab. 9).

*Tab. 9:* Návod společnosti Menarini biosystems k nastavení termocykleru pro provedení lyzačního kroku u amplifikace genomu CTC Ampli1™ WGA kitem.

| **Lyzační krok** | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **42 °C** | 45 minut | 1 cyklus |
| **65 °C** | 30 minut | |
| **80 °C** | 15 minut | |
| **4 °C** | Na neurčito | |

**Digesční krok:** Digesční krok rovněž začal přípravou reakční směsi, a to napipetováním 2 µl Ampli1™ reakčního pufru 1, 2 µl Ampli1™ enzymu 2 a 16 µl Ampli1™ vody.

Následně bylo ke vzorku i ke kontrolám přidáno celkem 2 µl této reakční směsi tak, že výsledný objem činil 5 µl. Posledním krokem digesce byla inkubace v termocykleru podle návodu níže (Tab. 10).

*Tab. 10:* Návod společnosti Menarini biosystems k nastavení termocykleru pro provedení digesčního kroku u amplifikace genomu CTC Ampli1™ WGA kitem.

| **Digesční krok** | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **37 °C** | 5 minut | |
| **65 °C** | 5 minut | 1 cyklus |
| **4 °C** | Na neurčito | |

**Preannealing:** Preannealing bezprostředně navazoval na předchozí krok a počínal přípravou preannealing reakční směsi napipetováním 5 µl Ampli1™ reakčního pufru 1, 5 µl Ampli1™ reagentu 4, 5 µl Ampli1™ reagentu 5 a 15 µl Ampli1™ vody. Tento vzorek však nebyl přidán přímo ke vzorkům, ale byl samostatně inkubován v termocykleru. Inkubace probíhala v jednominutových cyklech, přičemž počáteční teplota byla nastavena na 65 °C a s každým dalším cyklem se snižovala o 1 °C do doby, než teplota klesla na 15 °C.

**Ligace:** Ligační krok opět vyžadoval přípravu reakční směsi, tentokrát přidáním 10 µl Ampli1™ reagentu 6 a Ampli1™ enzymu 3 k již připraveným 30 µl preannealing reakčního mixu. Výsledný objem ligační reakční směsi tedy činil 50 µl. Ke vzorku i ke kontrolám bylo napipetováno vždy 5 µl této směsi, výsledný objem tedy odpovídal 10 µl. Vzorky byly umístěny do termocykleru a byly inkubovány při teplotě 15 °C po dobu 1 hodiny.

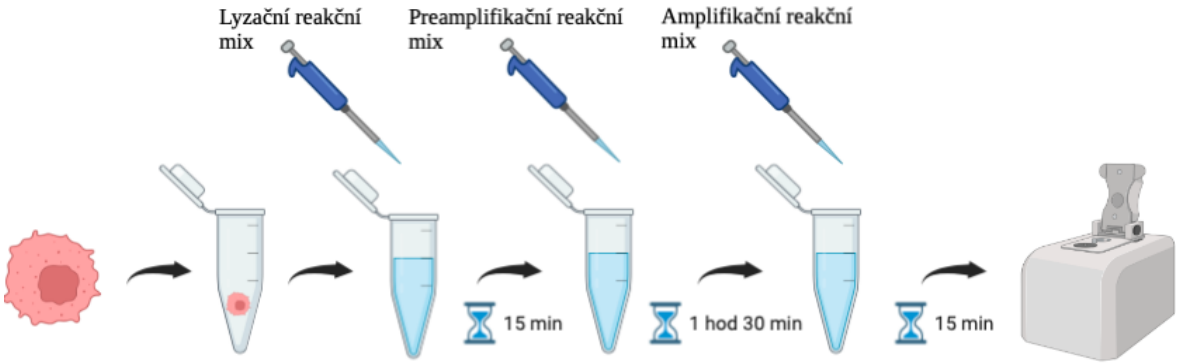
**Primární PCR:** I v tomto kroku byla nezbytná příprava reakčního mixu, a to napipetováním následujících komponent: 30 µl Ampli1™ reakčního pufru 7, 20 µl Ampli1™ reagentu 8, 10 µl Ampli1™ enzymu 4 a 340 µl Ampli1™ vody. Výsledný objem reakční směsi tedy činil 400 µl. Ke každému vzorku i kontrolám bylo přidáno 40 µl této směsi, čímž se výsledný objem vzorku zvýšil na 50 µl. Posledním krokem byla amplifikace v termocykleru, který byl nastaven podle návodu níže (Tab. 11).

*Tab. 11:* Návod společnosti Menarini biosystems k nastavení termocykleru pro provedení amplifikačního kroku u amplifikace genomu CTC Ampli1™ WGA kitem.

| Primární PCR reakce | | | |
|---|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** | **Poznámka** |
| **68 °C** | 3 minuty | 1 cyklus | – |
| **94 °C** | 40 sekund | 14 cyklů | – |
| **57 °C** | 30 sekund | | – |
| **68 °C** | 1 minuta 30 sekund | | + 1 sekunda/cyklus |
| **94 °C** | 40 sekund | 8 cyklů | – |
| **57 °C** | 30 sekund | | + 1 °C/ cyklus |
| **68 °C** | 1 minuta 45 sekund | | + 1 sekunda/ cyklus |
| **94 °C** | 40 sekund | 22 cyklů | – |
| **65 °C** | 30 sekund | | – |
| **68 °C** | 1 minuta 53 sekund | | + 1 sekunda/ cyklus |
| **68 °C** | 3 minuty 40 sekund | 1 cyklus | – |
| **4 °C** | Na neurčito | | – |

### 3.3.6 Amplifikace genomu cirkulující nádorové buňky amplifikačním kitem PicoPLEX® Single Cell WGA

Amplifikace PicoPLEX® Single Cell WGA kitem sestávala ze tří kroků: lyzačního kroku, pre-amplifikačního kroku a samotného amplifikačního kroku (Obr. 12).




*Obr. 12:* Pracovní postup amplifikace genomu kitem PicoPLEX® Single Cell WGA včetně přibližné časové náročnosti jednotlivých kroků (obrázek vytvořen pomocí aplikace Biorender).

Během experimentu bylo využíváno testovaného vzorku s CTC, pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola byla využita referenční gDNA poskytnutá DNA laboratoří ÚMTM se vstupním množstvím 30 pg nebo 15 pg v závislosti na množství buněk v kontrole.

Negativní kontrola byla připravena napipetováním 2,5 µl extrakčního pufru k 2,5 µl PBS. Stejně jako v předchozích případech bylo při amplifikaci dodržováno několik pravidel (viz kapitola 3.3.4).

**Lyzační krok:** Byl zahájen přidáním extrakčního pufru k buňce tak, aby výsledný objem odpovídal 5 µl. Zároveň byl připraven Cell Extraction Master Mix napipetováním 0,6 µl Cell Extraction enzymu k 14,4 µl Extraction Enzyme Dilution pufru. Do PCR zkumavek bylo napipetováno 5 µl vzorku a 5 µl Master Mixu. Vzorky i s kontrolami byly umístěny do termocykleru a byl spuštěn inkubační program podle následující tabulky (Tab. 12).

*Tab. 12:* Návod společnosti Takara Bio k nastavení termocykleru pro provedení lyzačního kroku u amplifikace genomu CTC PicoPLEX® Single Cell WGA kitem.

| **Lyzační reakce** | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **70 °C** | 10 minut | |
| **95 °C** | 4 minuty | 1 cyklus |
| **22 °C** | Na neurčito | |

**Preamplifikační krok:** I pro spuštění preamplifikační reakce bylo nezbytné připravit reakční mix, a to napipetováním 28,2 µl pre-amplifikačního pufru a 1,8 µl pre-amplifikačního enzymu. Do všech PCR zkumavek z předchozího lyzačního kroku bylo přidáno 10 µl pre-amplifikačního reakčního mixu, výsledný objem ve zkumavce tedy činil 20 µl. Připravené zkumavky byly vloženy do termocykleru s přednastaveným pre-amplifikačním programem (Tab. 13) podle návodu a byla zahájena inkubace.

*Tab. 13:* Návod společnosti Takara Bio k nastavení termocykleru pro provedení pre-amplifikačního kroku u amplifikace genomu CTC PicoPLEX® Single Cell WGA kitem.

| **Preamplifikační reakce** | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **95 °C** | 3 minuty | 1 cyklus |
| **95 °C** | 15 sekund | |
| **15 °C** | 50 sekund | |
| **25 °C** | 40 sekund | 18 cyklů |
| **35 °C** | 30 sekund | |
| **65 °C** | 40 sekund | |

| | | |
|---|---|---|
| **75 °C** | 40 sekund | |
| **4 °C** | na neurčito | 1 cyklus |

**Amplifikační krok:** Posledním krokem byla samotná amplifikace, která byla započata přípravou reakčního mixu, tentokrát napipetováním 78,6 µl amplifikačního pufru, 3,9 µl amplifikačního enzymu a 2,5 µl Nuclease-free Water. Výsledných 30 µl amplifikačního reakčního mixu bylo přidáno k 20 µl pre-amplifikačního produktu. PCR zkumavky byly vloženy do předehřátého termocykleru a byl spuštěn amplifikační program (Tab. 14).

*Tab. 14:* Návod společnosti Takara Bio k nastavení termocykleru pro provedení amplifikačního kroku u amplifikace genomu CTC PicoPLEX® Single Cell WGA kitem.

| **Amplifikační reakce** | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **95 °C** | 2 minuty | 1 cyklus |
| **95 °C** | 15 sekund | |
| **63 °C** | 30 sekund | 10 cyklů |
| **68 °C** | 30 sekund | |
| **4 °C** | na neurčito | 1 cyklus |

### 3.3.7 Měření koncentrace vzorků Qubit™ 4 fluorometrem

Pro měření koncentrace byl přichystaný příslušný počet 0,5ml PCR zkumavek Qubit™ pro standardy a vzorky, přičemž test Qubit™ dsDNA HS vyžaduje celkem dva standardy. Následovala příprava dostatečného objemu pracovního roztoku zředěním činidla Qubit™ dsDNA HS v poměru 1:200 v pufru Qubit™ dsDNA do čisté plastové zkumavky. Posléze byl do každé zkumavky přidán takový objem pracovního roztoku, aby výsledné množství roztoku společně se vzorkem nebo standardem činilo 200 µl. Následně bylo do zkumavek k pracovnímu roztoku přidáváno 10 µl standardu nebo 1–20 µl vzorku. Obsah zkumavek byl před měřením ještě krátce promíchán vortexem a inkubován po dobu dvou minut. Zatím byl na domovské stránce Qubit™ fluorometru vybrán program dsDNA High Sensivity. Po inkubaci byla spuštěna možnost „Read standards“ a do komory fluorometru byla vložena zkumavka označená jako Standard 1. Po dokončení měření standardu byl postup zopakován i u druhého standardu. Dále byla zvolena možnost „Run samples“ a na displeji byl ještě před samotným měřením zadán objem vzorku přidaného do zkumavky a požadované jednotky

pro vstupní koncentraci vzorku. V konečném kroku byly jednotlivě vkládány všechny zkumavky se vzorkem obdobným způsobem jako u standardů a spuštění měření bylo vždy provedeno tlačítkem „Read tube“. Po každém měření byly na displeji zobrazeny dvě hodnoty, přičemž horní hodnota odpovídala koncentraci původního vzorku a dolní hodnota koncentraci ředění.

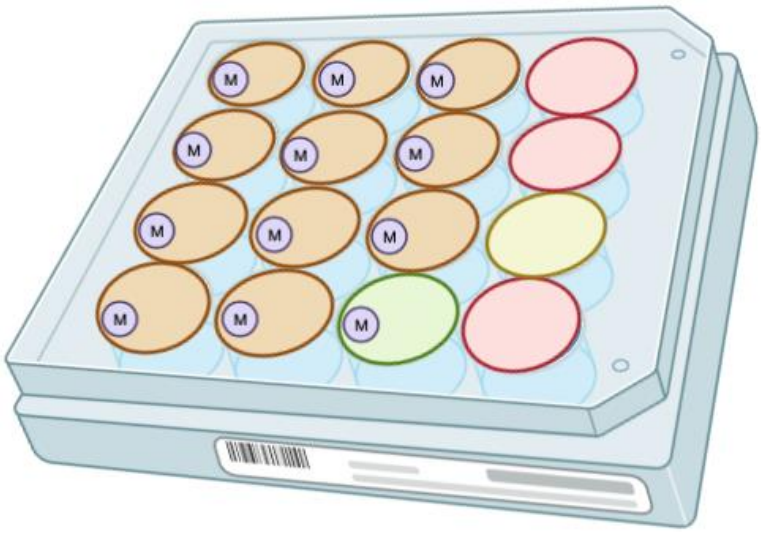
### 3.3.8 Kapilární elektroforéza v analyzátoru Agilent 2100 Bioanalyzer System

**Příprava směsi gelu a barviva**

V počátečním kroku byly High Sensivity DNA dye concentrate a High Sensivity DNA gel matrix ponechány k ekvilibraci na pokojovou teplotu. Po uplynutí zhruba 30 minut bylo do mikrozkumavky s HS DNA gel matrix přidáno 15 µl High Sensivity DNA dye concentrate. Vzniklý roztok byl promíchán vortexem a krátce stočen na centrifuze. Následně byl přenesen do zkumavky s filtrem a byl stočen při 2240 x g po dobu 15 minut. Ze zkumavky byl odstraněn filtr.

**Nanesení směsi gelu, barviva, markeru a ladderu do jamek čipu a spuštění analýzy**

Před použitím byla směs gelu a barviva vytemperována na pokojovou teplotu po dobu zhruba 30 minut. Mezitím byl na primovací stanici umístěn High Sensivity DNA chip. Po ustálení bylo přidáno 9 µl směsi gel-barvivo do definované jamky čipu (Obr. 13). Píst byl stlačen do polohy 1 ml, dokud nedošlo ke cvaknutí západky, čímž byla uzavřena priming stanice. Dále byl zatlačen píst injektoru směrem dolů a po uplynutí 1 minuty byl uvolněn ze svorky zpět do pozice 0,3 ml. Po 5 sekundách byl píst natáhnut zpět do pozice 1 ml a primovací stanice byla otevřena. Bylo přidáno 9 µl směsi gel-barvivo do definovaných jamek (Obr. 13). V dalším kroku byl naneseno po 5 µl markeru do všech zbylých 12 jamek určených pro vzorky a do jamky označené symbolem žebříku. Do jamky se symbolem žebříku byl napipetován i 1 µl HS DNA ladderu. Do zbylých 12 jamek byl pipetován buď 1 µl vzorku nebo do nevyužitých jamek 1 µl markeru (Obr. 13). Čip byl umístěn vodorovně do adaptéru a byl protřepán vortexem po dobu 1 minuty při nastavení 2400 otáček za minutu. Čip byl umístěn do Agilent 2100 Bioanalyzeru a byla spuštěna analýza.




*Obr. 13:* Definované jamky na čipu Agilent 2100 Bioanalyzer System: do oranžově označených jamek byly nanášeny vzorky, do zeleně označené jamky byl nanesen ladder, do červeně označených jamek byla nanesena směs gel-barvivo, do žlutě označené jamky bylo provedeno prvotní nanesení 9 µl směsi gel-barvivo. Do všech jamek označených písmenem M byl navíc nanesen marker (obrázek vytvořen v aplikaci Biorender).

### 3.3.9 Purifikace produktu PCR purifikačním kitem QIAquick®

Počátečním krokem purifikace bylo přidání 5 objemů PB pufru k 1 objemu vzorku a vzniklý roztok byl promíchán. Do 2ml sběrné zkumavky byla vložena QIAquick® Spin kolonka a na ni byl nanesen vzorek. Bylo provedeno odstředění zkumavky s kolonkou po dobu 30–60 sekund a roztok, který prošel skrze kolonku, byl odstraněn. Kolonka byla znovu umístěna do sběrné zkumavky a byla promyta 750 µl PE pufru. Následně byla kolonka odstředěna po dobu 30–60 sekund, odpadní roztok ze sběrné zkumavky byl odstraněn, kolonka byla navrácena do sběrné zkumavky a po dobu 1 minuty znovu odstředěna v centrifuze. Po stočení byla QIAquick kolonka vložena do čisté 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Pro eluci DNA bylo do středu kolonky přidáno 50 µl EB pufru (10 mM Tris-Cl o pH 8,5) nebo vody (pH 7,0–8,5) a kolona byla odstřeďována po dobu 1 minuty. Pro zvýšení koncentrace DNA bylo přímo na membránu QIAquick kolony navíc přidáno 25 µl elučního pufru a bylo provedeno finální stočení v centrifuze.

### 3.3.10 Detekce chromozomálních aberací na celogenomové úrovni metodou microarray

Po celou dobu experimentu byly nejen vzorky a kontroly, ale i všechny ostatní komponenty udržovány při chladu. Mezi jednotlivými kroky bylo u vzorku provedeno stočení centrifugou a protřepání na vortexu. Jednotlivé komponenty master mixu byly obdrženy jako součást kitu a před jejich využitím byly temperovány na pokojovou teplotu, pouze enzym byl vždy vytažen z chladícího bloku těsně před upotřebením.

**Příprava genomické DNA**

U všech vzorků byla změřena koncentrace na spektrofotometru a následně byl vzorek naředěn tak, aby koncentrace činila 50 ng/µl pufrem Low EDTA TE. Současně byla rozmražena kontrolní gDNA, která byla součástí kitu. Kontrolní gDNA a všechny vzorky byly promíchány na vortexu a krátce stočeny na centrifuze. Do stripu s mikrozkumavkami bylo napipetováno do každého vzorku 5 µl, gDNA jako pozitivní kontrola a Low EDTA TE pufr jako negativní kontrola. Strip byl uzavřen a stočen v centrifuze při 650 x g po dobu jedné minuty.

**Digesce restrikčním enzymem**

Byl připraven digesční master mix smícháním 11,55 µl Nuclease-free vody, 2 µl 10x Nsp I pufru, dále 0,20 µl 100x BSA a 1 µl Nsp I enzymu. Ke každému vzorku a kontrolám bylo připipetováno 14,75 µl master mixu. Poté byly vzorky umístěny do termocykleru a byl spuštěn program „CytoScan Digest“, který odpovídá následujícím hodnotám: 37 °C–2 hodiny, 65 °C–20 minut, 4 °C–na neurčito.

**Ligace**

Byl připraven ligační master mix smícháním 2,5 µl 10x T4 DNA Ligase pufru, 0,75 µl 50 µM Adaptoru Nsp I a 2 µl T4 DNA ligázy (uvedené objemy odpovídají množství master mixu dostačujícímu pro jeden vzorek nebo kontrolu). Dále bylo 5,25 µl master mixu napipetováno ke každému vzorku či kontrole. Vzorky byly vloženy do předehřátého termocykleru a byl spuštěn teplotní program ligace s následujícími kroky: 16 °C–3 hodiny, 70 °C–20 minut, 4 °C–na neurčito. Po skončení lze přistoupit rovnou ke kroku PCR nebo nechat destičku do druhého dne v termocykleru při 4 °C.

**PCR reakce**

Ligované vzorky byly stočeny při 650 x g po dobu jedné minuty a ke každému bylo napipetováno 75 µl Nuclease-free vody. Obsah každého vzorku i kontrol byl rozpipetován po 10 µl do dvou mikrozkumavek. Zároveň byl vytvořen do 15ml centrifugační zkumavky PCR master mix. Pro přípravu master mixu objemem dostačujícího pro jeden vzorek bylo použito 50,3 µl Nuclease-free vody, 10 µl CytoScan Taf pufru, 20 µl 5M Betainu, 3,5 µl dNTP, 4,2 µl PCR primeru a 2 µl CytoScan Taq DNA polymerázy. Ke každému ligovanému vzorku či kontrole bylo přidáno 90 µl čerstvě připraveného PCR master mixu. Vzorky byly protřepány na vortexu a stočeny v centrifuze při 650 x g po dobu 1 minuty. Následně byly vloženy do předehřátého termocykleru, kde byl již přednastaven a následně spuštěn program pro PCR (Tab. 15).

*Tab. 15:* Program nastavený na termocykleru pro provedení PCR reakce.

| **PCR reakce** | | |
|---|---|---|
| **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **95 °C** | 60 sekund | 1 cyklus |
| **95 °C** | 30 sekund | |
| **60 °C** | 45 sekund | 30 cyklů |
| **68 °C** | 60 sekund | |
| **68 °C** | 7 minut | |
| **4 °C** | 5 minut | 1 cyklus |
| **4 °C** | na neurčito | |

**Purifikace PCR produktu**

Do lahvičky s Purification Wash pufrem bylo přidáno 45 ml absolutního ethanolu. Lahvička s magnetickými kuličkami byla protřepána, dokud nebyl obsah homogenní. Následně bylo přidáno 360 µl magnetických kuliček do všech mikrozkumavek s PCR produkty. Vzorky s magnetickými kuličkami byly důkladně protřepány, inkubovány po dobu 10 minut a centrifugovány po dobu 3 minut při 16 000 rcf a pokojové teplotě. Poté byly vzorky vloženy do magnetického stojanu a bylo vyčkáno, než se peleta zachytila na magnet. Bez narušení pelety byl ze všech zkumavek odstraněn supernatant a bylo přidáno 800 µl Purification Wash pufru. Mikrozkumavky byly vloženy do adaptoru na vortexu, kde byly ponechány za stálého třepání dvě minuty. Vzorky v centrifuze stočeny opět po dobu 3 minut

při nastavení 16 000 rcf a po stočení byly opět vloženy do magnetického stojanu. Ve chvíli, kdy se pelety uchytily na magnetu byl znovu odstraněn supernatant. Mikrozkumavky byly vyjmuty z magnetického stojanu a s otevřenými víčky byly ponechány k inkubaci v laminárním boxu po dobu 7 minut. Následovalo nanesení 27 µl elučního pufru do všech zkumavek, řádné uzavření víček, protřepání na vortexu po dobu 10 minut do úplného rozsuspendování pelety a stočení na centrifuze při totožném nastavení jako v předchozím kroku centrifugování. Finálními kroky bylo umístění mikrozkumavek do magnetického stojanu a přenesení 25 µl supernatantu od každého vzorku a kontrol do nových zkumavek. Je nutné dbát, aby nebyla narušena peleta.

**Kvantifikace**

Do nových, řádně označených zkumavek bylo rozpipetováno 18 µl vody pro každý vzorek a kontrolu a bylo k nim přidáno 2 µl odpovídajícího vzorku, popřípadě kontroly. Na spektrofotometru byla změřena koncentrace vzorků, přičemž pro pokračování experimentu je nutná koncentrace dosahující alespoň 3,0 µg/µl (po přepočtu na původní koncentraci před ředěním).

**Fragmentace**

Byl připraven fragmentační master mix o objemu 500 µl a to v následujícím pořadí: 215 µl Nuclease-free vody, 275 µl fragmentačního pufru a 10 µl fragmentačního reagentu. Následně bylo po 5 µl fragmentačního master mixu přidáno k jednotlivým vzorkům, popřípadě kontrolám a po důkladném protřepání na vortexu a krátkém stočení v centrifuze byly vzorky přeneseny do předehřátého termocykleru. Byl spuštěn fragmentační program, který odpovídá: 37 °C–35 minut, 95 °C–15 minut, 4 °C–na neurčito.

**Značení**

Krok značení opět začínal přípravou master mixu, tentokrát napipetováním 7 µl 5x TdT pufru, 1 µl 30mM DNA Labeling reagentu a 1,8 µl TdT enzymu. K produktu fragmentace bylo přidáno 9,8 µl připraveného master mixu a po protřepání na vortexu a krátkém stočení v centrifuze byly vzorky umístěny do předehřátého termocykleru a byl spuštěn program pro značení dle následujících instrukcí: 37 °C–4 hodiny, 95 °C–15 minut, 4 °C–na neurčito.

**Hybridizace**

Úvodním krokem hybridizace bylo předehřátí hybridizační pece alespoň 1 hodinu před použitím na teplotu 50 °C a na otáčky 60 rpm. Současně byl přichystán příslušný počet čipů. Čipy byly řádně označeny pro dané vzorky, naskenovány a registrovány jako CytoScan HD Array pomocí portálu GeneChip Comand Console (AGCC) a inkubovány septy směřujícími nahoru po dobu 10–15 minut. Během inkubace byl připraven hybridizační master mix přidáním jednotlivých složek v následujícím pořadí: 82,5 µl hybridizačního pufru 1, dále 7,5 µl hybridizačního pufru 2, 3,5 µl hybridizačního pufru 3 a 0,5 µl hybridizačního pufru 4. Posledním krokem přípravy master mixu bylo přidání 1 µl Oligo Control reagentu 0100. Ke každému vzorku bylo přidáno 95 µl čerstvě připraveného master mixu. Vzorky byly vloženy do termocykleru a byl spuštěn hybridizační program: 95 °C–10 minut, 49 °C–3 minuty, 49 °C–na neurčito. Mezitím byla do pravého horního septa na zadní straně čipu napíchnuta 200µl pipetovací špička pro kontrolu správného pipetování vzorku do čipu. Po dokončené inkubaci vzorků v termocykleru bylo do volného septa čipu napipetováno 100 µl vzorku. Po dokončení pipetování byly špičky ze sept vyjmuty a všechna septa byla přelepena samolepkami. Čipy byly co nejrychleji přeneseny do předehřáté hybridizační pece a byly tu ponechány po dobu 16 až 18 hodin při 60 rpm a 50 °C.

**Promývání, barvení, skenování**

Na přístroji Fluidics Station 450 byl spuštěn zahajovací program PRIME_450. Pro každý vzorek byly do tří 1,5ml zkumavek přidány následující reagencie: 500 µl Stain Buffer 1 do hnědé zkumavky, 500 µl Stain Buffer 2 do běžné mikrozkumavky a 800 µl Array Holding Bufferu do běžné mikrozkumavky. Tyto zkumavky byly vloženy do promývací stanice do příslušných pozic v pořadí popsaném výše. Dle typu čipu byl vybrán příslušný program z panelu AGCC Fluidics Control a dále bylo postupováno podle pokynů na obrazovce promývací stanice. Z hybridizační pece byly vyjmuty čipy a byly z nich odstraněny samolepky zakrývající septa. Čip byl neprodleně vložen do promývací stanice a jehly stanice byly umístěny do nižší pozice. Bylo vyčkáno na dokončení promývacího kroku a čipy byly vyjmuty z promývací stanice. Je nutné zkontrolovat, zda nejsou v čipu přítomny vzduchové bubliny. Jestliže jsou, je nutné vrátit čip do promývací stanice a postupovat podle pokynů na obrazovce. V případě, že žádné bubliny viditelné nejsou, je možné opět zalepit septa a vložit čipy do skeneru a spustit skenování.

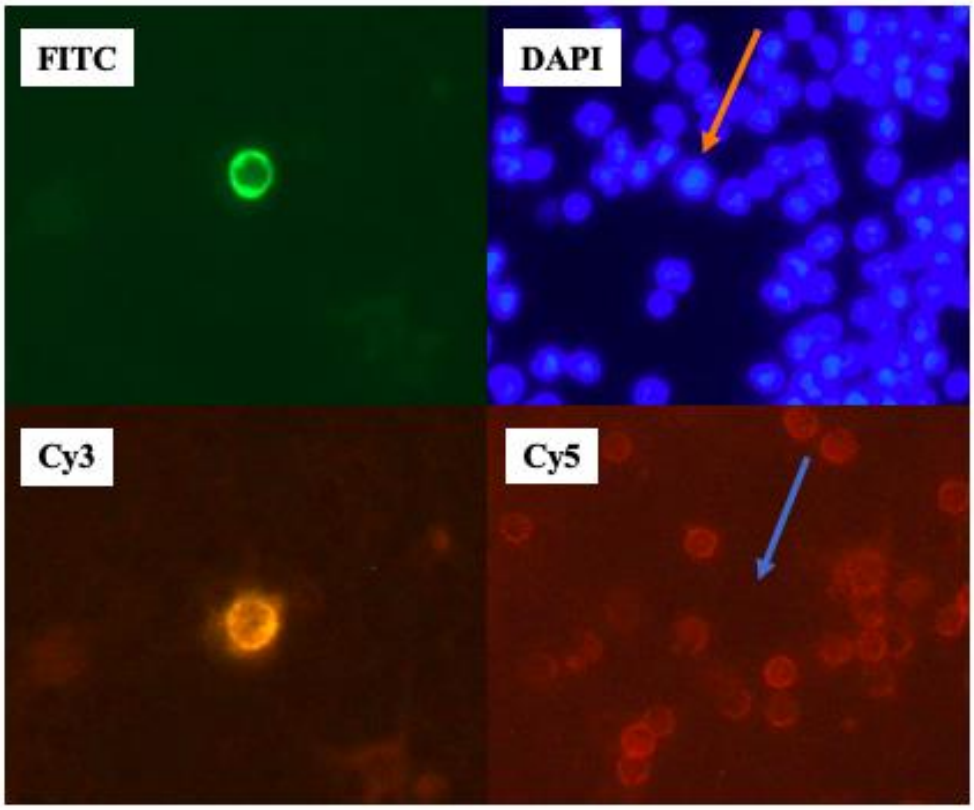
# 4 Výsledky

## 4.1 Detekce cirkulujících nádorových buněk technologií CytoTrack CT11™

Zpracované vzorky periferní krve pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem byly detekovány technologií CytoTrack CT11™. Jako pozitivní nález byla vyhodnocena buňka, která splňovala několik definovaných morfologických kritérií:

1. Kulovitý tvar.
2. Průměr větší než 4 μm.
3. Na DAPI viditelné jádro.
4. Pozitivní exprese cytokeratinů na FITC.
5. Pozitivní exprese EpCAM na Cy3 filtru.
6. CD45 negativní.

Na obrázku 14 jsou znázorněny mikroskopické snímky nalezené cirkulující nádorové buňky z buněčné linie SW480. Pod optickým kanálem FITC lze znatelně vidět kulovitý tvar buňky a pomocí pravítka v softwaru CytoTrack bylo možné ověřit i odpovídající velikost buňky. Zároveň byla tímto filtrem ověřena přítomnost cytokeratinů. Pod optickým kanálem DAPI byla buňka opět jasně viditelná, čímž byl potvrzen fakt, že se jedná o jadernou buňku, nikoliv o kontaminaci. Pod optickým kanálem Cy3 zachycujícím expresi EpCAM šlo buňku dobře identifikovat jako EpCAM pozitivní, což přispívá k ověření hypotézy, že je buňka nádorového charakteru. Naopak na posledním optickém kanálu Cy5, který zachycuje expresi leukocytárního antigenu CD45 nebyla buňka zřetelně vidět, čímž bylo vyloučeno, že by se u nalezené buňky jednalo o leukocyt. V průběhu diplomové práce bylo celkem analyzováno 122 vzorků periferní krve pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem ve stádiích I-III. Z celkového počtu bylo 68 vzorků odebráno v předoperačním období resekce nádoru a 54 vzorků bylo pacientům odebráno až po provedení resekce nádoru. Přítomnost cirkulující nádorové buňky byla v případě prvního odběru zachycena u 33,8 %, u pooperačního odběru byla zachycena u 29,6 %.




*Obr. 14:* Cirkulující nádorová buňka buněčné linie SW480 zobrazená všemi optickými filtry. Lokace nádorové buňky je označena šipkou, nastavený optický filtr je uveden v bílém rámečku v levé horní části snímku, u mikroskopického snímku je zvětšení 20x s parfokální vzdáleností 0,75.

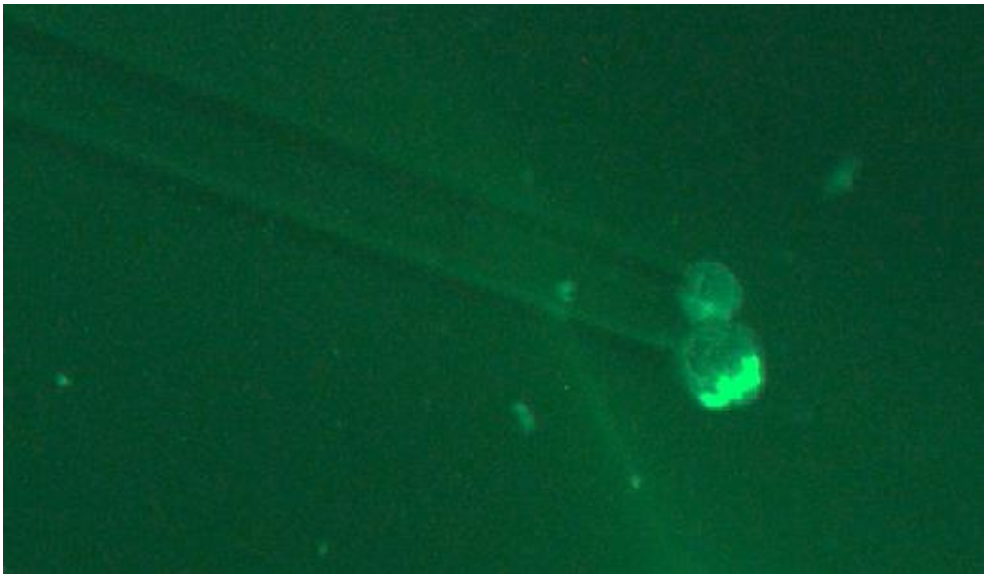
## 4.2 Sběr identifikovaných cirkulujících nádorových buněk ze CytoDiscu™ nástrojem CytoPicker™

Součástí platformy CytoTrack CT11™ je i integrovaný systém CytoPicker™ speciálně vyvinutý pro izolaci buněk ze CytoDiscu™. Úspěšnému provedení sběru buněk prostřednictvím CytoPickeru™ předcházelo podrobné seznámení s touto nedávno zavedenou izolační metodou, kalibrace přístroje a provedení optimalizace některých kroků v postupu. V rámci metody byla taktéž osvojena potřebná zručnost v mikromanipulaci a to zejména při posunu CytoPickeru™ po osách x, y, z v závislosti na kvalitě vzorku.

Byla provedena optimalizace objemu roztoku, do kterého byla CTC finálně izolována. Výrobce CytoPickeru™ uvádí hodnotu 10 µl PBS, které byly v rámci optimalizace zredukovány na rozmezí 1–2,5 µl PBS v závislosti na požadavcích na maximální vstupní objem vzorku od výrobců jednotlivých amplifikačních kitů.

Pro zamezení degradace vzorku pod laserovým paprskem bylo v rámci optimalizace přistoupeno k nastavení pipety mimo souřadnice, kde se pravděpodobně nalézá suspektní CTC. Tím se předešlo případné ztrátě CTC v důsledku vysvícení fluorescenčního barviva.

Až po nalezení špičky pipety bylo její ústí nasměrováno přímo k nádorové buňce a co možná nejrychleji provedena izolace (Obr. 15).



*Obr. 15:* Na mikroskopickém snímku je viditelné ústí špičky pipety pomalu nasávající nalezené buňky ze CytoDiscu™ (optický kanál FITC, zvětšení 20x, parfokální vzdálenost 0,75).

Z jednoho pacientského vzorku byla úspěšně provedena izolace dvou suspektních CTC a jednoho leukocytu. U dvou pacientských vzorků byla zaznamenána ztráta detekovaných buněk.

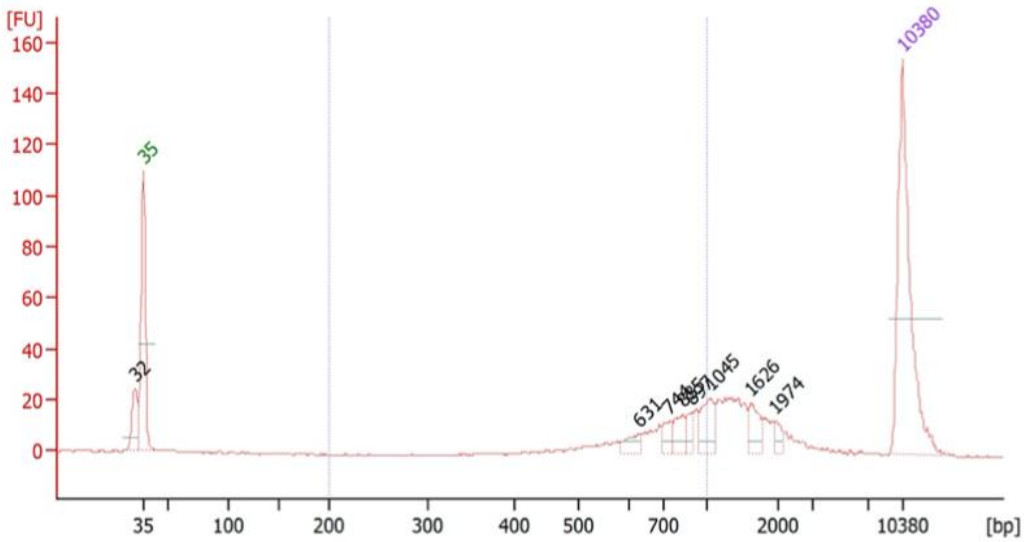
## 4.3 Optimalizace celogenomové amplifikace pro single-cell analýzu cirkulující nádorové buňky

Před provedením amplifikace na CTC izolovaných z pacientského vzorku byly optimalizovány tři amplifikační kity. Pro optimalizaci byl použit anonymizovaný vzorek nádorové gDNA která byla následně ředěna na množství 45 pg a 15 pg. Kromě referenčního DNA vzorku byla amplifikace provedena i na viabilních buňkách CCRF-CEM sortovaných do mikrozkumavek po třech buňkách do každé metodou průtokové cytometrie.

Kit Ampli1™ vykazoval výtěžky 38,35 ng z 15 pg gDNA a 41,65 ng z 45 pg gDNA na 50 µl reakci. Při aplikaci na viabilní buňky buněčné linie CCRF-CEM vykazoval výtěžnost reakce 42,43 ng (Tab. 16). Hodnoty výtěžnosti tohoto kitu byly ze všech testovaných kitů nejnižší a od aplikace Ampli1™ kitu na pacientské vzorky bylo upuštěno. Při kontrole kvality izolované DNA byla z elektroforeogramu patrná populace amplifikovaných fragmentů s délkou v rozmezí od 631 do 1974 bp (Obr. 16).

*Tab. 16:* Koncentrace vzorků a výtěžek reakce po provedení amplifikace amplifikačním kitem Ampli1™.

| Vzorek | Koncentrace (ng/µl) | | | Výtěžek na 50 µl reakce (ng) |
|---|---|---|---|---|
| | a | b | Průměr | |
| **15 pg gDNA** | 0,762 | 0,772 | 0,767 | 38,35 |
| **45 pg gDNA** | 0,819 | 0,847 | 0,833 | 41,65 |
| **CCRF-CEM** | 0,839 | 0,858 | 0,849 | 42,43 |

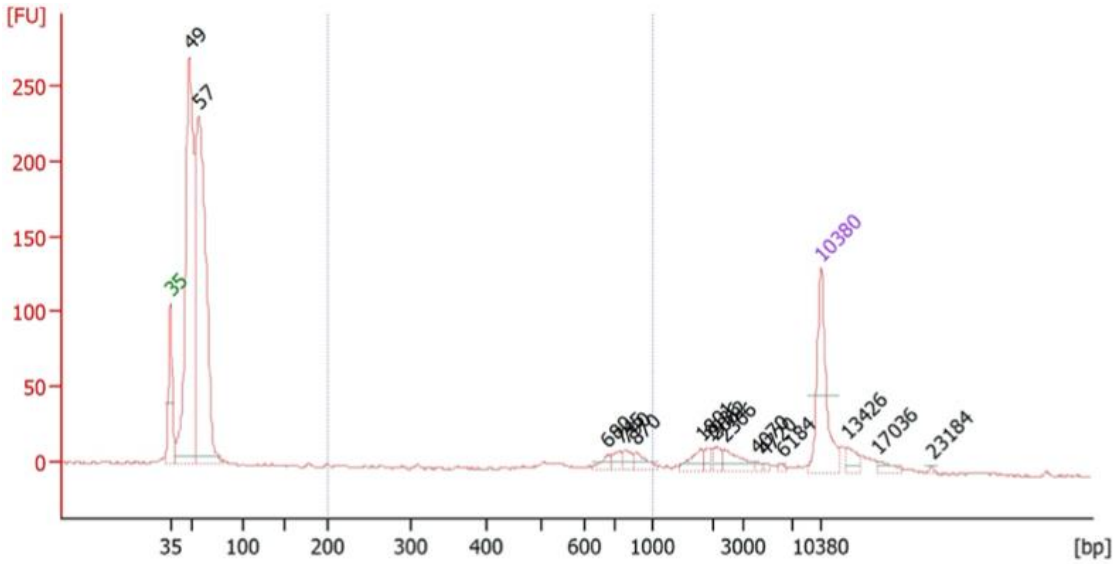



*Obr. 16:* Elektroforeogram vzorku amplifikovaného amplifikačním kitem Ampli1™ znázorňující distribuce velikostí fragmentů naamplifikované DNA. Označení [bp] = počet párů bazí (z anglického base pair), označení [FU] = fluorescenční jednotka (z anglického fluorescence unit). Peak označený zelenou číslicí v elektroforeogramu označuje dolní marker, fialově označený peak vymezuje naopak horní marker. Číslice nad každým peakem označuje počet párů bazí jednotlivých fragmentů.

Výtěžek reakcí u amplifikačního kitu MALBAC® byl 373,10 ng z 15pg gDNA a 497,90 ng z 45 pg gDNA na 65 µl reakci (Tab. 17). Při kontrole kvality DNA byly z elektroforeogramu amplifikačního produktu kitu MALBAC® viditelné dvě populace fragmentů s délkou v rozmezí od 680 bp do 6184 bp (Obr. 17).

*Tab. 17:* Koncentrace vzorků a výtěžek reakce po provedení amplifikace amplifikačním kitem MALBAC®

| Vzorek | Koncentrace (ng/µl) | | | Výtěžek na 65 µl reakce (ng) |
|---|---|---|---|---|
| | a | b | Průměr | |
| **15 pg gDNA** | 5,76 | 5,72 | 5,74 | 373,10 |
| **45 pg gDNA** | 8,12 | 7,20 | 7,66 | 497,90 |
| **CCRF-CEM** | 20,60 | 21,90 | 21,25 | 1593,00 |

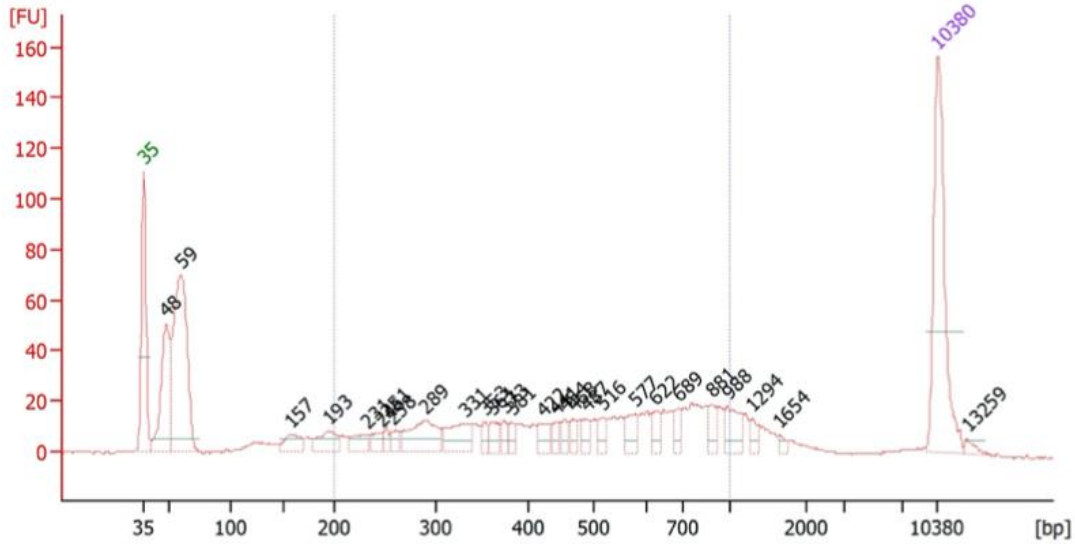



*Obr. 17:* Elektroforeogram vzorku amplifikovaného kitem MALBAC® znázorňující distribuce velikostí fragmentů naamplifikované DNA. Označení [bp] = počet párů bazí (z anglického base pair), označení [FU] = fluorescenční jednotka (z anglického fluorescence unit). Peak označený zelenou číslicí v elektroforeogramu označuje dolní marker, fialově označený peak vymezuje naopak horní marker. Číslice nad každým peakem označuje počet párů bazí jednotlivých fragmentů.

U PicoPlexu® byla výsledná výtěžnost 450 ng z 15 pg gDNA a 660 ng z 45 pg gDNA na 75 µl reakci (Tab. 18). Při kontrole kvality DNA byla z elektroforegramu viditelná populace amplifikovaných fragmentů s délkou v rozmezí od 157 bp do 1654 bp (Obr. 18).

*Tab. 18:* Koncentrace vzorků referenční gDNA a buněčné linie CCRF-CEM a výtěžnost reakce po provedení amplifikace amplifikačním kitem PicoPlex®.

| **Vzorek** | **Koncentrace (ng/µl)** | | | **Výtěžek na 75 µl reakce (ng)** |
|---|---|---|---|---|
| | a | b | Průměr | |
| **15 pg gDNA** | 5,76 | 6,24 | 6,00 | 450,00 |
| **45 pg gDNA** | 8,73 | 8,87 | 8,80 | 660,00 |
| **CCRF-CEM** | 5,92 | 5,80 | 5,86 | 439,50 |




*Obr. 18:* Elektroforeogram vzorku amplifikovaného kitem PicoPlex® znázorňující distribuce velikostí fragmentů naamplifikované DNA. Označení [bp] = počet párů bazí (z anglického base pair), označení [FU] = fluorescenční jednotka (z anglického fluorescence unit). Peak označený zelenou číslicí v elektroforeogramu označuje dolní marker, fialově označený peak vymezuje naopak horní marker. Číslice nad každým peakem označuje počet párů bází jednotlivých fragmentů.

Amplifikační kit PicoPlex® ve srovnání s amplifikačním kitem MALBAC® tedy vykazuje při aplikaci na referenční gDNA vyšší výtěžnost. Naopak při srovnání výtěžnosti amplifikační reakce genomu viabilních sortovaných buněk buněčné linie CCRF-CEM amplifikační kit MALBAC® vykazuje výtěžnost 1593 ng, což je několikanásobně kvalitnější výsledek než amplifikační kit PicoPlex® s hodnotou výtěžnosti 439,50 ng. S přihlédnutím k dalším okolnostem, které jsou blíže popsány v diskuzi byl pro amplifikaci nádorových buněk z pacientského vzoru zvolen amplifikační kit PicoPlex®.

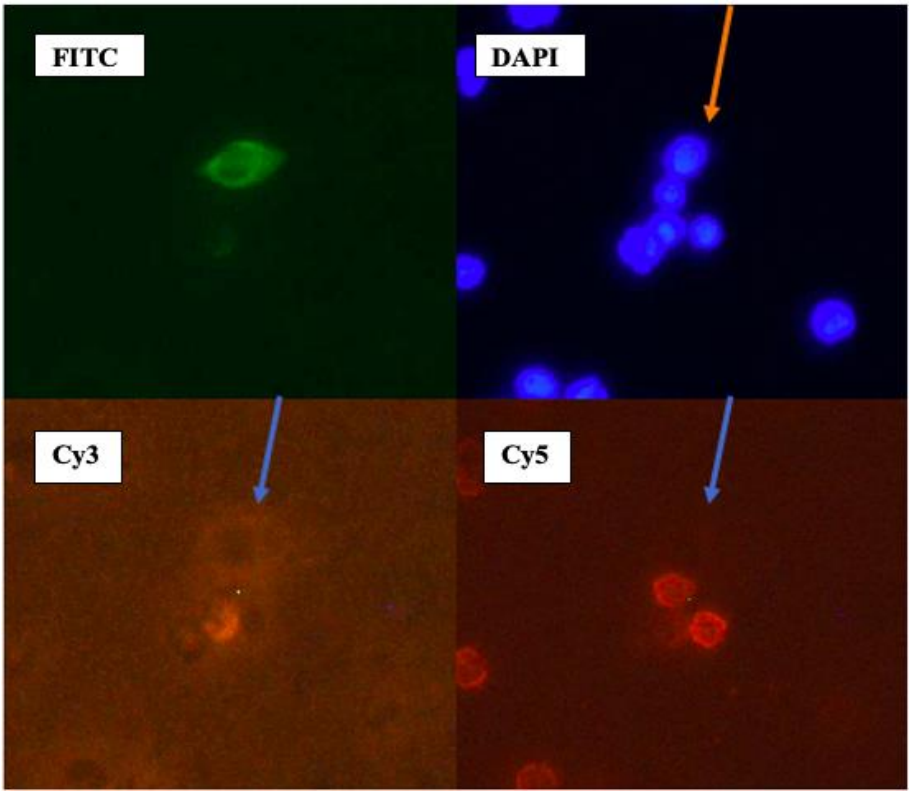
Před analýzou pacientského vzorku bylo ještě přistoupeno k otestování funkčnosti tohoto kitu na fixovaných buňkách, a to konkrétně na buněčné linii karcinomu ovaria IGR-1. Tyto nádorové buňky prošly stejně jako buňky z pacientského vzorku nanesením na CytoDisc™ a poté byly mikromanipulátorem CytoPicker™ izolovány do mikrozkumavek. Výsledné hodnoty amplifikace u buněčné linie IGR-1 prokázaly nadprůměrný výtěžek 1698,75 ng na 75 µl reakce, což ověřilo funkčnost kitu PicoPlex® na fixovaných buňkách (Tab. 19).

*Tab.19:* Koncentrace kontrolního vzorku buněčné linie karcinomu ovaria IGR-1 a pacientského vzorku CTC a výtěžnost reakce po provedení amplifikace zvoleným amplifikačním kitem PicoPlex®

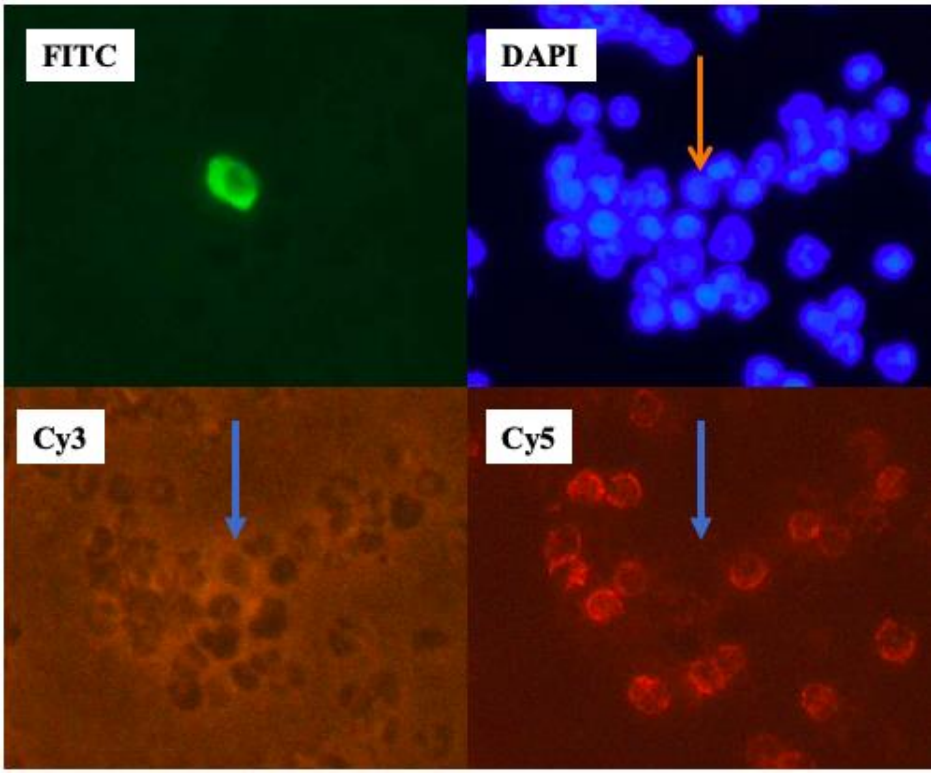
| **Vzorek** | **Koncentrace (ng/µl)** | | | **Výtěžek na 75 µl reakce (ng)** |
|---|---|---|---|---|
| | a | b | Průměr | |
| **IGR-1** | 22,70 | 22,60 | 22,65 | 1698,75 |
| **CTC 1** | 3,25 | 3,55 | 3,40 | 255 |
| **CTC 2** | 4,36 | 4,28 | 4,32 | 324 |
| **Leukocyt** | 4,25 | 3,75 | 4,00 | 300 |

Zakončením amplifikační části práce bylo provedení amplifikace na vybraných CTCs izolovaných z pacientských vzorků (Obr. 19 a Obr. 20), u jejichž výsledků byl ve srovnání s amplifikačním produktem buněčné linie IGR-1 pozorován pokles výtěžnosti, a to konkrétně na 255 ng u CTC1 a 324 ng u CTC2 (Tab. 19). Jako negativní kontrola pro správné vyhodnocení výsledků z microarray byl ze stejného pacientského vzorku náhodně vyselektován leukocyt. Výtěžnost amplifikační reakce provedené na leukocytárním genomu činila 300 ng na 75 µl reakci, což je opět nižší výsledek než u kontrolní IGR-1 (Tab. 19). Byla provedena i kapilární elektroforéza pro kontrolu pokrytí amplifikace pacientských vzorků. Z elektroforeogramů byla znatelná postupná degradace vzorků, která se projevila přítomností populace kratších fragmentů (v rozmezí od 40–60 bp) náležící patrně již lyzovaným fragmentům DNA. Tento výsledek bylo nutné brát v potaz při vyhodnocování dat z microarray, protože by mohl být příčinou snížené kvality výsledků. Z elektroforeogramu CTC1 byla pozorována pouze menší populace delších fragmentů pohybujících se v rozmezí 677–1681 bp. Naopak u CTC2 a leukocytu byly viditelná široká

spektra amplifikovaných fragmentů v rozmezí od 120 do 8111 bp a profily zmíněných vzorků vykazovaly značnou podobnost.



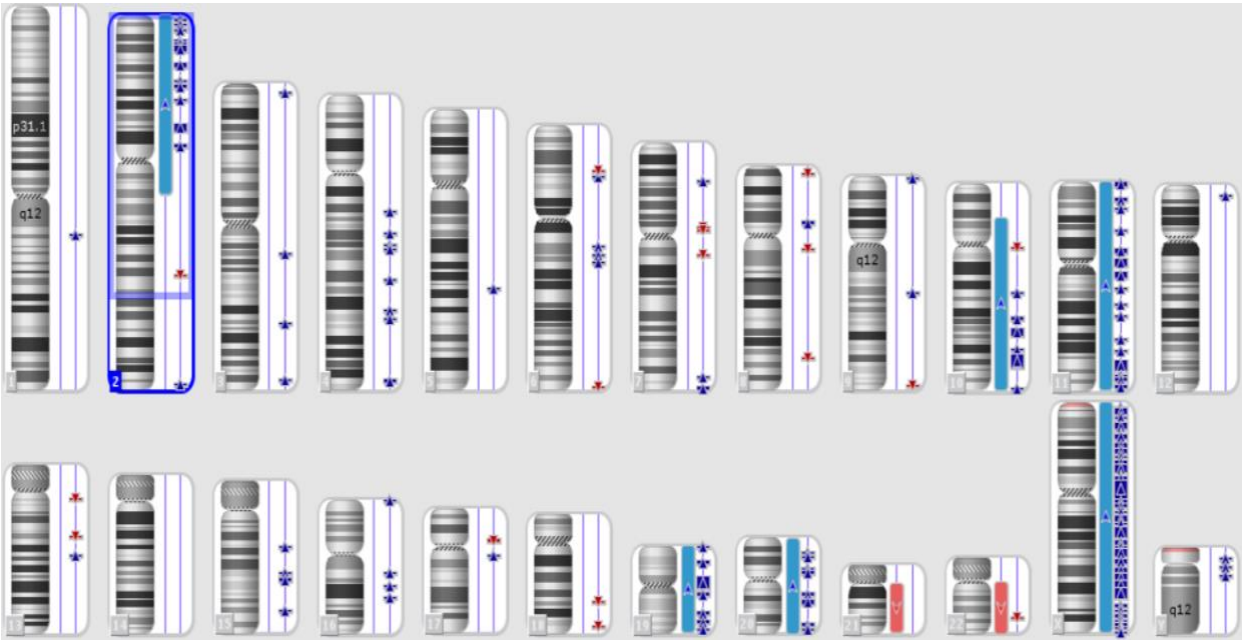

*Obr. 19:* Mikroskopické snímky cirkulující nádorové buňky (CTC 1) detekované z pacientského vzorku. Buňka byla vyselektována pro molekulární charakterizaci jejího genomu. Lokace nádorové buňky je označena šipkou, nastavený optický filtr je uveden v bílém rámečku v levé horní části snímku, u mikroskopického snímku je zvětšení 20x s parfokální vzdáleností 0,75.




*Obr. 20:* Mikroskopické snímky cirkulující nádorové buňky (CTC 2) detekované z pacientského vzorku. Buňka byla vyselektována pro molekulární charakterizaci jejího genomu. Lokace nádorové buňky je označena šipkou, nastavený optický filtr je uveden v bílém rámečku v levé horní části snímku, u mikroskopického snímku je zvětšení 20x s parfokální vzdáleností 0,75.

## 4.4 Detekce chromozomálních aberací na celogenomové úrovni metodou microarray

Pacientské vzorky dvou izolovaných suspektních CTC a kontrolní vzorek leukocytu náhodně vyselektovaného z totožného vzorku jako CTC byly zpracovány a oskenovány přístrojem GeneChip Scanner 3000 TG dle výše popsané microarray metody. Na Obr. 21 je znázorněn virtuální karyotyp cirkulující nádorové buňky (CTC 1). Analýzou CNV byla v genomu CTC identifikována duplikace krátkého raménka 2. chromozomu, duplikace krátkého raménka 10. chromozomu a duplikace obou ramének 11., 19. a 20. chromozomu. Delece byly nalezeny na dlouhých raméncích 21. a 22. chromozomu. Karyotyp CTC 2 na autozomech nevykazoval přítomnost žádné mutace, a proto lze usoudit, že se jednalo o leukocyt. Tuto hypotézu potvrdilo i srovnání profilů CTC 2 s kontrolním leukocytem, které byly prakticky shodné.




*Obr. 21:* Virtuální karyotyp cirkulující nádorové buňky z pacientského vzorku (modře zvýrazněné oblasti – duplikace, červeně zvýrazněné oblasti – delece).

# 5 Diskuze

V diplomové práci byla ověřena dostatečná citlivost a vhodnost automatické fluorescenční mikroskopie (technologie CytoTrack CT11™) pro identifikaci a následnou analýzu cirkulujících nádorových buněk ve vzorcích periferní krve pacientů s kolorektálním karcinomem. Celkově bylo analyzováno 122 vzorků periferní krve pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem ve stádiích I-III. U 68 pacientů byly vzorky odebrány předoperačně, u 54 z nich byly následně provedeny odběry po resekci tumoru. Předopoeračně byla zachycena přítomnost CTCs u 33,8 % vzorků, pooperačně u 29,6 % pacientů. Obdobnou analýzu vzorků pacientů metodou CytoTrack CT11™ popisuje i práce Gogenura a kolektivu na vzorcích pacientů s nemetastazujícím kolorektálním karcinomem, kteří podstoupili kurativní resekci laparoskopickým postupem. Pozitivní záchyt CTC byl sledován pouze u 3 vzorků z celkových 40 (tedy 7,5% pozitivní záchyt), a to konkrétně u jednoho pacienta pouze předoperačně a u jednoho pacienta jak předoperačně, tak pooperačně (Gogenur a kol., 2017). Markantní rozdíl v pozitivitě mezi diplomovou prací a Gogenurovou studií lze však zcela jednoznačně připisovat i skutečnosti, že studie analyzovala vzorky pouze 20 pacientů.

Ve studii Gorgese a kol. byly na detekci CTC testovány technologie CellSearch® a AdnaTest® , a to ze vzorků periferní krve pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem. Detekční metoda CellSearch® odhalila přítomnost CTC u 33 % vzorků. Při použití AdnaTestu® byla detekována přítomnost CTC u 30 % analyzovaných vzorků. Při porovnání výsledků CytoTrack CT11™ z diplomové práce s testovanými technologiemi CellSearch® a AdnaTest® z Gorgesovy studie lze konstatovat, že všechny tři metody vykazují srovnatelné výsledky s úspěšností detekce CTC u přibližně 30 % vzorků (Gorges a kol., 2016).

Detekce CTCs technologií CytoTrack CT11™ poskytuje řadu výhod, zejména rychlé skenování díky vysoké skenovací kapacitě až 100 miliónů buněk za minutu. Značně výhodná je i možnost analýzu kdykoliv přerušit a vrátit se k ní později, a to i opakovaně. Metoda však naráží i na limitace, zejména na časovou náročnost a subjektivnost vyhodnocování snímků. Problémem je i vzácný výskyt CTC ve vzorcích krve. Publikace Sipose a kol. tuto skutečnost připisují fenoménu EMT, kdy buňky ztrácejí expresi známých markerů a tím jsou hůře odlišitelné od leukocytů. EMT může zapříčinit nedostatečnou specifičnost využívaných protilátek při přípravě vzorků pro detekci. Studie Gogenura a kol. uvádí, že toto tvrzení prozatím není průkazné, ale jeho správnost by mohl podporovat i nález několika buněk, které

byly pozitivní jak na expresi cytokeratinů, tak na expresi CD45. Je možné, že tyto nalezené buňky patrně zrovna podstupovaly proces EMT, ale na druhou stranu by mohlo jít pouze o leukocyt s fagocytovanými fragmenty CTC. Jako další zdůvodnění se nabízí, že nízká hladina CTC je úzce spjata přímo s onemocněním kolorektálního karcinomu, respektive s anatomií kolorektálního krevního zásobení, kdy krev před vstupem do centrálního oběhu prochází portální žílou a játry, kde byl i studií Jiao a kolektivu potvrzen jejich vyšší výskyt než v centrálním oběhu (Gogenur a kol. 2017; Jiao a kol. 2009; Sipos a kol., 2012).

Ve srovnání se v současnosti jedinou detekční metodou schválenou FDA, kterou je CellSearch®, však poskytuje srovnatelné výsledky. Na komparaci zmíněných metod se zaměřila studie Hilliga a kol., která porovnávala úspěšnost in vitro detekce buněk z buněčné linie MCF-7 rakoviny prsu. Ze vzorků obsahujících 150 buněk této linie pak metoda CellSearch® detekovala celkem 107 buněk a metoda CytoTrack CT11™ pouze o čtyři méně. Metoda CytoTrack CT11™ ve srovnání se CellSearch® navíc poskytuje další značnou výhodu. Zatímco princip CellSearch® se přímo spoléhá na expresi EpCAM markeru nádorovými buňkami, metoda CytoTrack CT11™ není na jeho expresi přímo závislá. S přihlédnutím ke skutečnosti, že nádorové buňky postupují v krevním řečišti proces EMT, by mohl princip těchto metod hrát v úspěšnosti detekce zásadní roli (Hillig a kol., 2015).

Jedním z dalších benefitů technologie CytoTrack CT11™ je, že ve srovnání s technologií CellSearch® nabízí možnost prostřednictvím příslušenství CytoPicker™ izolovat nalezené CTC přímo ze CytoDiscu™. V rámci diplomové práce byla izolace nástrojem CytoPicker™ optimalizována a následně aplikována na izolaci CTCs z pacientských vzorků. Z jednoho pacientského vzorku byly optimalizovanou metodou úspěšně izolovány dvě cirkulující nádorové buňky a jeden leukocyt. U dalších dvou pacientských vzorků došlo z neznámého důvodu ke ztrátě cirkulující nádorové buňky. Mikromanipulační metoda izolace prostřednictvím nástroje CytoPicker™ byla využita i ve studii Smitha a kol., kterým se s 80,5% úspěšností podařilo ze 174 pokusů izolovat 140 buněk. Ztrátu buněk připisují jednak náhlým změnám tlaku vzduchu v pipetě, což vyústilo v nechtěné vypuzení buňky z ústí pipety, ale připouští i možnost přilnutí buňky k povrchu pipety (Smith a kol., 2019). V diplomové práci byla ztráta nádorových buněk způsobena pravděpodobně přilnutím buňky ke krycímu sklu, protože ztráta buněk byla zaznamenána bezprostředně po vložení CytoDiscu™ do skenovacího zařízení CytoTracku CT11™, ještě před zahájením samotné izolace. Kromě náročnosti z hlediska manipulace se vzorkem metoda naráží taktéž na značnou časovou náročnost izolace. Nabízí však i řadu výhod,

zejména možnost nastavit ústí špičky pipety přímo k nalezené CTC, kterou lze následně izolovat bez kontaminace okolními buňkami. Celý proces je navíc možné sledovat kamerovým systémem, a to s možností využití všech optických filtrů.

Izolace jednotlivých CTC umožňuje následnou molekulárně genetickou analýzu. Součástí diplomové práce byla optimalizace tří vybraných amplifikačních kitů Ampli1™, MALBAC® a PicoPlex®. Amplifikace byla provedena na anonymizovaném vzorku referenční nádorové gDNA ředěné na množství 15 pg a 45 pg a na viabilních buňkách buněčné linie CCRF-CEM nasortovaných průtokovou cytometrií.

Amplifikační kit Ampli1™ je kompatibilní s mnoha metodami molekulární charakterizace jako sekvenování, pyrosekvenování, microarrays, NGS a řadou dalších. Podle studie Needhama a kol. prováděné na fixovaných buňkách buněčné linie SKBR3 se jedná o kit ideální pro aplikaci na fixované preparáty. Po provedení amplifikace kitem Ampli1™ byla u všech testovaných vzorků zjištěna nedostatečná výkonnost kitu. Nepřesvědčivé výsledky mohly být způsobeny požadavkem výrobců na velmi nízký vstupní objem vzorku, který by měl činit maximálně 1 µl, čímž byla rapidně zhoršena manipulace se vzorkem a mohlo dojít k zanesení chyby během pipetování. Současně je ze všech amplifikačních kitů časově nejnáročnější a jako jediný z testovaných kitů probíhá v pěti krocích, což taktéž zvyšuje riziko zatížení experimentu jednak pipetovací chybou, ale i dalšími nepříznivými jevy jakým je kupříkladu zvýšená pravděpodobnost zanesení kontaminace.

Zhoršené výsledky kitu Ampli1™ ve srovnání s kity MALBAC® a PicoPlex® zaznamenala i studie Carretta a kol., jež optimalizovala amplifikaci těmito kity na hematopoetických kmenových buňkách. Studie poukazuje na to, že limitací Ampli1™ kitu by v tomto případě mohl být princip, na němž je kit založen. Tedy že došlo činností restrikčního enzymu k nadměrnému naštěpení DNA. Z výsledků studie bylo znatelné, že amplifikace provedená Ampli1™ kitem vykazovala nižší výtěžek a nižší distribuci délky fragmentů (Carretta a kol., 2020).

Amplifikační kit MALBAC® nabízí široké uplatnění na poli molekulární charakterizace, a to zejména u real-time PCR, sekvenování nové generace, analýzy bodových mutací Sangerovým sekvenováním, microarray nebo detekce aneuploidií a CNV. S využitím kitu MALBAC® bylo dosaženo vyššího výtěžku amplifikace nádorové gDNA než u amplifikačního kitu Ampli1™. Naopak ve srovnání s amplifikačním kitem PicoPlex® byly výsledky výtěžnosti amplifikační reakce u vzorků gDNA nižší. Obvzláště nadprůměrné

výsledky výtěžnosti amplifikační kit MALBAC® vykazoval u amplifikace genomu viabilních buněk buněčné linie CCRF-CEM, které byly ze všech testovaných kitů nejvyšší. O dobrých výsledcích tohoto amplifikačního kitu hovoří i studie Borgströma a kol., jež srovnávala čtyři nejpoužívanější amplifikační kity včetně MALBAC®, Ampli1™ a PicoPlex® na lidských buňkách buněčné linie HepG2 karcinomu jater. Dle výsledků studie vykazoval kit MALBAC® nejrovnoměrnější distribuci hloubky čtení a s vyhodnocením dalších statistik např. po analýze variant calling nebo pokrytí čtení exomu byl tento WGA komerční kit Borgströmovou studií vyhodnocen jako nejoptimalnější pro amplifikaci na single-cell úrovni (Borgström a kol., 2017). Na rozdílné výsledky zmíněné studie a diplomové práce by mohla mít vliv rozdílná povaha a původ testovaných vzorků.

Limitací MALBAC® amplifikačního kitu je jeho velmi nízký požadovaný vstupní objem, což ztěžuje průběh při izolování buněk CytoPickerem™. V rámci diplomové práce je i značnou nevýhodou možné zatížení výsledků chybou při využití kitu na fixovaných preparátech.

Amplifikačním kitem PicoPlex® lze amplifikovat genom z fixovaného preparátu, a to pomocí jednoduchého a časově nenáročného postupu. Ve srovnání s amplifikačními kity MALBAC® a Ampli1™ je možné pracovat s vyšším vstupním objemem. To usnadňuje izolaci buněk mikromanipulátorem CytoPicker™ a poskytuje spolehlivé reproducibilní užívání této mikromanipulační techniky, což by v budoucnu mohlo hrát zásadní roli v aplikovatelnosti kitu do rutinního použití. U amplifikace gDNA tímto amplifikačním kitem bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti reakce ze všech testovaných kitů. U amplifikace genomu CCRF-CEM sortovaných viabilních buněk byl zaznamenán viditelný úbytek koncentrace a ve srovnání s MALBAC® byla snížena i výtěžnost reakce, je však nutné brát ohled na možné zanesení chyby v průběhu sortování buněk, při kterém se pracuje pouze s nanolitrovými objemy.

Pro další analýzu byl vybrán kit PicoPlex®. Byla ověřena jeho aplikovatelnost na fixovaných preparátech amplifikací genomu fixovaných buněk buněčné linie IGR-1 karcinomu ovaria. Vzhledem k výsledným hodnotám výtěžnosti reakce bylo ověřeno, že je na fixovaných preparátech amplifikační kit PicoPlex® funkční. Využitelnost amplifikačního kitu PicoPlex® při aplikaci na fixované preparáty otestovala i studie Needhama a kol. na fixovaných CTC buněčné linie SKBR3. Studie uvádí, že výsledky amplifikace kitem PicoPlex® vykazovaly genomové aberace konzistentní s neamplifikovanou genomickou DNA a nezdálo se, že by fixace nepříznivě ovlivnila výkonnost PicoPlexu® (Needham a kol.,

2016). V závěrečném kroku amplifikace byl amplifikační kit PicoPlex® aplikován na amplifikaci genomu CTC z pacientských vzorků a na amplifikaci genomu náhodně vyselektovaného leukocytu. Výtěžnost reakce byla u všech třech vzorků nižší ve srovnání s hodnotami u fixovaných buněk buněčné linie IGR-1. Jak u CTCs, tak u leukocytu je však nutné brát v potaz postupnou degradaci vzorku dlouhodobým skladováním a opakovaným rozmrazování a zmrazováním vzorku. Výsledky však byly vyhodnoceny jako dostačující pro provedení molekulární charakterizace.

Jednou z metod molekulární charakterizace CTCs je microarray, jež vyžaduje relativně nízké množství vstupního materiálu, a to i v nevyhovující kvalitě. Byla provedena array dvou cirkulujících nádorových buněk a jednoho leukocytu ze stejného pacientského vzorku. U CTC1 byl identifikován aberantní genomický profil, avšak u druhé domnělé cirkulující nádorové buňky se genomický profil podobal profilu leukocytu. To, že se u suspektní nádorové buňky ve skutečnosti jednalo o leukocyt, mohlo být pravděpodobně způsobeno subjektivností při vyhodnocování detekovaných hotspotů nebo špatným nasměrováním ústí pipety při izolaci buňky CytoPickerem™.

U aberantního genomického profilu potvrzené cirkulující nádorové buňky byla zjištěna duplikace krátkého raménka 2. chromozomu, duplikace krátkého raménka 10. chromozomu a duplikace obou ramének 11., 19. a 20. chromozomu. Delece byly nalezeny na dlouhých raméncích 21. a 22. chromozomu.

Analýzou chromozomálních aberací u nádorových buněk kolorektálního karcinomu se zabývala i studie publikovaná Tsafrirem a kolektivem, jež uvádí, že pro buňky kolorektálního karcinomu je charakteristická obzvláště přítomnost duplikací na dlouhém raménku 20. chromozomu. Připouští taktéž duplikace i na krátkém raménku 20. chromozomu, ale jejich přítomnost byla detekována pouze u malé podskupiny primárních nádorů. Chromozomální abnormality na 20. chromozomu byly potvrzeny i v rámci této práce, což přispívá k závěru, že izolovaná buňka byla cirkulující nádorovou buňkou původem z kolorektálního karcinomu.

Jako oblasti s častým výskytem delecí práce Tsafrira a kol. uvádí kupříkladu dlouhá raménka 5., 14. a 15. chromozomu nebo krátká raménka 1. a 17. chromozomu. V tomto případě se výsledky diplomové práce s publikovanými výsledky Tsafrirovy studie sice rozcházejí, ale je nutné brát v úvahu heterogenní povahu nádorových buněk.

Z karyotypu CTC2 nebyly na autozomech zřetelné žádné chromozomové aberace. To podporuje hypotézu, že detekovaná buňka není nádorového charakteru a vskutku se jednalo o leukocyt.

Vedlejším nálezem byla duplikace chromozomu X ve všech třech vzorcích identického pacienta mužského pohlaví. Mohlo by se jednat o pacienta s Klinefelterovým syndromem, pro který je zjištěný karyotyp 47,XXY typický, nález by měl být ověřen z nezávislého odběru rutinní metodou. Klinefelterův syndrom je nejčastější aneuploidií pohlavních chromozomů pozorovanou u mužů s prevalencí 1:500–1:1000 V naprosté většině případů se Klineferterův syndrom projevuje pouze mírným fenotypem, často obtížně odlišitelným od zbytku populace. Většina mužů s tímto syndromem však trpí neplodností (Pizzocaro a kol., 2020).

# 6 Závěr

Předložená diplomová práce se věnuje detekci a molekulární charakterizaci cirkulujících nádorových buněk u pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem. Pro detekci buněk byla využita technologie CytoTrack CT11™ vyznačující se vysokou skenovací kapacitou. I přes časovou náročnost a subjektivnost hodnocení byla ověřena funkčnost technologie CytoTrack CT11™ a cirkulující nádorové buňky byly úspěšně detekovány ve zhruba 30 % vzorků pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem ve stádiích I - III. Pro izolaci nalezených suspektních CTC byla optimalizována mikromanipulační technika nástrojem CytoPicker™. Po optimalizaci byly úspěšně izolovány nalezené buňky. Pro potřeby molekulární charakterizace byla optimalizována metoda DNA amplifikace amplifikačními kity Ampli1™, MALBAC® a PicoPlex®. Nejlepší výsledky vykazoval amplifikační kit PicoPlex®, který byl následně aplikován na amplifikaci CTC z pacientských vzorků. Byla provedena molekulární charakterizace metodou microarray a byl zjištěn nádorový profil u jedné z vyselektovaných CTCs.

Závěrem lze konstatovat, že detekce technologií CytoTrack CT11™, izolace nástrojem CytoPicker™ a molekulární charakterizace metodou microarray je náročný, ale proveditelný postup, který umožňuje studovat molekulární vlastnosti nádorů na jednobuěnčné úrovni.

## Seznam použité literatury


Adam, Z., Krejčí, M., & Vorlíček, J. (2010). *Speciální onkologie. Příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob* (Vol. 1000). Galén.

Adams, D. L., Stefansson, S., Haudenschild, C., Martin, S. S., Charpentier, M., Chumsri, S., Cristofanilli M., Tang C.M. & Alpaugh, R. K. (2015). Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the cellsearch® CTC test. *Cytometry Part A*, *87*(2), 137-144.

Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2013). Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clinical chemistry*, *59*(1), 110-118.

Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2015). Liquid biopsy in cancer patients: advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay. *Expert review of molecular diagnostics*, *15*(11), 1411-1417.

Alunni-Fabbroni, M., & Sandri, M. T. (2010). Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods*, *50*(4), 289-297.

Angerilli, V., Galuppini, F., Pagni, F., Fusco, N., Malapelle, U., & Fassan, M. (2021). The role of the pathologist in the next-generation era of tumor molecular characterization. *Diagnostics*, *11*(2), 339.

Astin, M., Griffin, T., Neal, R. D., Rose, P., & Hamilton, W. (2011). The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *British Journal of General Practice*, *61*(586), e231-e243.

Babayan, A., Alawi, M., Gormley, M., Müller, V., Wikman, H., McMullin, R. P.,Smirnov D.A., Li W., Geffken M., Pantel K. & Joosse, S. A. (2017). Comparative study of whole genome amplification and next generation sequencing performance of single cancer cells. *Oncotarget*, *8*(34), 56066.

Beije, N., Jager, A., & Sleijfer, S. (2015). Circulating tumor cell enumeration by the CellSearch system: the clinician's guide to breast cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, *41*(2), 144-150.

Borgström, E., Paterlini, M., Mold, J. E., Frisen, J., & Lundeberg, J. (2017). Comparison of whole genome amplification techniques for human single cell exome sequencing. *PloS one*, *12*(2), e0171566.

Bouchalová, K., Hajdúch, M., Bouchal, J., Hlobilková, A., Houdová, M., Hudcová, M., Koudeláková V., Medalová J., Srovnal J. & Trojanec, R. (2016). *Prediktivní a prognostická onkologie*. Univerzita Palackého v Olomouci.

Brenner, H., & Chen, C. (2018). The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *British journal of cancer*, *119*(7), 785–792.

Büchler, T. a kolektiv (2017). *Speciální onkologie*. Praha: Maxdorf Jessenius.

Carretta, C., Mallia, S., Genovese, E., Parenti, S., Rontauroli, S., Bianchi, E., Fantini, S., Sartini, S., Tavernari, L., Tagliafico, E. & Manfredini, R. (2020). Genomic analysis of hematopoietic stem cell at the single-cell level: optimization of cell fixation and whole genome amplification (WGA) protocol. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), 7366.

Chikaishi, Y., Yoneda, K., Ohnaga, T., & Tanaka, F. (2017). EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a 'universal CTC-chip'. *Oncology reports*, *37*(1), 77-82.

Chinen, L. T. D. (Ed.). (2021). *Atlas of Liquid Biopsy: Circulating Tumor Cells and Other Rare Cells in Cancer Patients' Blood*. Springer Nature.

Cho, H., Kim, J., Song, H., Sohn, K. Y., Jeon, M., & Han, K. H. (2018). Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation. *Analyst*, *143*(13), 2936-2970.

Cortés-Hernández, L. E., Eslami-S, Z., Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2020). Molecular and functional characterization of circulating tumor cells: from discovery to clinical application. *Clinical Chemistry*, *66*(1), 97-104.

Čihák, R., & Grim, M. (2019). Anatomie 2: Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2013.

Dasgupta, A., Lim, A. R., & Ghajar, C. M. (2017). Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Molecular oncology*, *11*(1), 40-61.

Fabisiewicz, A., & Grzybowska, E. (2017). CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Medical Oncology*, *34*(1), 1-10.

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, *61*(5), 759-767.

Ferreira, M. M., Ramani, V. C., & Jeffrey, S. S. (2016). Circulating tumor cell technologies. *Molecular oncology*, *10*(3), 374-394.

Gerges, N., Rak, J., & Jabado, N. (2010). New technologies for the detection of circulating tumour cells. *British medical bulletin*, *94*(1), 49-64.

Gogenur, M., Hillig, T., & Gogenur, I. (2017). CytoTrack analysis reveals low presence of circulating tumor cells in the perioperative period in patients with non-metastatic colorectal cancer. *Anticancer Research*, *37*(6), 3099-3103.

Gorges, T. M., Stein, A., Quidde, J., Hauch, S., Röck, K., Riethdorf, S., Joosse, S.A. & Pantel, K. (2016). Improved detection of circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer by the combination of the CellSearch® system and the AdnaTest®. *PloS one*, *11*(5), e0155126.

Harouaka, R., Kang, Z., Zheng, S. Y., & Cao, L. (2014). Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*, *141*(2), 209-221.

Harrison, S., & Benziger, H. (2011). The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *The surgeon*, *9*(4), 200-210.

Heidrich, I., Abdalla, T. S., Reeh, M., & Pantel, K. (2021). Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as a liquid biopsy marker in colorectal cancer. *Cancers*, *13*(18), 4500.

Hillig, T., Horn, P., Nygaard, A. B., Haugaard, A. S., Nejlund, S., Brandslund, I., & Sölétormos, G. (2015). In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods. *Tumor Biology*, *36*, 4597-4601.

Holubec, L. a kolektiv (2004). *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. Grada Publishing.

Hsieh, H. B., Marrinucci, D., Bethel, K., Curry, D. N., Humphrey, M., Krivacic, R. T., Kroener J., Kroener L., Ladanyi A., Lazarus N., Kuhn P., Bruce R.H. & Nieva, J. (2006). High speed detection of circulating tumor cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *21*(10), 1893-1899.

Hudák, R., & Kachlík, D a kolektiv. (2015). *Memorix anatomie*. Triton, Praha.

Hayashi, N., Nakamura, S., Tokuda, Y., Shimoda, Y., Yagata, H., Yoshida, A., Hidekazu, O., Hortobagyi G.N., Cristofanilli M. & Ueno, N. T. (2012). Prognostic value of HER2-positive circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *International journal of clinical oncology*, *17*, 96-104.

Ihnát, P. (2021). *Karcinom rekta – Od diagnózy po multidisciplinární léčbu*. Grada Publishing.

Jablonská, M. (2000). *Kolorektální karcinom-časná diagnóza a prevence*. Grada Publishing.

Jiao, L. R., Apostolopoulos, C., Jacob, J., Szydlo, R., Johnson, N., Tsim, N., Habib N.A., Coomes C.R. & Stebbing, J. (2009). Unique localization of circulating tumor cells in patients with hepatic metastases. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(36), 6160-6165.

Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control*, *24*(6), 1207-1222.

Joosse, S. A., Gorges, T. M., & Pantel, K. (2015). Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO molecular medicine*, *7*(1), 1-11.

Keller, L., Werner, S., & Pantel, K. (2019). Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell stress*, *3*(6), 165.

Keum, N., & Giovannucci, E. L. (2017). Epidemiology of colorectal cancer. In *Pathology and epidemiology of cancer* (pp. 391-407). Springer, Cham.

Kim, Y. R., Yoo, J. K., Jeong, C. W., & Choi, J. W. (2018). Selective killing of circulating tumor cells prevents metastasis and extends survival. *Journal of hematology & oncology*, *11*(1), 1-4.

Krebs, M. G., Sloane, R., Priest, L., Lancashire, L., Hou, J. M., Greystoke, A., Ward, T.H., Ferraldeschi, R., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Dive, C. & Blackhall, F. H. (2011). Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non–small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*, *29*(12), 1556-1563.

Krška, Z., Frýba V. & Zavoral M. et al. (2021). *Krvácení do trávicího traktu: aktuální poznatky v diagnostice a léčbě*. Praha: Stanislav Juhaňák, Triton Praha.

Lampignano, R., Schneck, H., Neumann, M., Fehm, T., & Neubauer, H. (2017). Enrichment, isolation and molecular characterization of EpCAM-negative circulating tumor cells. *Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells*, 181-203.

Lianidou, E. S., & Markou, A. (2011). Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clinical chemistry*, *57*(9), 1242-1255.

Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu F., Zhou D., Zheng S., Chen Y. & Zhou, J. (2021). Circulating tumor cells: Biology and clinical significance. *Signal transduction and targeted therapy*, *6*(1), 1-24.

Linder, S., Olofsson, M. H., Herrmann, R., & Ulukaya, E. (2010). Utilization of cytokeratin-based biomarkers for pharmacodynamic studies. *Expert review of molecular diagnostics*, *10*(3), 353-359.

Lipská, L. (2009). *Recidiva kolorektálního karcinomu*. Grada Publishing as.

Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *20*, 781-810.

Lowes, L. E., & Allan, A. L. (2014). Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells. *Cancers*, *6*(1), 595-624.

Lu, Y. T., Zhao, L., Shen, Q., Garcia, M. A., Wu, D., Hou, S., Song M., Xu X., OuYang W.H., OuYang W.W.L., Lichterman J., Luo Z., Xuan X., Huang J., Chung L.W.K., Rettig M., Tseng H.R., Shao Ch. & Posadas, E. M. (2013). NanoVelcro Chip for CTC enumeration in prostate cancer patients. *Methods*, *64*(2), 144-152.

Magbanua, M. J. M., & Park, J. W. (Eds.). (2017). *Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing.

Man, Y., Wang, Q., & Kemmner, W. (2011). Currently used markers for CTC isolation-advantages, limitations and impact on cancer prognosis. *J Clinic Experiment Pathol*, *1*(1), 1-7.

Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, *18*(1), 197.

Markussen T.H. (2017) CytoTrack CT11$^{TM}$ New technology for detection and isolation of Circulating tumor cells, for subsequent molecular analysis. *CytoTrack ApS.*

McQuade, R.M., Stojanovska, V., C Bornstein, J., & Nurgali, K. (2017). Colorectal cancer chemotherapy: the evolution of treatment and new approaches. *Current medicinal chemistry*, *24*(15), 1537-1557.

Mello, M. R. S. P. D., Moura, S. F., Muzi, C. D., & GuimarÃes, R. M. (2020). Clinical evaluation and pattern of symptoms in colorectal cancer patients. *Arquivos de gastroenterologia*, *57*, 131-136.

Mirnezami, R., Chang, G. J., Das, P., Chandrakumaran, K., Tekkis, P., Darzi, A., & Mirnezami, A. H. (2013). Intraoperative radiotherapy in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of techniques, long-term outcomes, and complications. *Surgical oncology*, *22*(1), 22-35.

Mojarad, E. N., Kuppen, P. J., Aghdaei, H. A., & Zali, M. R. (2013). The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, *6*(3), 120.

Needham, R. H., Ramirez, A. B., Kishawi, I., Stilwell, J. L., & Kaldjian, E. P. (2016). Comparison of whole genome amplification methods on single and pooled cells for comparative genomic hybridization array analysis. *Cancer Research*, *76*(14_Supplement), 3615-3615.

Pizzocaro, A., Vena, W., Condorelli, R., Radicioni, A., Rastrelli, G., Pasquali, D., .Selice, R., Ferlin, A., Foresta, C., Jannini, E.A., Maggi, M., Lenzi, A., Pivonello, R., Isidori, A.M., Garolla, A., Francavilla, S., Corona, G. & King, Klinefelter ItaliaN Group. (2020). Testosterone treatment in male patients with Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endocrinological Investigation*, *43*, 1675-1687.

Poulet, G., Massias, J., & Taly, V. (2019). Liquid biopsy: general concepts. *Acta cytologica*, *63*(6), 449-455.

Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival and risk factors. *Gastroenterology Review/ Przegląd Gastroenterologiczny*, *14*(2), 89-103.

Rhee, Y. Y., Kim, K. J., & Kang, G. H. (2017). CpG island methylator phenotype-high colorectal cancers and their prognostic implications and relationships with the serrated neoplasia pathway. *Gut and liver*, *11*(1), 38.

Rosen, R. D., & Sapra, A. (2021). TNM classification. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Rückert, F., Pilarsky, C., & Grützmann, R. (2010). Serum tumor markers in pancreatic cancer—recent discoveries. *Cancers*, *2*(2), 1107-1124.

Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*, *13*(9), 2025.

Seeber, A., & Gastl, G. (2016). Targeted therapy of colorectal cancer. *Oncology research and treatment*, *39*(12), 796-802.

Sequist, L. V., Nagrath, S., Toner, M., Haber, D. A., & Lynch, T. J. (2009). The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *Journal of Thoracic Oncology*, *4*(3), 281-283.

Shinawi, M., & Cheung, S. W. (2008). The array CGH and its clinical applications. *Drug discovery today*, *13*(17-18), 760-770.

Sipos, F., & Galamb, O. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World journal of gastroenterology: WJG*, *18*(7), 601.

Slabý, O. a kolektiv (2015). *Molekulární medicína*. Galén.

Smith, J., Mathisen, A. F., Funch Richardt, N., Vander Plaetsen, A. S., Van Nieuwerburgh, F., Stender, H., & Hillig, T. (2019). Feasibility of single-cell analysis of model cancer and foetal cells in blood after isolation by cell picking. *Tumor Biology*, *41*(2), 1010428318823361.

Steinke, V., Engel, C., Büttner, R., Schackert, H. K., Schmiegel, W. H., & Propping, P. (2013). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Deutsches Ärzteblatt International*, *110*(3), 32.

Tan, C., & Du, X. (2012). KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, *18*(37), 5171.

Thorsteinsson, M., & Jess, P. (2011). The clinical significance of circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer – a review. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, *37*(6), 459-465.

Tjensvoll, K., Nordgård, O., & Smaaland, R. (2014). Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications. *International journal of cancer*, *134*(1), 1-8.

Tsafrir, D., Bacolod, M., Selvanayagam, Z., Tsafrir, I., Shia, J., Zeng, Z., Liu H., Krier C., Stengel R.F., Barany F., Gerald W.L., Paty P.B., Domany E. & Notterman, D. A. (2006). Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer research*, *66*(4), 2129-2137.

Turnbull, R. B., Kyle, K., Watson, F. R., & Spratt, J. (1967). The influence of the no-touch isolation technique on survival rates. *Ann Surg*, *166*, 420-425.

Venugopal, A., & Carethers, J. M. (2022). Epidemiology and biology of early onset colorectal cancer. *EXCLI journal*, *21*, 162.

Vyzula, R., & Žaloudík, J. (2007). *Rakovina tlustého střeva a konečníku: vybrané kapitoly*. Maxdorf.

Wang, L., Balasubramanian, P., Chen, A. P., Kummar, S., Evrard, Y. A., & Kinders, R. J. (2016). Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. In *Seminars in oncology* (Vol. 43, No. 4, pp. 464-475). WB Saunders.

Williams, E. S., Rodriguez-Bravo, V., Chippada-Venkata, U., Iglesia-Vicente, J. D. I., Gong, Y., Galsky, M., Oh, W., Cordon-Cardo, C. & Domingo-Domenech, J. (2015). Generation of prostate cancer patient derived xenograft models from circulating tumor cells. *Journal of Visualized Experiments: Jove*, (104).

Worthley, D. L., & Leggett, B. A. (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical biochemist. Reviews*, *31*(2), 31–38.

Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, *5*(1), 1-30.

Xu, W., Zhou, G., Wang, H., Liu, Y., Chen, B., Chen, W., Lin C., Wu S., Gong A. & Xu, M. (2020). Circulating lncRNA SNHG11 as a novel biomarker for early diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *International journal of cancer*, *146*(10), 2901-2912.

Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2011). Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *Journal of Cell Biology*, *192*(3), 373-382.

Yuan, R. Q., Zhao, H., Wang, Y., Song, K., Yang, J., He, W., Miao, D.Z., Wang, Q. & Jia, Y. H. (2022). SEPTIN9-SDC2-VIM methylation signature as a biomarker for the early diagnosis of colorectal cancer. *American journal of cancer research*, *12*(7), 3128.

Zavoral, M., Vojtěchová, G., & Suchánek, Š. (2013). Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie*, *7*(4), 172-175.

## Seznam použitých internetových zdrojů

Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, Brno. [cit. 2022-11-15] Dostupné z: http://www.svod.cz.

Kolorektum.cz – Colorectal Screening Programme in the Czech republic [online]. Masarykova univerzita, Brno. [cit. 2022-11-15] Dostupné z: https://www.kolorektum.cz.

World Health Organization International Afency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020. [cit. 2022-11-15] Dostupné z: https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers.