

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Lucie Rejchlíková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Přehled vysokokapacitních metod pro diagnostiku rakoviny

Lucie Rejchlíková

Bakalářská práce

2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie Rejchlíková**
Osobní číslo: **C20260**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Přehled vysokokapacitních metod pro diagnostiku rakoviny**
Téma práce anglicky: **A Review of High-throughput Methods for Cancer Diagnosis**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma vysokokapacitní metody pro diagnostiku rakoviny
 - a) Současné metody vyšetření
 - b) Přehled metod
 - c) Nové trendy v diagnostice

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem: Přehled vysokokapacitních metod v diagnostice rakoviny, jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29.5.2024

Lucie Rejchlíková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D., za jeho cenné odborné rady, trpělivost a podporu během celé práce. Také bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

ANOTACE

V této bakalářské práci se zabývám problematikou rakoviny. V první části teorie je popsán výskyt rakoviny, její typy a příčiny. V další části jsem se zaměřila především na vysokokapacitní metody v diagnostice rakoviny. Cílem je posoudit účinnost různých metod, od dříve používaných, současných až po nejnovější metody a trendy. Zaměřuji se zde především na molekulárně-biologické metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rakovina, diagnostika, markery, nádory, metody, technologie

ANNOTATION

In this bachelor's thesis, I deal with the issue of cancer. The first part of the theory describes the occurrence of cancer, its types and causes. In the next part, I mainly encountered high-capacity methods in cancer diagnosis. The aim is to assess the effectiveness of different methods, from previously used, current to the latest methods and trends. I focus here mainly on molecular-biological methods

KEYWORDS

Cancer, diagnosis, markers, tumors, methods, technologies

1. Obsah

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD	11
1. RAKOVINA	12
1.1. Nádorové buňky	13
1.1.1. Cirkulující nádorové buňky	13
1.1.2. Nádorové iniciující buňky	13
1.2. BIOLOGICKÁ KLASIFIKACE NÁDORŮ	14
1.2.1. Benigní nádory	14
1.2.2. Maligní nádory	15
1.3. HISTOGENETICKÁ KLASIFIKACE NÁDORŮ	15
1.3.1. Mezenchymové nádory	16
1.3.2. Neuroektodermové nádory	16
1.3.3. Mezoteliomy	17
1.3.4. Nádory epitelové	17
1.3.5. Germinální nádory	17
2. METODY VYŠETŘENÍ	18
2.1. Zobrazovací metody	18
2.2. Cytologické metody	19
2.3. Genetické metody	19
3. MOLEKULÁRNĚ-DIAGNOSTICKÉ METODY	20
3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	20
3.2. Kvantitativní PCR v reálném čase	20
3.3. Methylace DNA	21
3.3.1. Detekce methylace tumoru v krvi	23
3.4. Sekvenování	24
3.4.1. Sangerovo sekvenování	25
3.4.2. Sekvenování nové generace (NGS)	26

3.4.3.	Princip sekvenování v diagnostice rakoviny	30
3.5.	Hybridizační metody	31
3.5.1.	Western blotting.....	32
3.5.2.	Northern blotting.....	33
3.5.3.	Southern blotting.....	33
3.5.4.	Microarrays	33
3.5.5.	In situ hybridizace.....	35
3.5.6.	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	36
4.	Budoucnost diagnostiky rakoviny: Inovativní přístupy a technologie	38
4.1.	Tekutá biopsie: Cirkulující nádorové buňky	38
4.2.	Nanotechnologie v diagnostice rakoviny	39
4.3.	Umělá inteligence v diagnostice a terapii rakoviny	40
	ZÁVĚR	41
	POUŽITÁ LITERATURA	42

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

- ALK – anaplazická lymfomová kináza
AuNPs – zlaté nanopartikelky
bp – báze páry (jednotka délky v DNA nebo RNA)
cDNA – komplementární DNA
cfDNA – cirkulující volná DNA
COL1A1-PDGFB – fúzní gen COL1A1-PDGFB
CpG – specifická sekvence DNA
CSF – mozkomíšni mok
CT – počítačová tomografie
CTC – cirkulující nádorové buňky
CTC-Chip – čip pro zachytávání cirkulujících nádorových buněk.
ddNTP – didesoxyribonukleosid trifosfát
DNA – deoxyribonukleová kyselina
dNTPs – desoxyribonukleotid trifosfáty
EMT – epitelo-mezenchymální tranzice
EpCAM – molekula adheze epiteliálních buněk
FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA.
FISH – fluorescenční in situ hybridizace
FISH – fluorescenční in situ hybridizace
HER2 – humánní epidermální růstový faktorový receptor 2
HPV – papilomavirus
I-FISH – fluorescenční in situ hybridizace na jádrech v interfázi
miRNA – microRNA
MR – magnetická rezonance
mRNA – messenger RNA
OAZ – optoakustické zobrazování
PCR – polymerázová řetězová reakce
PEG – polyethylenglykol
PET – pozitronová emisní tomografie
Qpcr – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA – ribonukleová kyselina
ROSI – ROS protoonkogen 1, receptorová tyrozinová kináza
SDS-PAGE – SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
sRNA – malá RNA (Small RNA)
SUMOylace – postranlační modifikace proteinů pomocí proteinu SUMO (small ubiquitin-related modifier)
SYBR – synergetic Binding Reagent (synergeticky vážící reagens)
TIC – nádorové iniciující buňky
TSG – analýza promotorové methylace tumor supresorových genů

ÚVOD

Rakovina patří mezi nejzávažnější nemoci s vysokou úmrtností a ve většině případů je zde nízká šance na přežití. Pouze v České republice je v průměru diagnostikováno 87 000 nových onkologických onemocnění a v průměru 30 000 pacientů nemoci podlehnou. Jedná se o druhou nejčastější příčinu úmrtí v ČR.

Téma jsem si vybrala, protože naprosto zásadní pro celé onemocnění je včasná, rychlá a efektivní diagnóza a následně započatá léčba. Pro celé pochopení diagnózy se první část práce bude věnovat popisu a fungování nádoru. V té další se přesuneme k základním diagnostickým metodám používaných v minulosti, a i v současnosti. Vzhledem k tomu, že se v posledních letech se vyvinulo několik nových metod pro rychlejší a přesnější diagnostiku rakoviny, nebudou zde také chybět.

Práce se zaměřuje na jejich principy, výhody a nevýhody oproti tradičním metodám, a také na jejich využití v klinické praxi.

1. RAKOVINA

Pojem rakovina není pouze jedna nemoc, ale celá skupina onemocnění. Mezi její typický patologický rys náleží bujení buněk s možností prorůstát do dalších tkání i jiných částí organismu (Grotenhermen 2022, s. 28).

Rakovina patří mezi nejobávanější nemoci 20. století a objevuje se dále s nepřetržitým a rostoucím výskytem v 21. století. Situace je tak alarmující, že každý čtvrtý člověk má celoživotní riziko rakoviny. Každoročně se po celém světě registruje více než 14 milionů nových případů (Roy, 2016).

Rakovinné buňky mají tyto typické znaky. Ty pak vyvolávají zhoubnou rakovinu:

- abnormální buněčný růst,
- dělení buněk navzdory protichůdným signálům,
- apoptózu,
- nespočetné množství dělených buněk,
- prorůstání do tkání a tvorba metastáz.

Onemocnění rakovinou může souviset s nezdravým způsobem života, nákazami, znečištěné životní prostředí a ionizující záření (rentgen, UV záření, záření z jaderných elektráren). Kouření tabáku způsobuje kolem 30 % rakoviny plic. Mnohá onemocnění jsou pozitivně ovlivněna infekcemi jako je např., hepatitida B, hepatitida C nebo lidský papilomavirus (HPV), proti němuž je možné se dát očkovat (Grotenhermen 2022, s. 28).

V České republice je průměrně diagnostikováno více než 87 000 pacientů se zhoubným nádorem za rok. Roční úmrtí se pohybuje okolo 27 000 pacientů. A celkem zde žije okolo 600 000 osob, které s onemocněním bojují nebo ho již prodělali (Linkos 2022, cit. 25.12).

Všechny druhy rakoviny jsou v dnešní době léčitelné, je však nezbytná jejich včasná diagnostika. Při včasné diagnóze jsou šance na záchranu mnohem vyšší. Je nutno zabránit dalšímu bujení nádorových buněk a případným metastázám do okolních tkání a poté nádor zcela odstranit. Rakovinné buňky pokračují v růstu, pokud nenastane jedna ze čtyř věcí:

- rakovinná hmota je chirurgicky odstraněna,
 - použití chemoterapie nebo jiného typu léčby specifické pro rakovinu, jako je hormonální terapie,
 - použití radiační terapie,
 - rakovinné buňky se samy zmenšují a mizí
- (Roy, 2016).

1.1. Nádorové buňky

Reakce buňky na různé podněty, ať už jedná o vnitřní nebo vnější, je jedním ze základních schopností přizpůsobení se na všechny změny v organismu, které se za fyziologických podmínek dějí v průběhu buněčného vývoje (Sommerová, 2016, s.29).

Tohoto systému využívají nádorové buňky, které mají schopnost přizpůsobit stresovým podmínkám, dále pak mají schopnost změnit mechanismy, díky kterým se vyhnou buněčné smrti, a tak se mohou nadále šířit, nekontrolovatelně růst a prorůstat do dalších tkání tzv. metastázy (Sommerová, 2016, s.29).

Metastáze, je kolonizace a šíření do okolních orgánů a tkání, než kde původně vznikly, je nejčastější příčinou úmrtí u pacientů s rakovinou. Náleží tudíž mezi nejnebezpečnější a nejzávažnější aspekt rakoviny (Zhang, 2013).

Je to proces, kdy se nádorové buňky dokážou šířit pomocí krevního či lymfatického systému do okolních částí těla. Na novém místě se usadí, přizpůsobí se, přežívají a začínají se opět dělit jako původní nádor (Zhang, 2013).

Metastázy výrazně narušují funkce těla, proto je důležité začít s léčbou co nejdříve, nejlépe pokud ještě nedošlo k proliferaci do okolních částí těla (Zhang, 2013).

1.1.1. Cirkulující nádorové buňky

Cirkulující nádorové buňky (CTC) jsou považovány za jeden z faktorů, který se podílí na rakovinné metastáze. Jedná se o nádorové buňky, které se oddělily od primárního nádoru, dostaly se do krevního řečiště, kde cirkulují (Lowe, LE, & Allan, AL, 2018). CTC podléhají sériím migrací, adhezí a agregací za vzniku metastáz, což vede k pooperační recidivě a metastázám u pacientů s maligními nádory. Detekce a analýza cirkulujících nádorových buněk, je velmi důležitá pro diagnostiku rakoviny (Zhang, 2020).

Důležitou roli tady také hraje EMT (epitelo-mezenchymální tranzice) – přechod z epitelu na mezenchym. Jedná se o dynamický proces, který zařizuje epiteliálním buňkám podobné vlastnosti jako má mezenchym, což znamená, že jim usnadňuje šíření nádorových buněk a metastázování (Lowe, 2018).

Detekce a analýza cirkulujících nádorových buněk, je velmi důležitá pro diagnostiku rakoviny (Zhang, 2020).

1.1.2. Nádorové iniciující buňky

Nádorové iniciující buňky (TIC) jsou definovány jako populace buněk nalezené v nádoru, které se vlastnostmi velmi podobají kmenovým buňkám. Jejich podobnost například spočívá v tom, že mají schopnost se samoobnovovat a diferencovat (Qureshi-Baig, 2017).

Existují i záznamy, které nasvědčují tomu, že tyto buňky jsou rezistentní vůči mnoha konvenčním terapiím rakoviny a že jsou schopny přežívat léčbu i přes dramatické zmenšení nádoru (Wei, 2015).

Zbylé TIC jsou pak schopny případně znovu narůst, což vede k relapsu onemocnění. Je možné, že nádorové iniciující buňky mají za následek i metastatickou komplikaci. Pokud by to tak doopravdy bylo, pak cílení na TIC může být klíčové pro vyléčení pacienta (Wei, 2015).

1.2. BIOLOGICKÁ KLASIFIKACE NÁDORŮ

Velmi podstatným krokem je rozdělení nádorů. Zásadním je histopatologické rozdělení, bez něho by nebylo možné nádor posoudit, porovnat jejich vlastnosti a ani určit správnou diagnózu (Povýšil, 2011, s.133).

Biologické nádory se řadí do dvou hlavních skupin:

1. Benigní nádory – nezhoubné
2. Maligní nádory – zhoubné

Rozdělení a rozpoznání nádoru, či je zhoubný nebo nezhoubný, je naprosto klíčový pro diagnostiku a správnou léčbu pacienta. Většinou se vyznačují příponou – om.

Dále se rozlišují pomocí několika různých skupin:

1. **Klasifikace podle tkáně původu:** Nádory jsou klasifikovány podle toho, kde vznikají. Např. karcinom plic, prsu, slinivky břišní apod.
2. **Histologická klasifikace:** Zaměřuje na strukturu a morfologii buněk v nádoru a rozděluje nádory podle toho, jak vypadají pod mikroskopem. Příklady histologických typů nádorů zahrnují např. melanom, adenom, lipom...
3. **Stupeň malignity:** Nádory se určují podle toho, jak jsou agresivní a jak rychle jsou schopny prorůstat do okolních tkání a orgánů.
4. **Molekulárně-genetická klasifikace:** Genetické změny v nádorových buňkách mohou poskytnout informace o tom, jak rychle se nádor šíří, jak dobře bude reagovat na léčbu a jaká bude prognóza pacienta. Klasifikace podle genetických změn se obvykle provádí pomocí molekulárních testů, jako je sekvenování DNA nebo RNA (Společnost pro gastrointestinální onkologii ČLS JEP, 2023).

1.2.1. Benigní nádory

Benigní nádor se vyznačuje ohraničeným růstem a neprorůstá do dalších tkání a orgánů – metastázy. Je tudíž méně agresivnější a nebezpečnější než nádor maligní. Jeho růst je pomalý.

Pacientovi nezpůsobuje nějaké vážnější komplikace a lze jej chirurgicky odstranit, díky ohraničení, či opouzdření (Povýšil, 2011, s.136).

Benigní nádory se mohou nacházet na mnoha částech těla, podle kterých jsou různě pojmenovány. Například nádor na chrupavce se nazývá chondrom, z hladké svaloviny leiomyom, adenom je benigní epitelový nádor, atd. (Povýšil, 2011, s.136).

Epitelové benigní nádory mají názvosloví komplikovanější. Bývají označovány podle buněčného původu, charakteristikou růstu či strukturou nádoru (Povýšil, 2011, s.136).

U benigního nádoru je často velká šance na přežití, pokud se neobjeví růst v okolí mozkového kmene, zde to pro pacienta může skončit fatálně. Pokud vznikne z B-buněk Langerhansových ostrůvků, zavíní to zvýšenou produkci inzulínu, která vede k hypoglykémii, která je také smrtelně ohrožující pro pacienta (Povýšil, 2011, s.136).

Je tedy velmi důležité, kde se daný nádor nachází. Stále důležitá je včasná a rychlá diagnóza (Povýšil, 2011, s.136).

1.2.2. Maligní nádory

Maligní – zhoubné nádory se na rozdíl od nádoru nezhooubných vyznačují neohraničeným růstem na cíleném místě. Jsou rychlejší v růstu, agresivnější s tendencí prorůstat do dalších tkání a orgánů. Sarkom z buněk chrupavky je chondrosarkom, z epitelových buněk vzniká karcinom apod. (Povýšil, 2011).

Jsou především charakteristické jejich pestrým rozmezím diferenciací buněk. Zatímco u jednoho pacienta může tato diferenciace být výrazně progresivní, u někoho jiného může být stejný typ nádoru ne tak silně diferencovaný. Nediferencované buňky jsou primitivní a nelze je snadno rozlišit. Mezi jejich znaky náleží posuny v poměru velikosti či objemu jádra a cytoplazmy (Povýšil, 2011).

Zhoubný nádor je v každém případě nejdůležitější včas zachytit a započít léčbu, ještě předtím, než začne metastázovat (Povýšil, 2011).

1.3. HISTOGENETICKÁ KLASIFIKACE NÁDORŮ

Histologicky se nádory posuzují především podle jejich vzhledu, pomocí mikroskopie. V několika případech je, ale tkáň či buňku složité přesně rozpoznat, ze kterých nádorů pocházejí. Klasifikace některých nádorů může být velmi pestrá, jelikož nádor může vycházet z několika různých míst jako např. z povrchového epitelu či ze zárodečných buněk atd.

Podle jejich umístění se dělí do několika různých skupin:

1. Mezenchymové nádory
2. Neuroektodermové nádory

3. Mezoteliomy
4. Nádory epitelové
5. Germinální nádory

(Mačák, 2004).

1.3.1. Mezenchymové nádory

Je to skupina nádorů, která se vyznačuje tím, že vychází ze svaloviny, tukové a pojivové tkáně, cév, kostní dřeně, slezin a lymfatických uzlin. Jedná se tudíž o nádory měkkých tkání. Dělí se na zhoubné (maligní) a nezshoubné (benigní) (Mačák, 2004).

Do benigních nádorů náleží například fibrom, který se vyskytuje na vazivu (kůže, sliznice, kosti...). Lipom je z tukové tkáně, vyznačuje se svou měkkostí a elasticností. Tvorbou chrupavky je znám chondrom, rostou uvnitř kosti a výjimečně i na povrchu (ekchondromy). Myom se týká svalové tkáně. Mezi tvrdší nádory se řadí osteom – nádor kostí. Nádor, který postihuje žaludek a tenké střevo se nazývá gastrointestinální stromální nádor. Pokud se nádor odvozuje z cév, nazýváme ho angiom (Mačák, 2004).

Jako maligní nádor je znám sarkom, který pravděpodobně vzniká z mezenchymových buněk. Liposarkom nejpočetněji postihuje pacienty, mezi dospělými tvoří až 20 % všech sarkomů. Maligní fibrózní histiocym je záležitost spíše u starších pacientů, postihuje měkké tkáně a je schopen tvořit metastázy v plicích a lymfatických uzlinách. Mezi méně vyskytující se nádor je řazen fibrosarkom, který se objevuje v pozdějším věku a především v měkkých tkání dolních končetin (Mačák, 2004).

1.3.2. Neuroektodermové nádory

Řadí se sem nádory, které vzešly z buněk embryonálního neuroektodermu, postupně se vyvíjejí na nervovou tkáň. Vyskytují se především na mozku a míše, ale mohou se objevit i na jiných částech těla, včetně periferních nervů. Jsou to nádory nezshoubné, tudíž je u většiny nádorů jejich růst pomalý a nemají tendenci k proliferaci, ale patří sem i výjimky (Mačák, 2004).

Mezi nejčastější a nejznámější neuroektodermový nádor patří multiformní glioblastom, který tvoří kolem 30 % onemocnění této skupiny. Projevuje se kolem důchodového věku, jeho růst je rychlý a pacient nemá velké šance tento nádor přežít. Statisticky se úmrtnost pohybuje do půl roku (Mačák, 2004).

Jeden z agresivních nádorů, z této skupiny, který postihuje především dětskou populaci se nazývá maduloblastom. Vychází z mozečku a postihuje centrální nervovou soustavu (Mačák, 2004).

Prognóza u jednotlivých pacientů se liší, záleží zde na věku, a především na druhu a agresivitě nádoru. Pacienti ve starším věku mají obvykle závažnější prognózu (Mačák, 2004).

1.3.3. Mezoteliomy

Jedná se o nádor, který se vyvíjí z mezodermu, ale může mít také diferenciaci epitelovou. Má tři základní rozdělení. Sarkomatózní, epiteloidní a smíšený. Mezi nejvíce častý typ patří epiteloidní. K tomuto základnímu rozdělení je zapotřebí imunohistochemické vyšetření. Vyšetření se může provést i mikroskopicky (Klener, 2002).

Mezoteliomy se vyznačují svou specifickou chromosomální abnormalitou (Klener, 2002). Je zde častá aneuploidie, který zapříčiní úplné chybění chromozomu nebo naopak jeho nadbytek, ve všech buňkách organismu (Hruban, 2004). Je zde také výskyt delecí a translokací u chromozomů. Charakter epiteloidních mezoteliomů, je takový, že se přímo šíří po pleure a metastazuje do mízních uzlin a do dalších okolních struktur (játra, perikard,...). Formy sarkomatózní jsou nebezpečnější kvůli jejich dosahu metastáz. Mezi první příznaky obvykle patří dušnost, která je způsobena nahromaděním tekutin v pleurální dutině (Klener, 2002).

1.3.4. Nádory epitelové

Mohou být zhoubné, či nezahubné. Adenomy obvykle bývají více diferencované a připomínají původní tkáň. Karcinomy částečně zachovávají morfologický charakter epitelu (tubulární, trabekulární, folikulární). Karcinomové buňky se vyznačují svou soudržností a velkým jádrem. Pomocí imunocytochemie je zde možné prokázat přítomnost cytokeratinů. Karcinomy proliferují nejčastěji pomocí lymfatického systému. Vyrůstají z dlaždicového, přechodného nebo ze žlázového epitelu (Klener, 2002).

1.3.5. Germinální nádory

Germinální nádory pochází ze zárodečných buněk. Podle histologického hlediska se vyznačují jako heterogenní. Jejich rozdělení spočívá v tom, do jaké míry je schopna mateřská buňka potencovat na seminom, který vzniká maligní transformací mateřské buňky a na nádory neseminomové, které mají větší tendenci k rychlejšímu růstu a proliferaci. Do skupiny neseminových nádoru patří embryonální karcinom, nádor ze žloutkového váčku, choriokarcinom a tetranomy (Klener, 2002).

2. METODY VYŠETŘENÍ

Vyšetření rakoviny spočívá v kombinaci několika metod a postupů, které vedou ke správné diagnostice a následně pak vhodně zvolené léčbě nádorového onemocnění, podle jeho druhu. V první fázi je určitě nutné pacienta vyšetřit z fyzického hlediska a posoudit jeho celkový zdravotní stav. Na základě těchto údajů se zvolí metoda vyšetření, která je pro pacienta nejvhodnější.

2.1. Zobrazovací metody

V dnešní době máme rovnou několik možností zobrazovacích metod pro diagnostiku rakoviny, které jsou zásadní pro výzkum a detekci rakoviny. V laboratořích se využívají pro odhalení složitějších biologických procesů, které stojí za nádorovým onemocněním. Využívá se k tomu řada endogenních a exogenních zdrojů (Taruttis, 2015).

- 1. Optoakustické zobrazování (OAZ)** – Jedná se o moderní zobrazovací metodu, která dokáže kombinovat optické vlastnosti s akustickými pro vytvoření obrazu vnitřních struktur tkání a orgánů. Tkáň je vystavena krátkému impulsu světla a poté se viditelné světlo šíří ve tkáni několik milimetrů. Unit tkáně se světlo absorbuje a podléhá tepelné expanzi co se projeví vznikem tlakových vln a jsou poté detekovány neinvazivními ultrazvukovými měniči. Díky tomuto principu vzniká optické zobrazení tkáně. V dnešní době se široce využívají ve screeningových, diagnostických a terapeutických postupech (Taruttis, 2015).
- 2. Pozitronová emisní tomografie (PET)** – Poskytuje možnost k průzkumu biologických charakteristik in vivo (v živém). Technika umožňuje šetrné, neinvazivní vizualizaci, charakteristiku a kvantifikaci biologických procesů na molekulární úrovni. Využívá se zde radioaktivně značených molekulárních sond. Jako základní prvek pro molekulární rozpoznávání a sledování radionuklidů se využívají radiofarmaka, které umožňují celkové vyhodnocení rakoviny v organismu (Jin, 2022).
- 3. Magnetická rezonance (MR)** – Má schopnost zobrazovat důležité biomolekuly a molekulární změny, které se týkají maligního nádorového onemocnění (Haris, 2015). Její uplatnění se využívá především u vyšetření mozku a míchy. V dnešní době je MR hojně využíváno i pro diagnostiku a staging muskuloskeletálních nádorů, posuzování infiltrace kostní dřevě a k detekci zvětšených mízních uzlin (Klener, 2002).
- 4. Počítačová tomografie (CT)** – I přes všechny novější zobrazovací metody, zůstává CT stále nejčastější metodou pro diagnostiku rakoviny. Je to jedna z nezbytných metod pro diagnostiku mozku. Její detekce spočívá v detekci kalcifikací, určení vztahu ke kostním

strukturám a k učení nitrohručních a nitrobřišních patologických procesů. Dokáže upřesnit místo výskytu nádoru plic a mediastina v břišní dutině a v malé pánvi. Odhaduje se, že CT dokáže odhalit kolem 90 % začínajících nádorů menších než 1 cm (Klener, 2002).

2.2. Cytologické metody

Cytologické metody se stále zlepšují, od počítání krvinek v periferní krvi se přešlo k odebírání buněk ze všech možných orgánů a tkání. Tato metoda je velmi šetrná k pacientům, odběr se provádí pomocí tenkojehlové aspirační metody. Díky moderním zobrazovacím metodám je možné se dostat i do hlubších orgánů a tkání a provést odběr. Velká výhoda této metody je rychlost výsledků, které je možné interpretovat tentýž den. Patří mezi méně nákladné metody (Mačák, 2004).

Princip této metody je založen na odběru buněk, pomocí jehly, či se otisknutím tkáně na podložní sklíčko. Větší množství tekutin je zpracováváno v sedimentačních komůrkách, kde působí gravitace a buňky klesnou na podložní sklíčko. Je zde možné využít i centrifugaci. Pro viditelnost buněk se používá Giemsovo barvení. Pokud by se jednalo o gynekologický nález, využívá se barvení podle Papanicolaou (Mačák, 2004).

2.3. Genetické metody

První chromozomální abnormalitou objevenou u rakoviny pomocí cytogenetické techniky v roce 1960, byl tzv. Philadelphia chromozom a byl konzistentně spojován s chronickou myeloidní leukémií. Během posledních pěti desetiletí inovativní technický pokrok v oblasti cytogenetiky rakoviny výrazně zvýšil schopnost detekce chromozomálních změn a usnadnil výzkumný a diagnostický potenciál chromozomálních studií u novotvarů. Bez ohledu na tento vývoj je chromozomová analýza jedné buňky stále nejsnadnějším způsobem, jak vymezit a pochopit vztah mezi klonální evolucí a progresí onemocnění rakovinných buněk. Použití pokročilých technik fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňuje další identifikaci chromozomálních změn, které nejsou vyřešeny metodou karyotypizace. Překonalo mnoho nevýhod hodnocení genetických změn v rakovinných buňkách pomocí karyotypizace. Následně vývoj technologií DNA microarray poskytuje pohled na celý genom s vysokým rozlišením, což může přidat obrovské množství nových informací a otevírá pole cytogenomiky rakoviny (SK Wan, 2017).

3. MOLEKULÁRNĚ-DIAGNOSTICKÉ METODY

Metody molekulární diagnostiky jsou v biologii a lékařství techniky, které umožňují analýzu biologických vzorků na molekulární úrovni. Tyto postupy umožňují identifikaci, charakterizaci a kvantifikaci specifických molekulárních entit, jako jsou DNA, RNA, proteiny a další biomolekuly. Aplikace molekulární biologie způsobila revoluci ve screeningu infekčních chorob, diagnostice, léčbě a preventivní medicíně na celém světě (Adhyana, 2021).

3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je biochemická reakce téměř totožná s procesem, který se vyskytuje ve všech živých buňkách. PCR je metoda určená pro rychlé namnožení velkého počtu kopií určité části DNA nebo RNA, což nám umožňuje lépe tyto molekuly prozkoumat. Replikovaná nukleové kyseliny je zde zrcadlena k templátové DNA, kde jsou báze přidávány na základě komplementarity. Případně se využívá se k detekci specifické oblasti genetického kódu (Adhyana, 2021). Pro analýzy vzniklých fragmentů se často používá elektroforéza na agarózovém gelu. Druhou možností je detekce v reálném čase (tzv. real-time PCR).

Při řešení mnoha problémů v biologii a medicíně, je nutné detekovat přítomnost specifických sekvencí nukleové kyseliny ve vzorcích. Kromě identifikace konkrétní DNA sekvencí, je často nutné určit i její koncentraci ve vzorku (Sochivko, 2013). Případně se PCR využívá pro zjišťování míry exprese (aktivity) genů, kdy se analyzuje množství exprimované RNA (Adhyana, 2021).

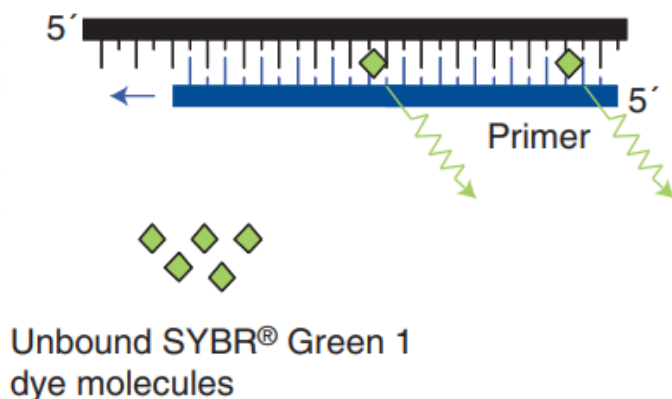
PCR se používá pro řadu aplikací včetně DNA fingerprintingu, diagnostiky genetických poruch, detekce genů souvisejících např. s rakovinou, typizace tkání a výběru dárců transplantátu, fylogenetická analýza, molekulární epidemiologické studie a diagnostika infekcí způsobených patogenními mikroorganismy, včetně variantních druhů a genotypizace lékové rezistence (Adhyana, 2021).

3.2. Kvantitativní PCR v reálném čase

Jedná se techniku používanou k monitorování reakce v reálném čase. Kombinuje PCR a fluorescenční chemii pro monitorování amplifikace templátu. Obecně je qPCR klasifikována do dvou typů na základě jejího účelu: absolutní a relativní kvantifikace (Ravikumar, 2021).

Absolutní kvantifikace se používá v širokém spektru oborů, jako je mikrobiologie, potravinářská technologie a biotechnologie ke kvantifikaci mikrobiologické zátěže nebo cizích látek v počtu komodit. **Relativní kvantifikace** se používá v oblasti genomiky a funkční transkriptomiky k provedení genové expresní analýzy v biologických experimentech (Ravikumar, 2021).

Tato technika sleduje zvýšení světelného signálu z barviva během amplifikace DNA. SYBR Green je často používané barvivo, které se váže na dsDNA molekuly během procesu. I když je to cenově dostupné a snadno použitelné barvivo, jednou nevýhodou je, že může produkovat signál i s nechtěnými produkty PCR reakce (Arva, 2005).



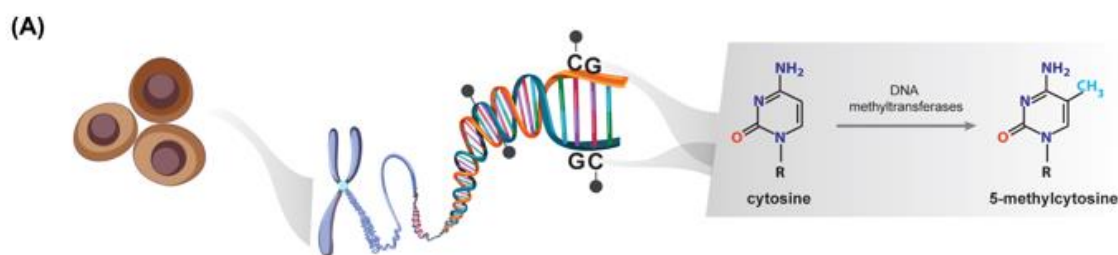
Obrázek 1 Nenavázané barvivo vázající DNA SYBR® Green 1 v roztoku vykazuje velmi malou fluorescenci. Během extenze a polymerace primeru se molekuly SYBR® Green 1 interkalují do produktu dvouřetězcové DNA, což vede ke zvýšení detekované fluorescence (Arya, 2005).

3.3. Methylace DNA

DNA je molekula, která se skládá z dlouhých polynukleotidových řetězců tvořených nukleotidy. Každý nukleotid obsahuje dusíkatou bázi (adenin, cytosin, guanin nebo thymin), pentózový cukr a fosfátovou skupinu. Dusíkaté báze se párují ve specifických kombinacích: adenin se páruje s thyminem a cytosin se páruje s guaninem. Tento párovací mechanismus je klíčový pro komplementaritu DNA, což je důležité pro přenos genetické informace z jedné buňky na druhou a pro její správnou replikaci během buněčného dělení. (Ghannam,2004).

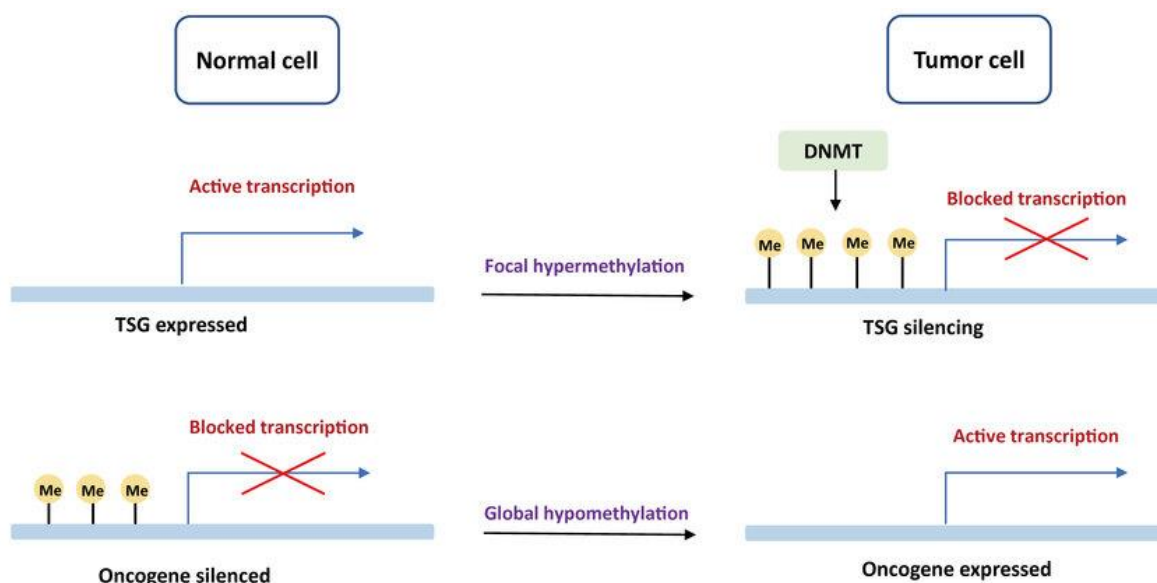
U savců byla objevena methylace DNA, což je proces, kdy se na určité cytosiny v DNA přenášejí methylové skupiny, čímž vzniká 5-methylcytosin. Tento proces je součástí epigenetiky, což znamená, že ovlivňuje aktivitu genů bez změny jejich sekvence. V současnosti je DNA methylace spolu s dalšími regulátory důležitým faktorem v epigenetice, který ovlivňuje, jak jsou geny aktivovány nebo potlačeny. (Moore,2013).

Methylace DNA ovlivňuje aktivitu genů tím, že přitahuje proteiny, které buď potlačují genovou expresi, nebo brání vázání transkripčních faktorů na DNA. Během vývoje dochází k dynamickým změnám v methylaci DNA, které zahrnují jak přidávání nových methylových – skupin, tak odstraňování existujících. Tento proces vede k vytváření stabilních a unikátních vzorů methylace DNA v diferencovaných buňkách. Tyto vzory pak specificky ovlivňují transkripci genů v různých tkáních (Moore, 2013).



Obrázek 2: Buňky používají enzymy nazývané DNA methyltransferázy (DNMT) k přidávání methylových skupin na pátoou uhlikovou pozici cytosinu, zejména v CpG dinukleotidových kontextech, což vytváří 5-methylcytosin (5mC). Tento proces má různorodé dopady na transkripci genů, stabilitu genomu a uspořádání DNA v buňkách (Skvortsova, 2019).

Deregulace methylace DNA je silně spojena s nástupem různých onemocnění, včetně rakoviny. CpG dinukleotidy (specifická sekvence CG dinukleotidu v DNA) jsou v savčích genomech distribuovány nerovnoměrně, seskupené hlavně v tzv. CpG ostrůvcích, které se často nacházejí především v genových promotorech. Je dobře známo, že normální epigenetické procesy jsou narušeny během iniciace a progresu tumorigeneze, včetně globálních změn normálních vzorců methylace DNA (Skvortsova, 2019).



Obrázek 3 V nádorových buňkách jsou onkogeny, které jsou obvykle potlačeny v normálních buňkách, hypomethylací aktivovány. To znamená, že dochází k odstranění methylových skupin z promotorových regionů těchto genů, což vede k jejich aktivní transkripci a přispívá k nádorovému růstu a progresu (Chen, 2022).

V rakovině se methylovaný profil DNA liší od normálních tkání. Na rozdíl od celkového snížení methylace je DNA v rakovině často hypermetylovaná v oblastech nazývaných ostrovy CpG. Tyto hypermetylované oblasti, zejména v promotorových oblastech genů, mohou způsobit

potlačení expresí těchto genů. Tento proces může být spojen s rozvojem rakoviny. Zde je několik metod detekce a léčby pomocí methylace:

1. Detekce methylace nádoru v krvi

Detekce rakoviny v cirkulující krvi je jako postup minimálně invazivní, a proto je v klinickém prostředí vysoce žádoucí. Komplexním nespecifickým klinickým vyšetřením se lze vyhnout použitím krevního markeru, který dokáže identifikovat nejen přítomnost rakoviny, ale také konkrétní typ rakoviny (Papanicolau-Sengos, 2022).

2. Analýza promotorové methylace tumor supresorových genů (TSG)

Hypermethylace a umlčování TSG v celém genomu patří mezi typické vlastnosti rakovinných buněk. TSG jsou geny, které mají schopnost potlačovat vznik nádorů a jsou často inaktivovány v různých typech rakoviny. Reaktivace epigeneticky umlčených TSG byla navržena jako terapie při léčbě rakoviny (Dammann, 2017).

3. Biomarkery methylace DNA v tekutých biopsiích

Tekutá biopsie může detekovat a monitorovat primární i metastatické maligní nádory a může odrážet heterogenitu nádoru. Může kontinuálně monitorovat evoluci primárních i metastatických maligních nádorů a detekovat jejich recidivy. Navíc se jedná o minimálně invazivní zákrok a pacientům způsobuje méně bolesti. Tekuté biopsie zahrnují především bezbuněčnou DNA (cfDNA), cirkulující nádorové buňky (CTC) a exozomy. Formou tekutých biopsií jsou kromě výše uvedeného také sputum, moč, sliny, tekutina z bronchoalveolární laváže, bronchiální aspiráty, výplachy průdušek a pleurální výpotky (Peilong, 2022).

3.3.1. Detekce methylace tumoru v krvi

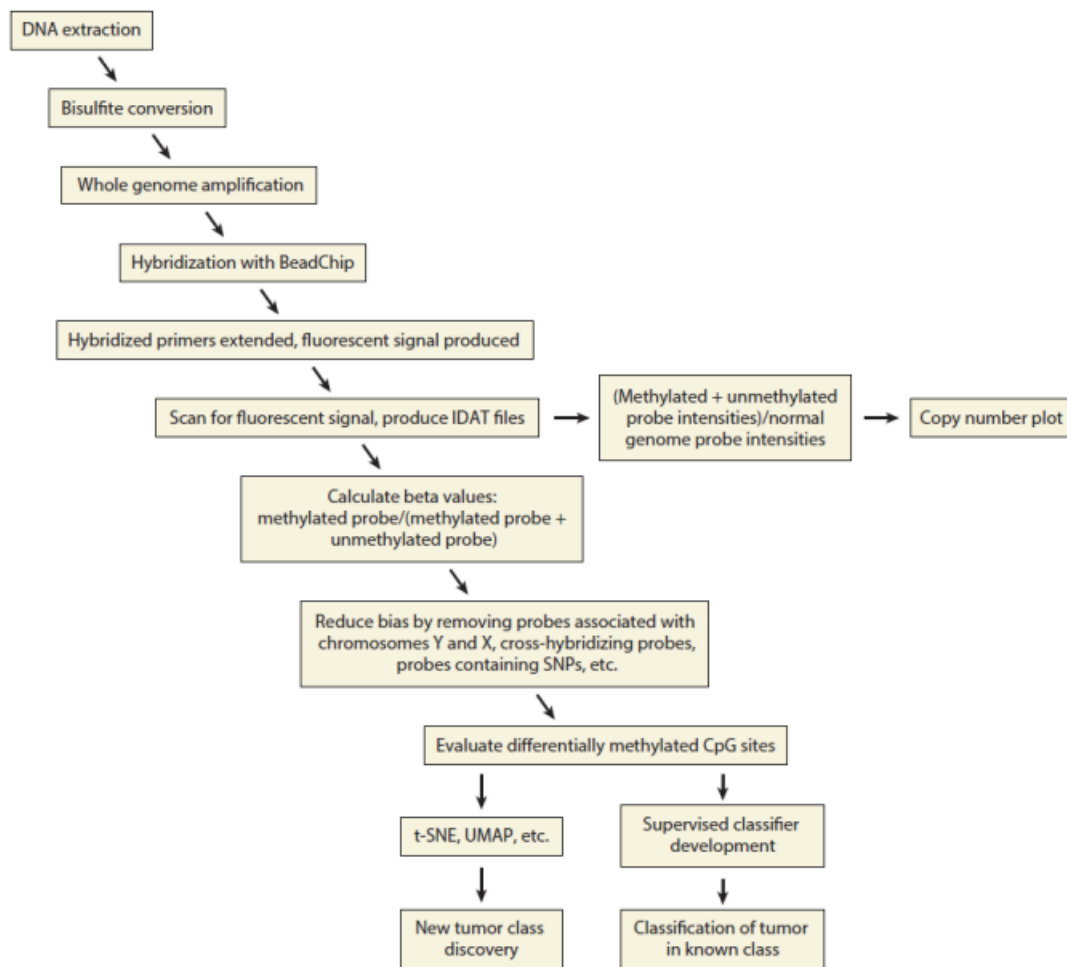
Princip metody detekce methylace tumoru v krvi spočívá v analýze volného methylované DNA (cfDNA) přítomné v krvi pacientů. Tato analýza se zaměřuje na methylované úseky DNA, které mohou být charakteristické pro určité typy nádorů (Dammann, 2017).

Metoda využívá techniky imunoprecipitace methylované DNA a vysoce výkonné sekvenování vzorků krve. Získaná data jsou poté analyzována za účelem identifikace specifických změn v methylaci DNA spojených s různými typy nádorů. Tyto změny mohou posloužit jako biomarkery pro detekci přítomnosti rakoviny a mohou také pomoci s určením jejího typu (Papanicolau-Sengos, 2022).

Některé studie používají i pravděpodobnostní metody klasifikace rakoviny pomocí methylace cfDNA, které porovnávají distribuci methylace CpG skupin mezi plazmou pacientů bez

rakoviny a pacientů s různými typy nádorů. Tato metoda bere v úvahu variabilitu v distribuci methylace cfDNA v závislosti na různých směsích cfDNA od pacientů s rakovinou a bez ní (Dammann, 2017).

Celkově tyto metody umožňují detekci a klasifikaci nádorů na základě analýzy methylace cfDNA v krvi, což představuje slibný přístup k minimálně invazivní diagnostice rakoviny (Papanicolau-Sengos, 2022).



Obrázek 4 Extrahovaná DNA z tumoru je konvertována bisulfitem a amplifikována. Poté se hybridizuje s čipem BeadChip a zaznamenává se fluorescenční signál. Beta hodnota vyjadřuje poměr methylované verze k celkovému počtu methylované a nemethylované verze na daném místě methylace. Analýza dat může být prováděna nesupervizovanými metodami, jako jsou t-SNE nebo UMAP, pro vizualizaci shlukování nádorů. Data o methylaci mohou být také použita k vytvoření grafů kopií čísel, kde se sčítá fluorescenční intenzita methylovaných a nemethylovaných sond a dělí se intenzitami normálního genomu (Papanicolau-Sengos, 2022).

3.4. Sekvenování

Sekvenování je technika v molekulární biologii, která slouží k určení přesného pořadí bází v DNA. Používá se jak k určování sekvencí v neznámých genech, chromozomech nebo genomech (například bylo úspěšně dokončeno sekvenování lidského genomu v roce 2001), tak

k detekci změn, jako jsou mutace nebo polymorfismy, ve známých sekvencích. Tato metoda, nazývaná resekvenování, umožňuje identifikovat substituce (kdy je jedna báze nahrazena jinou), delece (ztráta bází), inserce (vlození bází) nebo duplikace (zdvojení bází) v genech, které hrají klíčovou roli ve dědičných i náhodných lidských onemocněních. Sekvenování je proto užitečným nástrojem v patologické diagnostice (Šedivcová, 2013).

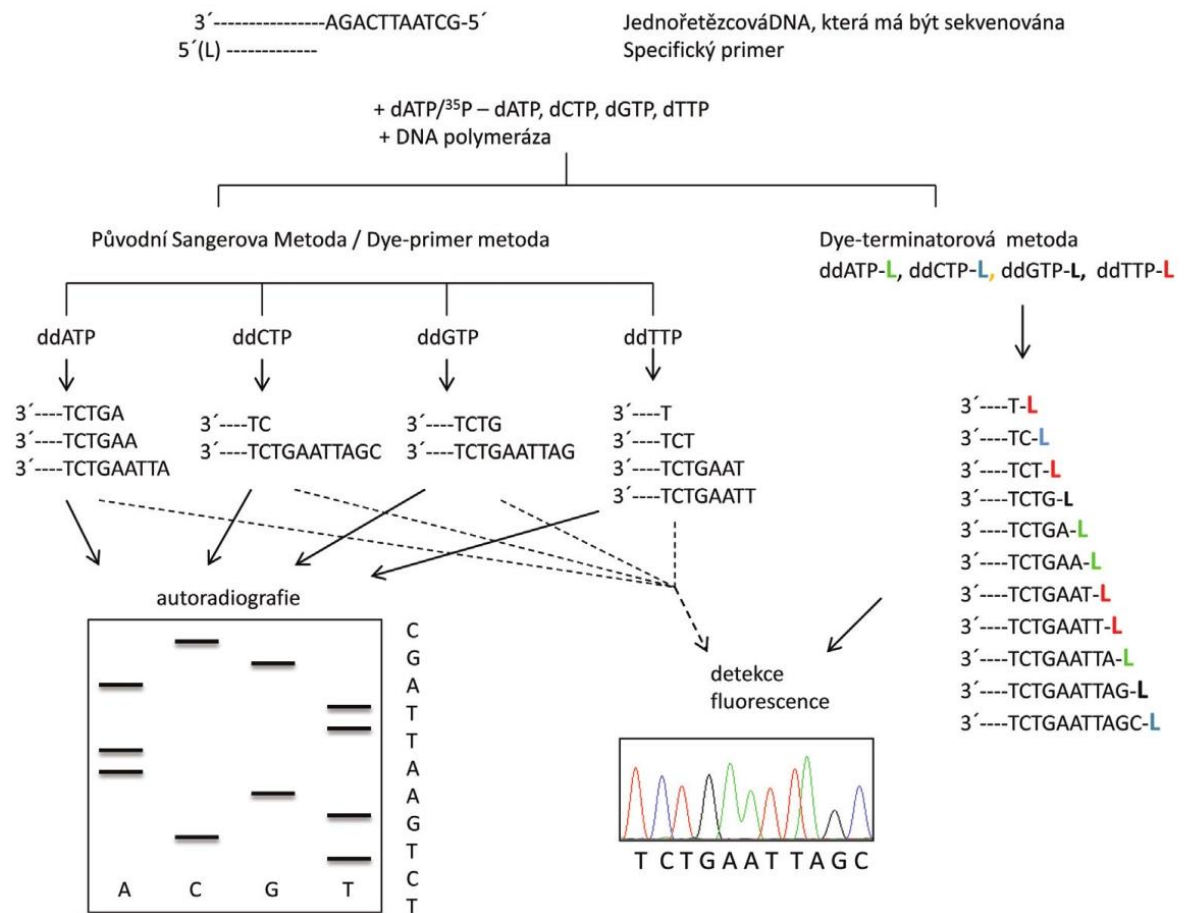
3.4.1. Sangerovo sekvenování

Jedná se o metodu sekvenování DNA, kterou vyvinul britský biochemik Frederick Sanger v roce 1977. Sangerovo sekvenování je široce používaným přístupem pro analýzu sekvence DNA díky své jednoduchosti, nízké ceně a vysoké přesnosti. Zejména vysoká přesnost dělá ze Sangerova sekvenování „zlatý standard“ pro validaci sekvencí v základním výzkumu a klinických aplikacích (Guo, 2023).

Tato metoda zahrnuje opakovanou syntézu nového řetězce DNA pomocí asymetrické PCR. Během každého kroku syntézy je však proces přerušen, protože se do řetězce náhodně integruje fluorescenčně značený dideoxynukleotid (ddNTP), což je modifikovaná nukleotidová báze. Tento dideoxynukleotid způsobí, že DNA polymeráza ztratí schopnost pokračovat v syntéze nového řetězce, neboť chybí 3' hydroxylová skupina nutná pro prodloužení řetězce. Kapacita jedné reakce může být až 1500 bp (Kolísko, 2015).

Reakce se skládá z několika částí. Začínáme s templátovou DNA, která může být jedno nebo dvouvláknová. Přidáváme enzym DNA polymerázu, který vytváří nové vlákno DNA komplementární k sekvenované DNA. Enzym používá krátký kousek DNA nazývaný primer, který je komplementární k začátku sekvenované oblasti, a jednotlivé stavební bloky DNA (dNTPs). Tyto deoxynukleotidy se postupně připojují k primeru podle principu komplementarity bází a vytvářejí nový řetězec DNA (Šedivcová, 2013).

Při sekvenování se používají fluorescenčně značené ddNTP, které se začleňují do nově vznikajícího řetězce během lineární amplifikace, což je cyklický proces, který používá jeden primer. Každý z těchto čtyř různých ddNTP má jinou barvu, která je při analýze odlišitelná. To umožňuje provádět sekvenační reakci v jedné zkumavce. Místo gelové elektroforézy je většinou používána elektroforéza kapilární, která využívá pohyb DNA v tekuté nebo gelové matrici. Fluorescenčně značené produkty sekvenační reakce jsou odděleny v kapiláře podle velikosti a detekovány laserovou excitací. Signály jsou zpracovány softwarem a převedeny do podoby sekvenogramu, který zobrazuje sekvenci nukleotidů v analyzované DNA pomocí barevných píků, kde každá barva odpovídá určitému nukleotidu (například zelená pro adenin, modrá pro cytosin, žlutá pro guanin a červená pro thymin) (Šedivcová, 2013).

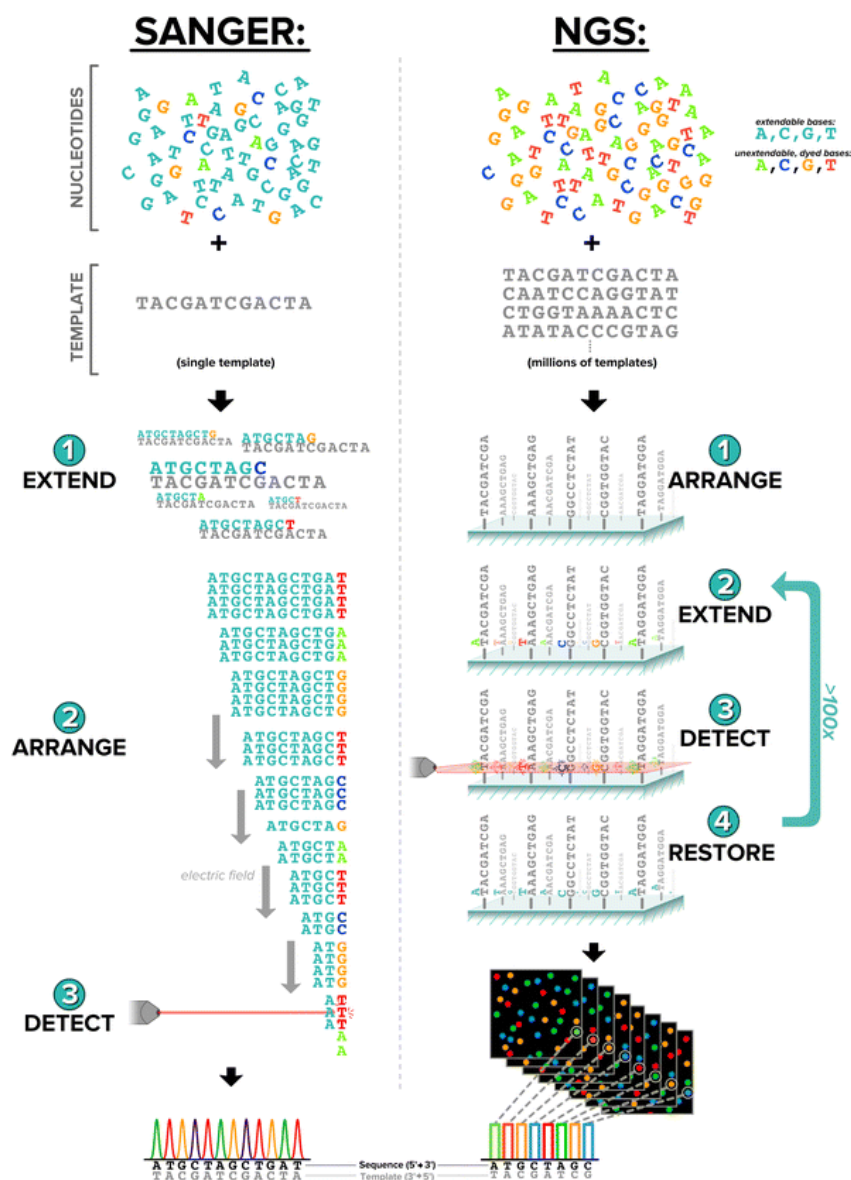


Obrázek 5 Princip Sangerovy metody sekvenování zahrnuje syntézu nového řetězce DNA ve směru 5'→3' pomocí specifického primeru, deoxynukleotidů (dNTP), dideoxynukleotidů (ddNTP) a DNA polymerázy. V klasickém provedení, zobrazeném na levé straně, může být templát označen radioaktivním nebo fluorescenčním značením. Reakce probíhá v několika zkumavkách a po denaturační gelové elektroforéze je získána sekvence. V modernějším přístupu, zobrazeném na pravé straně, jsou ddNTP značeny fluorescenčně (L = značka) a reakce probíhá v jedné zkumavce, přičemž sekvence je získána po kapilární elektroforéze (Šedivcová, 2013).

3.4.2. Sekvenování nové generace (NGS)

Termín "NGS" neoznačuje jednu konkrétní techniku, ale spíše různé moderní metody sekvenace DNA vyvinuté po Sangerově metodě. Často je jedna metoda spojena pouze s jednou konkrétní společností a jiní výrobci ji nevyužívají (Muzzey, 2015).

Mezi tyto novinky patří například sekvenování syntézou, sekvenování ligací, sekvenování na iontových polovodičích a další. Avšak v genetické medicíně je nejčastěji používanou technikou sekvenování syntézou, kterou provádějí přístroje od společnosti Illumina. (Muzzey, 2015).



Obrázek 6 NGS je variace digitálního rozšíření Sangerova sekvenování. Obě metody používají polymerázu k kopírování DNA pomocí nukleotidů, ale NGS používá zcela neobarvené a prodloužitelné báze, zatímco Sanger kombinuje částečně obarvené a neprodloužitelné báze. I když mají společné kroky rozšíření, uspořádání a detekci, NGS má speciální krok obnovy, který přeměňuje báze na neobarvenou a prodloužitelnou formu (Muzzey, 2015)

V Sangerově metodě se upraví jen malá část bází, zatímco v NGS se upraví všechny. Při kopírování DNA se polymeráza zastaví, když přidá modifikovanou bázi. V NGS se DNA imobilizuje na sklo a každá přidávaná báze se označí barvou. Potom se vizualizuje mikroskopický obraz přidané báze, včetně barvy každé báze (Nakagawa, 2018).

Modifikované báze jsou změněny zpět na standardní báze, aby mohly být prodlouženy a ztratily fluorescenční vlastnosti. Tento proces, zvaný obnova, připravuje DNA na další kroky prodlužování a zobrazování. Po několika cyklech zobrazování je fluorescenční signál na každé pozici templátu přiřazen konkrétní bázi (A, T, C nebo G). Báze z různých pozic templátu jsou poté spojeny dohromady, tvořící „čtení“ DNA sekvence. Moderní NGS stroje mohou vytvářet

čtení s délkou srovnatelnou nebo delší než tradiční Sangerovy sekvenátory, i když původně byly délky čtení kratší (Muzzey, 2015).

NGS je důležitým způsobem, jak diagnostikovat nové a vzácné mutace rakoviny a rozpoznat různé změny v genomu, jako jsou posuny, obrácení, vložení a odstranění částí DNA. Také pomáhá objevit změny v počtu kopií genů a předpokládané přenosné rakovinné mutace v rodině, což pomáhá vybrat vhodné cílené terapie a předpovědní analýzy. NGS má spoustu výhod, například schopnost zkoumat všechny typy mutací pro velký počet genů (stovky až tisíce) a je velmi citlivá. Díky své rychlosti a relativně nižší ceně ve srovnání s jinými metodami sekvenování je NGS velmi ceněným nástrojem v medicíně a výzkumu (Nakagawa, 2018).

Prvním krokem v NGS (Illumina) je příprava vzorku DNA pro sekvenaci, známá také jako tvorba sekvenační knihovny. Tento proces zahrnuje několik důležitých kroků.

1. **Izolace DNA:** DNA je extrahována z nádorového vzorku nebo v případě RNA se přepisuje do cDNA.
2. **Fragmentace DNA:** DNA je následně fragmentována na menší části.
3. **Navázání adaptérů:** Na konce fragmentů DNA jsou přidány adaptéry, což jsou krátké sekvence DNA, které umožňují jejich fixaci a amplifikaci.
4. **Amplifikace:** Fragmenty DNA jsou následně amplifikovány, aby se zvýšila jejich koncentrace a zajišťuje se tak dostatečné množství materiálu pro další analýzy.
5. **Fixace na povrch:** Amplifikované fragmenty DNA jsou fixovány na pevný povrch, což je nezbytné pro následnou sekvenaci.

Takto získané sekvence jednotlivých fragmentů jsou ve třetím kroku bioinformaticky analyzovány (Slabý, 2019).

Mezi hlavní aplikace NGS patří:

1. Celogenomové sekvenování (WGS – whole genome sequencing)

Celogenomové sekvenování umožňuje identifikovat různé typy variant po celém genomu, jak v kódujících (exonových) oblastech, tak i v nekódujících oblastech. To zahrnuje schopnost identifikovat nové a dosud nepopsané varianty v nádorovém genomu. Porovnání genetického materiálu z normálních buněk s genetickým materiálem z nádorových buněk poskytuje detailní pohled na specifické změny v nádorovém genomu.

Avšak obrovské množství dat, které lze pomocí celogenomového sekvenování získat, klade vysoké nároky na jejich interpretaci. Tento proces je zvláště náročný v případě náhodných, ale potenciálně rizikových variant, které mohou být obtížně interpretovatelné (Slabý, 2019).

Mezi výhody WGS patří sekvence jak kódujících, tak nekódujících oblastí genomu, představuje nejkompexnější metodu analýzy genomové DNA. Má důležitý význam pro translacionální výzkum v onkologii. Umožňuje výpočet mutační zátěže (TMB), což je důležitý faktor pro posouzení účinnosti imunoterapie u nádorových onemocnění.

Nevýhodou WGS jsou velké objemy dat získaných z WGS, které vyžadují náročnou interpretaci, zejména při identifikaci náhodných a potenciálně rizikových nálezů. WGS je také spojeno s vysokými finančními náklady a časovým zatížením (Slabý, 2019).

2. Sekvenování celého exomu (WES – Whole-exome sequencing)

Celoexomové sekvenování (WES) je metoda, která zachycuje většinu genetických oblastí, které kódují proteiny v genomu. Tyto oblasti jsou důležité, protože často obsahují mutace spojené s nemocemi. Klinické aplikace WES nejsou jen o diagnostice, ale mohou také pomoci určit nejlepší terapeutickou strategii pro pacienta na základě jeho genetického profilu (Mahajan, 2020).

Rozsáhlý proces sekvenování celého exomu vyžaduje standardní odběr krve od pacientů, který je posléze odeslán do laboratoře k analýze. I přes to, zda je sekvenování v mnoha případech automatizované, jde zde zapotřebí odborných specialistů, kteří dokáží propojit fenotyp s genotypem a rozhodnout, zda by identifikované varianty měly být považovány za patogenní (Herington, 2019). Menší rozsah pokrytí exomu ve srovnání s celým genomem umožňuje dosáhnout větší hloubky čtení, což vede k vyšší citlivosti při detekci variant v heterogenním vzorku nádorové tkáně. Z klinického hlediska poskytuje WES velmi hodnotný informační obsah a představuje vynikající alternativu k celogenomovému sekvenování (WGS) (Slabý, 2019).



Obrázek 7 Rozdíl sekvenování u metod Targeted gene panels, WES a WGS: Panel = konkrétní SNP, WES = jen exomy, WGS = celý genom (Yoon Jung Shin, 2022).

Mezi výhody metody WES oproti WGS patří její lepší interpretace výsledků, umožňuje větší hloubku čtení a výpočet mutační nálože (TMB), a také to, že většina patogenních variant leží v kódujících částech genomu.

Nevýhodou je, že WES nedokáže detekovat varianty v nekódujících oblastech genomu a vyskytují se obtíže při identifikaci náhodných a potenciálně rizikových nálezů (Slabý, 2019).

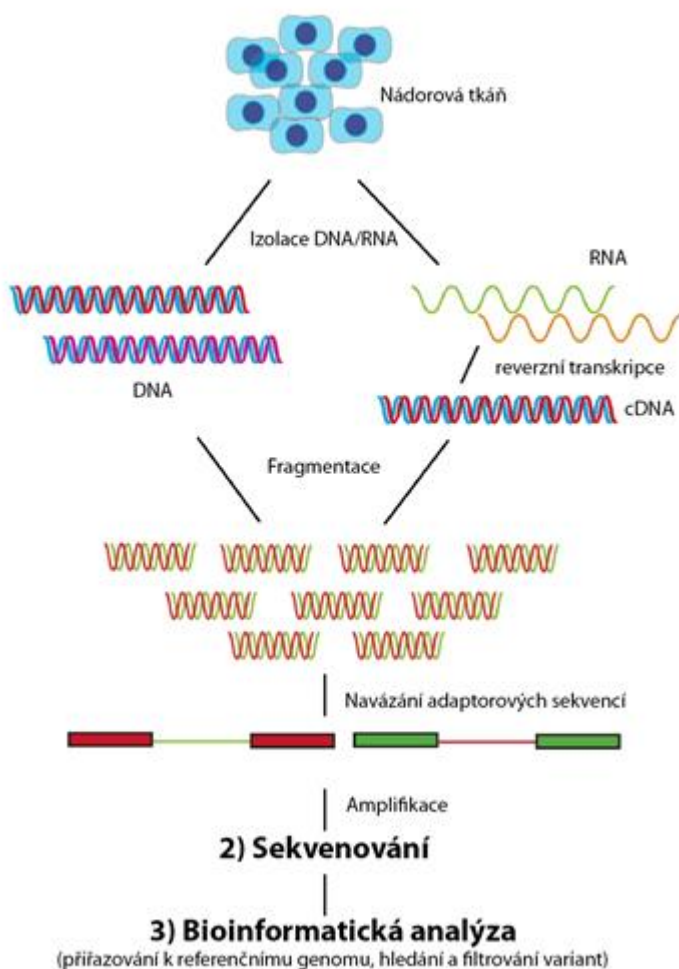
3.4.3. Princip sekvenování v diagnostice rakoviny

Samotný proces analýzy rakoviny pomocí sekvenování DNA představuje technologický pokrok v oblasti medicíny. Začínáme sběrem vzorků DNA, často z periferní krve, což je relativně neinvazivní a dostupná metoda získání biologického materiálu. Poté, co máme tyto vzorky, vstupujeme do fáze laboratorní přípravy, kde je DNA izolována a pečlivě upravena pro další analýzu. Tento proces zahrnuje fragmentaci DNA na menší úseky a označení specifických genových regionů pro identifikaci a sledování. Klíčovým krokem je obohacení těchto genových regionů, které jsou známé pro svou úlohu v různých typech rakoviny (Strom, 2015).

Následuje samotné sekvenování DNA, což je proces, kde čteme a zaznamenáváme genetické sekvence. Moderní technologie, jako je sekvenátor MiSeq od společnosti Illumina, umožňují rychlé a přesné sekvenování velkého množství DNA vzorků najednou. Po získání sekvenčních dat následuje fáze bioinformatické analýzy. To zahrnuje použití sofistikovaných algoritmů a softwaru k identifikaci genetických variant spojených s rakovinou, včetně mutací, delekcí a amplifikací genů (Strom, 2015).

Důležitou součástí analýzy je také srovnání genetických dat s referenčními genomovými sekvencemi a databázemi genetických variant, což pomáhá při identifikaci kritických změn spojených s rakovinou. Nakonec jsou identifikované genetické varianty dále validovány a interpretovány s ohledem na klinický význam pro každého jednotlivého pacienta. Tyto informace pak pomáhají lékařům při rozhodování o diagnostice, prognóze a výběru nejefektivnější léčby pro každého pacienta s rakovinou. Celkově tento přístup k analýze genomu umožňuje subjektivní a přesné léčebné strategie, což může výrazně zlepšit výsledky léčby a prognózu pacientů s rakovinou (Strom, 2015).

1) Příprava sekvenační knihovny



Obrázek 8 Příprava sekvenační knihovny je klíčový krok v procesu sekvenování DNA (Slabý, 2019).

3.5. Hybridizační metody

Molekulární hybridizace je spojení komplementárních řetězců DNA nebo RNA z různých molekul nukleových kyselin. Pro detekci určitých sekvencí nukleových kyselin se používá hybridizace s oligonukleotidy nebo polynukleotidy, které mají komplementární nukleotidové pořadí. Sondy, které obsahují komplementární sekvence, se při přísných podmínkách spojí (například pro DNA delší než 150 bp při teplotě o 5-10 °C nižší než teplota tání). Pokud nejsou sekvence úplně shodné, mohou se spojit za méně přísných podmínek (přibližně o 25 °C pod teplotu tání) (Křemen,1998).

Hybridizace může být provedena buď v roztoku, nebo na nosičích. V prvním případě se hybridní molekuly oddělují chromatograficky nebo pomocí ultracentrifugace v rovnovážném hustotním gradientu. V druhém případě se hybridizace provádí po přichycení analyzované nukleové kyseliny na nosič, což je často nitrocelulosa nebo nylonová membrána (Křemen,1998).

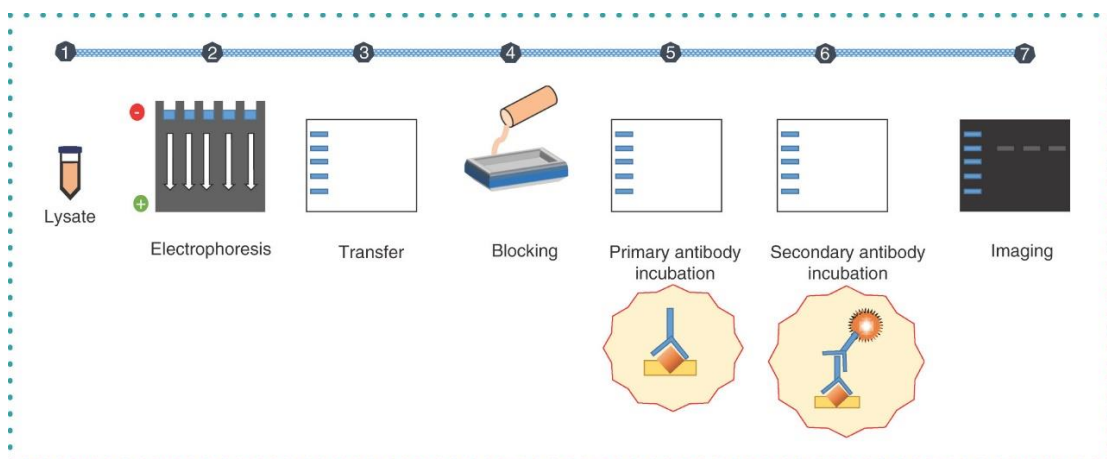
3.5.1. Western blotting

Western blotting je technika používaná k oddělení a detekci různých proteinů. Zahrnuje tři hlavní kroky: separaci proteinů podle jejich velikosti, přenos proteinů na membránu a detekci požadovaných proteinů pomocí protilátek. Tato technika se často využívá k identifikaci a analýze proteinů v biologických vzorcích (Begum, 2022).

Metoda se také využívá k studiu regulačních molekulárních mechanismů, které ovlivňují obrat proteinů, fyziologické změny a energetický metabolismus. Dále se používá k analýze aktivity kináz, určení subcelulárního umístění proteinů, zkoumání interakcí mezi proteiny, měření množství proteinů a sledování posttranslačních modifikací, jako jsou methylace, glykosylace, fosforylace, SUMOylace, ubikvitinylace a štěpení (Begum, 2022).

Jedná se o oblíbený, efektivní a rychlý nástroj v biochemickém výzkumu. Poskytuje jasné a snadno interpretovatelné výsledky, což jej činí široce využívanou rutinní metodou (Begum, 2022).

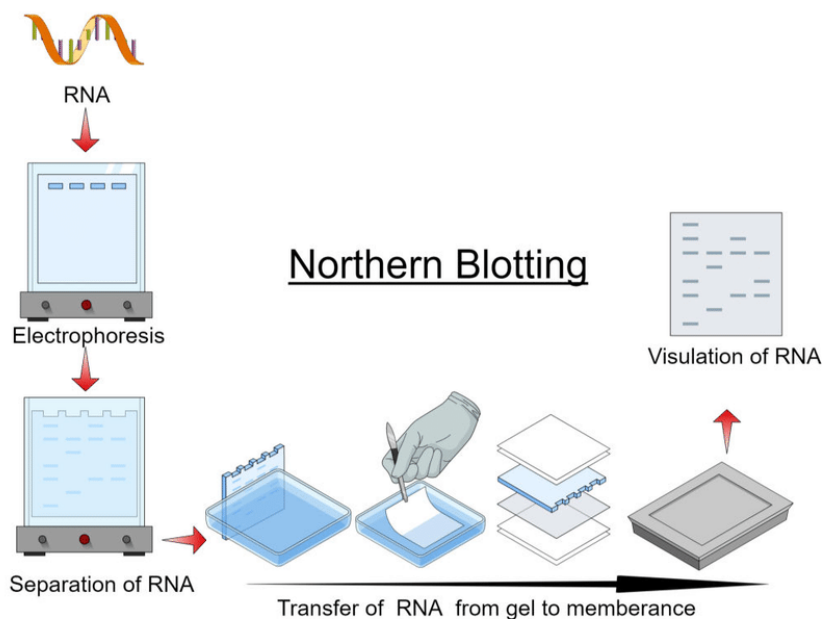
Princip této metody je, že se buňky získané z tkání pacienta nebo z krevních vzorků rozdělí a jejich obsah se umístí do mikrojamek na tenkém polyakrylamidovém gelu. Poté jsou proteiny odděleny elektroforézou podle velikosti a přeneseny na membránu. Na membráně jsou poté proteinové cíle detekovány pomocí protilátek, které jsou specifické pro proteiny spojené s rakovinou. Tímto způsobem lze identifikovat a kvantifikovat různé proteiny, které mohou sloužit jako biomarkery rakoviny. Analýza proteinů pomocí Western blottingu může poskytnout cenné informace o stavu rakoviny, například o jejím typu, stupeň agresivity nebo o účinnosti léčby. Tento přístup může být použit pro diagnostiku, sledování průběhu onemocnění a rozhodování o nejvhodnější léčebné strategii pro každého pacienta s rakovinou (Kang, 2014).



Obrázek 9 Vícekrokový Western blot začíná přípravou vzorku proteinu a končí detekcí specifického proteinu, který zkoumáme. Zahrnuje následující kroky: příprava vzorku, oddělení proteinů podle velikosti pomocí SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), přenos proteinů na membránu, blokování, inkubaci s primárními a sekundárními protilátkami a nakonec detekci cílového proteinu (Begum, 2022).

3.5.2. Northern blotting

Analýza RNA metodou Northern blotting zahrnuje tři hlavní kroky. Nejprve je RNA oddělena podle velikosti pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Poté je RNA přenesena na nylonovou membránu, kde si udržuje stejnou prostorovou distribuci jako v gelu. Poté se např. radioaktivně značená sonda (dnes se častěji využívá imunochemicky nebo fluorescenčně značená sonda), která je komplementární k cílové RNA sekvenci, hybridizuje s RNA na membráně. Nakonec jsou odstraněny nespecificky vázané sondy (He, 2013).



Obrázek 10 Schéma provedení Northern blottingu (Hamad, 2017).

Northern blotting je jednou z nejpoužívanějších metod k identifikaci, validaci a studiu expresního profilu sRNA, protože jde o kvantitativní, relativně levnou techniku, která je snadno dostupná pro většinu laboratoří (Gomollón S., 2011).

3.5.3. Southern blotting

Southern blotting je technika, která umožňuje přenos fragmentů DNA z elektroforetického gelu na membránový nosič. To umožňuje fixaci DNA fragmentů na membránu a vytvoření vzoru podobného tomu na gelu. Následně může být DNA hybridizována s označenými sondami, což umožňuje identifikaci specifických sekvencí DNA (Brown, 1993).

3.5.4. Microarrays

DNA mikročipy (DNA microarrays) jsou molekulárně biologickou metodou, stále častěji využívanou v lékařství. Stanovení profilu genové exprese vychází z úvahy, že ačkoliv všechny somatické buňky organismu obsahují tutěž výbavu DNA, vždy pouze určitá její část je u dané buněčné subpopulace přepisována do mediátorové RNA (mRNA) a jako templát je využita k

proteosyntéze. Na čípech je lokalizováno velké množství (tisíce až statisíce) sond, které reprezentují specifické sekvence DNA (Janíková, 2008).

Metoda je užitečná pro hledání specifických genů spojených s infekčními agens, genovým polymorfismem a analýzou exprese. Je rozšířeně využívána k prozkoumání exprese genů při různých onemocněních, což pomůže odhalit jejich příčiny a umožní přesnější léčbu (Bednář, 2000).

Na DNA mikročipech se používají krátké komplementární oligonukleotidy, které mají specifickou sekvenci bází uspořádanou v zrcadlovém pořadí. Tyto oligonukleotidy slouží k detekci cílové nukleové kyseliny, která se k nim váže (hybridizuje) pomocí komplementárních vazeb mezi bázemi A-T nebo G-C. DNA mikročipy obsahují tyto záchytné sondy. Pro zvýšení citlivosti metody se zkoumaná nukleová kyselina nejprve zesiluje, například pomocí PCR. Čím více je určitý gen exprimován, tím intenzivnější je fluorescence pozorovaná v odpovídající oblasti mikročipu DNA (Bednář, 2000).

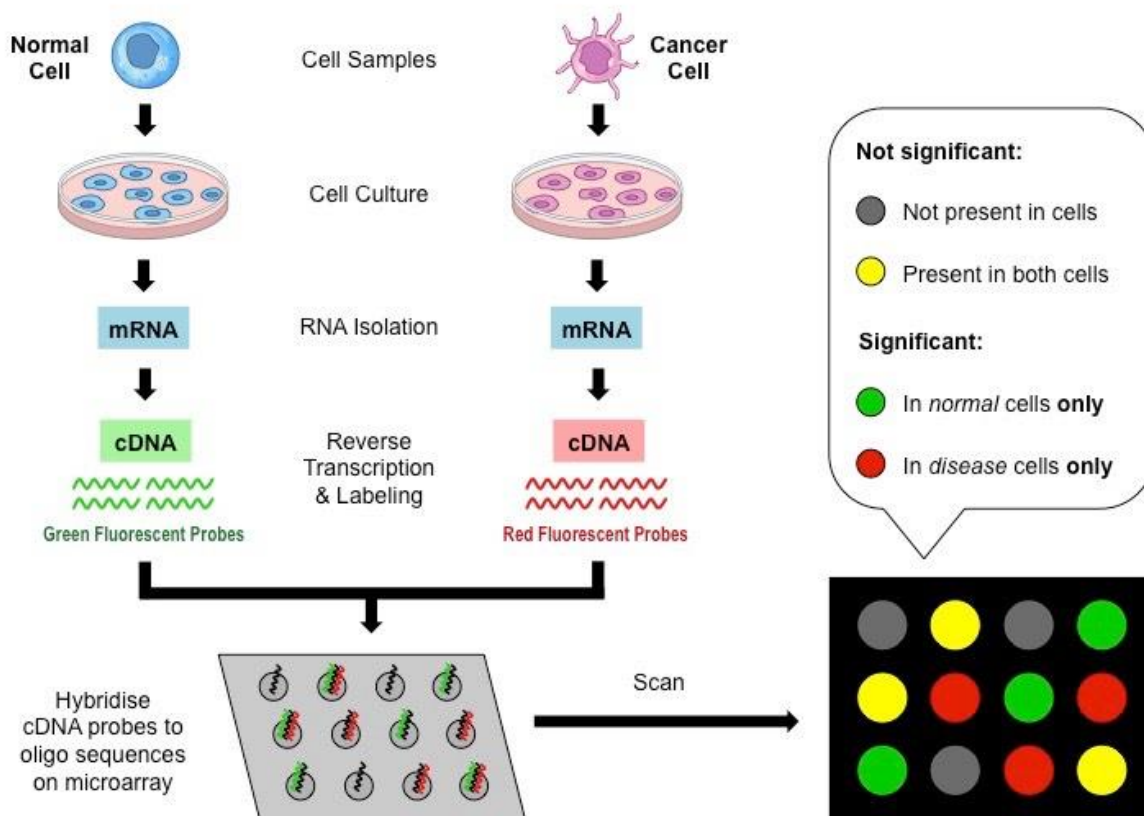
Konstrukce DNA mikročipu umožňuje současné testování mnoha genů najednou. Existuje několik přístupů k využití DNA mikročipů, včetně paralelního zkoumání široké oblasti genomu pomocí kolekce sond a zkoumání malé oblasti genomu na úrovni jednotlivých bodových mutací, což umožňuje zkoumání variant v genech (Bednář, 2000).

Technologie nabízí významné výhody v oblasti výzkumu, přičemž je vysoce výkonná, relativně cenově dostupná a umožňuje provádění většiny experimentálních a analytických kroků přímo v laboratořích molekulární biologie na většině univerzit, lékařských fakult a přidružených nemocnic (Zeng, 2011).

Pro vytvoření miRNA mikročipů je sada miRNA sond vytištěna na podložní sklíčka. RNA je následně izolována pomocí metody nebo činidla, které zachovává malé druhy RNA, a následně označena fluorescenčním barvivem. Jako kontrolní prvek slouží referenční DNA oligonukleotidy, které odpovídají určité podskupině miRNA a jsou značeny odlišným fluorescenčním barvivem. Referenční DNA má za úkol ověřit kvalitu sklíčka a hybridizace, a zároveň slouží k normalizaci dat (Zeng, 2011).

Následně jsou RNA a DNA smíchány a hybridizovány na mikročipovém sklíčku obsahujícím sondy pro většinu miRNA v databázi. Po omytí sklíčka je naskenováno a získány obrázky, na základě, kterých jsou kvantifikovány intenzity jednotlivých skvrn. Tyto surové signály jsou dále zpracovány a analyzovány jako data exprese odpovídajících miRNA (Zeng, 2011).

Pro snížení nákladů na mikročipy a zlepšení konzistence mikročipových experimentů je možné mikročipová sklíčka stripovat a regenerovat. Tímto způsobem lze optimalizovat náklady a dosáhnout konzistentních výsledků (Zeng, 2011).



Obrázek 11 Normální buňka produkuje zeleně značené cDNA, zatímco rakovinná buňka produkuje červeně značené cDNA. Tyto cDNA jsou hybridizovány s oligonukleotidy na mikročipu a výsledky jsou zaznamenány jako žluté (společné změny), zelené (změny pouze v normálních buňkách) nebo červené (změny pouze v rakovinných buňkách) tečky (BioNinja, (n.d.)).

Pokrok v technologiích, jako jsou DNA čipy a nové metody sekvenování genomu, umožňují systematickou analýzu genomů a odhalení širokého spektra strukturních variant spojených s rakovinou, včetně kopií genů. Mezinárodní projekty, jako HapMap, poskytly obrovský objem genetických dat, což umožňuje studovat genetické faktory spojené s rakovinou. V České republice existuje veřejně dostupná národní databáze pod záštitou Národního centra lékařské genomiky, která obsahuje informace o genetických variantách v české populaci. Princip aplikace metod analýzy genomu u osob s rakovinou spočívá v porovnání genomových informací pacienta s genetickou variabilitou populace za účelem odhalení genetických variant, které mohou přispět k vývoji rakoviny. Tyto informace mohou vést k personalizované léčbě rakoviny, včetně cílené terapie a imunoterapie (Kmoč, 2018).

3.5.5. In situ hybridizace

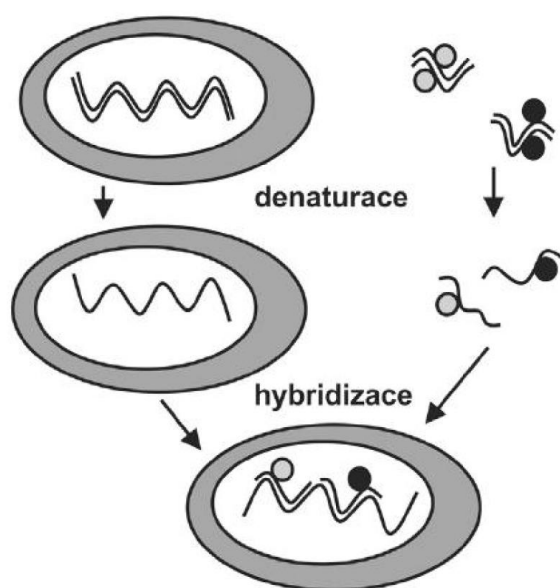
In situ hybridizace je technika, která umožňuje detekci specifických nukleotidových sekvencí přímo v buňkách, tkáňových vzorcích, a dokonce i v celých tkáních. Principem této metody je párování komplementárních sekvencí nukleotidové sondy s určitou cílovou sekvencí DNA nebo RNA. Sondy mohou být označeny různými způsoby, například radioaktivními,

fluorescenčními nebo antigenovými značkami. V závislosti na použité značce se k vizualizaci výsledků využívá různých metod, jako je autoradiografie, fluorescenční mikroskopie nebo imunohistochemie. In situ hybridizace je široce využívána jak ve výzkumných laboratořích, tak i v klinické praxi, zejména pro diagnostické účely (Jensen, 2014).

3.5.6. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

FISH je běžná technika v diagnostice genetických změn. Používá se k identifikaci specifických změn souvisejících s nádory. Jedná se o jednoduchý postup, který umožňuje zjistit různé genetické abnormality, jako jsou změny v genech jako ALK, ROS1, delece v oblastech jako 1p a 19q, genové fúze jako COL1A1-PDGFB, nerovnováhy v genomu jako 6p, 6q, 11q a zvýšená kopie genů jako HER2. Tyto informace jsou důležité pro personalizovanou onkologii, protože potvrzení těchto genetických změn může vést k specifické léčbě. V jiných případech může FISH pomoci patologům přesněji určit typ sarkomu nebo konečnou diagnózu (Chrzanowska, 2020).

Metoda zahrnuje dvě hlavní části: přípravu DNA sondy a cílové DNA, ke které se sonda váže. DNA sonda obvykle pochází z klonovaných zdrojů, jako jsou plazmidy nebo kosmidy, a obsahuje specifický gen nebo chromozomální oblast (Bayani, 2004). Může být označena různými způsoby, například fluorochromy, což jsou látky, které emitují světlo při osvětlení a jsou charakterizovány svými excitačními a emisními spektry. Jejich hlavní výhodou obvykle spočívá v malé velikosti, což nebrání vazbě sondy na DNA, a umožňuje tak přímé označení sond (Mrhalová, 2013). Cílová DNA může být buď chromozom, nebo jádro v klidové fázi buňky. Po denuraci obou sond a cílové DNA jsou obě jednovláknové a mohou se spojit. Po 24hodinové reakci následuje oplachování a inkubace s fluorescenčně označenými protilátkami, a pak se vzorek prozkoumá pod fluorescenčním mikroskopem. Úspěšná interpretace závisí na kvalitě materiálů, efektivitě spojování DNA a přesnosti detekce pomocí protilátek (Bayani, 2004).



Obrázek 12 Metoda I-FISH přeměňuje dvouvláknovou DNA na jednovláknové struktury a umožňuje přímé značení sond. Tyto sondy se vážou na komplementární části genomické DNA v denaturované tkáni na histologickém sklíčku, čímž vytvářejí fluorescenční signály (Mrhalová, 2013).

Metoda FISH se také často označuje jako I-FISH, když se používá k detekci změn v jádrech během interfáze. Naopak termín FISH se typicky vztahuje k analýze spiralizovaných chromozomů v metafázi (Mrhalová, 2013).

Při použití neradioaktivního značení pro analýzu genomů v rámci studia rakoviny se využívá menšího množství organických rozpouštědel, jako je formamid, což zjednodušuje práci a eliminuje problémy s likvidací odpadu. Tato metoda umožňuje provádět analýzu v běžně vybavených laboratořích a získat výsledky již během několika hodin hybridizace. To je významné pro rychlé vyhodnocení genetických variant spojených s rakovinou a umožňuje provádět analýzu i s malými množstvími buněk. Díky novým modifikacím a technikám jako vícebarevná fluorescenční in situ hybridizace (FISH) dochází k rapidnímu pokroku v molekulárním studiu chromozomů v souvislosti s rakovinou. I přesto jsou však některé metody molekulární cytogenetiky náročné na vybavení laboratoře, zejména co se týče mikroskopie a vysoce specializovaných přístrojů. Nicméně pro rutinní diagnostiku lze metodu FISH provádět i v laboratořích s běžnou technickou výbavou, což je významné z hlediska dostupnosti této diagnostiky pro onkologické pacienty. Komerčně dostupné kity pro analýzu DNA sond jsou v této oblasti široce využívány a umožňují provedení základních diagnostických testů s ohledem na genetické varianty spojené s rakovinou (Mazura, 2001).

4. Budoucnost diagnostiky rakoviny: Inovativní přístupy a technologie

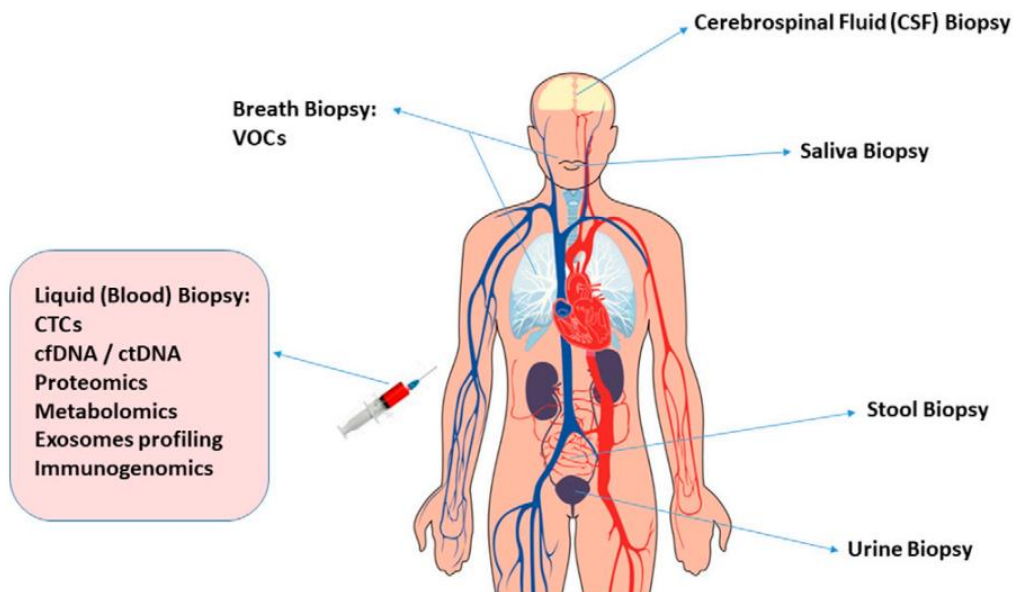
Diagnostika rakoviny se rychle vyvíjí díky pokrokům v technologiích a vědeckém výzkumu, které umožňují přesnější, rychlejší a méně invazivní metody detekce a sledování onemocnění. Mezi nejvýznamnější inovace patří tekuté biopsie, genomické a molekulární profilování, využití umělé inteligence, pokročilé zobrazovací techniky a nanotechnologie.

4.1. Tekutá biopsie: Cirkulující nádorové buňky

Cirkulující nádorové buňky (CTCs) jsou buňky, které se oddělily od primárního nádoru nebo metastatických míst a dostaly se do krevního oběhu. Studie naznačují, že epitelově-mezenchymální přechod (EMT) hraje roli v mobilizaci a šíření těchto nádorových buněk, čímž zvyšuje jejich schopnost pohybu a invaze. Během EMT ztrácejí epiteliální nádorové buňky své pevné buněčné kontakty a polaritu, čímž získávají protáhlý tvar a větší pohyblivost. Zajímavé je, že krevní destičky přiléhající k CTCs mohou samy o sobě vyvolat EMT. Tento proces je rovněž podporován prostředím nádorového mikroprostředí (Zhang, 2020).

CellSearch (Menarini Silicon Biosystems Inc., San Diego, CA) je v současnosti jediným systémem schváleným FDA pro detekci a počítání cirkulujících nádorových buněk (CTCs), který využívá epitelový specifický adhezní molekul (EpCAM) na povrchu těchto buněk. Studie od Allarda a kol. ukázala, že má průměrnou citlivost obnovy 85 % nebo vyšší (Wu, 2018).

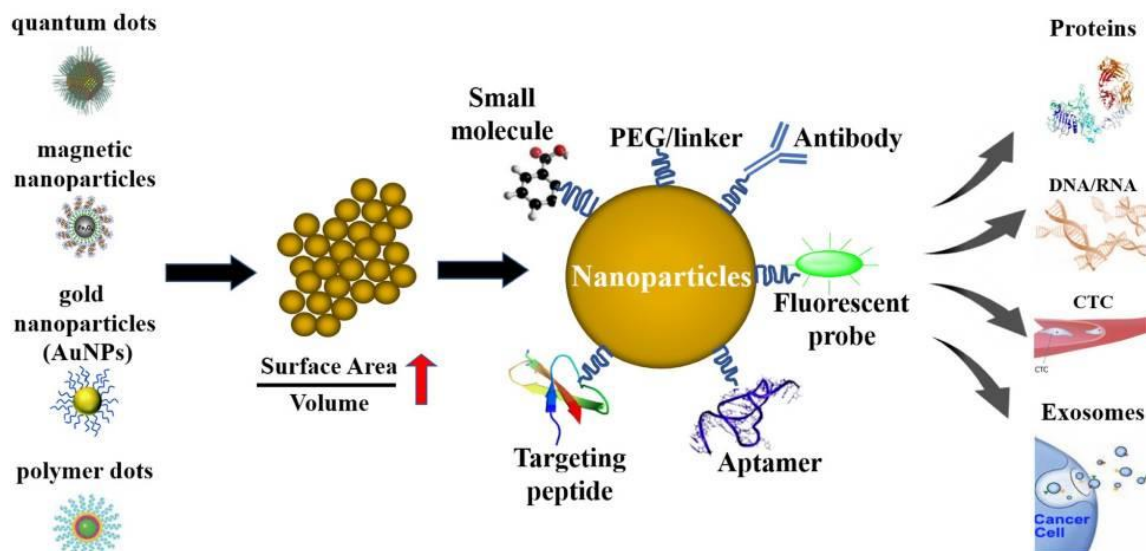
Ačkoli samotné počítání CTCs poskytuje omezené biologické informace, byly vyvinuty nové metody, jako je mikrofluidní platforma CTC-Chip. V této metodě CTCs interagují s mikrosloupkami pokrytými EpCAM pod laminárním prouděním. I když tato metoda zjednodušuje pracovní postup, stále závisí na detekci EpCAM, což nemusí vždy přesně definovat skutečné CTCs (Zhang, 2020).



Obrázek 13 Ilustrace různých typů neinvazivních biopsií, které se využívají k diagnostice a monitorování onkologických onemocnění. Jedná se o biopsie krevní, mozkomíšní, dechové, a také ze slin, moči a stolice (Wu, 2018).

4.2. Nanotechnologie v diagnostice rakoviny

Nanočástice se používají pro diagnostiku rakoviny k zachycování biomarkerů spojených s rakovinou, jako jsou proteiny, cirkulující nádorová DNA, cirkulující nádorové buňky a exozomy. Hlavní výhodou použití nanočástic při detekci rakoviny je jejich vysoký poměr povrchové plochy k objemu ve srovnání s běžnými materiály. Díky této vlastnosti mohou být povrchy nanočástic hustě pokryty protilátkami, malými molekulami, peptidy, aptamery a dalšími komponentami, které se mohou vázat a rozpoznávat specifické rakovinové molekuly. Prezentací různých vazebných ligandů na rakovinné buňky lze dosáhnout multivalentních účinků, které mohou zvýšit specifitu a citlivost detekčního testu. Diagnostické metody založené na nanotechnologiích jsou vyvíjeny jako slibné nástroje pro pohodlnou, nákladově efektivní a rychlou detekci rakoviny (Zhang, 2019).



Obrázek 14 Různé typy nanočástic s povrchovými úpravami (protilátky, peptidy, aptamery) umožňují efektivní detekci biomarkerů rakoviny, jako jsou proteiny, DNA/RNA, cirkulující nádorové buňky a exozomy, díky jejich vysokému poměru povrchové plochy k objemu (Zhang, 2019).

4.3. Umělá inteligence v diagnostice a terapii rakoviny

Umělá inteligence (AI) pronikla do medicíny a zejména do diagnostiky rakoviny, což představuje významnou a komplexní výzvu. Integrace AI do diagnostických procesů by mohla výrazně zlepšit detekci lézí, eliminovat lidské chyby, snížit náklady a urychlit screeningové programy. AI algoritmy dokáží analyzovat digitální snímky z radiologie a patologie a odhalit detaily neviditelné lidskému oku (radiomika a patomika). Spojení těchto analýz s klinickými a genetickými daty (radiogenomika) přispěje k lepšímu pochopení rakoviny a vývoji nových zobrazovacích biomarkerů. AI v onkozobrazování a onkopatologii může být využita k detekci lézí, charakterizaci nádorů a podpoře klinického rozhodování a prognóz. Přesto AI nemůže zcela nahradit lidskou roli, ale může být významným pomocníkem (Majumder, 2021).

ZÁVĚR

Vysokokapacitní metody v diagnostice rakoviny představují průlomový přístup k identifikaci a monitorování onkologických onemocnění. Tyto technologie mají potenciál významně zlepšit přesnost, rychlost a efektivitu diagnostiky rakoviny.

Mezi hlavní výhody vysokokapacitních metod patří sekvenování nové generace (NGS), zobrazovací techniky a hybridizační metody. Tyto metody umožňují detekci rakoviny v jejích raných stádiích, což je klíčové pro rychlý zásah a léčbu, a tím zvyšuje šance na úplné uzdravení pacientů.

NGS technologie, která umožňuje rutinní sekvenování celého genomu, má obrovský význam při hledání nových biomarkerů a zkoumání komplexních genetických změn. Tyto změny často zahrnují vzdálené sekvence genomu, které se na první pohled nezdají být propojené. Budoucí výzkum pravděpodobně odhalí nové vztahy mezi těmito sekvencemi, což povede k přesnější diagnostice rakoviny. Současně probíhají intenzivní studie, které se zaměřují i na epigenetické změny, jež hrají důležitou roli v rakovinných procesech. Tím se však problematika diagnostiky stává složitější a ukazuje, že jednoduché řešení pravděpodobně nebude možné. Vysokokapacitní metody analýzy velkých částí genomu tedy budou hrát klíčovou roli.

Přesto existují výzvy spojené s implementací těchto technologií do klinické praxe, jako jsou vysoké náklady a potřeba standardizace procesů. Nicméně, s pokračujícím technologickým vývojem a intenzivním výzkumem se očekává, že tyto překážky budou postupně překonány. Velkou pomocí se v budoucnosti může stát využívání umělé inteligence.

Celkově lze říci, že vysokokapacitní metody mají potenciál zásadně změnit diagnostiku rakoviny a posunout medicínu směrem k personalizované a přesné péči. Je nezbytné, aby výzkumné a klinické úsilí nadále podporovalo rozvoj a implementaci těchto metod, aby mohly co nejdříve přinést užitek pacientům trpícím touto závažnou chorobou.

POUŽITÁ LITERATURA

- ADHYANA, M. a W. D. ELERI. Insight into PCR testing for surgeons. *Surgery (Oxf)*. 2021, s. 759-768.
- ALSHAMMARI, A., H. Y. JEONG, J. H. HAN, I. RATHER a F. HAMAD. Detection of cytosolic tRNA in mammal by Northern blot analysis. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017, 12, s. 243-250.
- ARYA, M., I. S. SHERGILL, M. WILLIAMSON, L. GOMMERSALL, N. ARYA a H. R. PATEL. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005, 5(2), s. 209-219.
- BAYANI, J. a J. A. SQUIRE. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Current Protocols in Cell Biology*. 2004, 23, s. 22.4.1-22.4.52.
- BEDNÁŘ, M. DNA microarray technology and application. *Medical Science Monitor*. 2000, 6(4), s. 796-800.
- BEGUM, H., P. MURUGESAN a A. D. TANGUTUR. Western blotting: A powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*. 2022, 73(1), s. 58-69.
- BioNinja. DNA Mikročipy. [cit. 21.04.2024]. Dostupné z: <https://old-ib.bioninja.com.au/options/untitled/b4-medicine/dna-microarrays.html>
- BROWN, T. Southern blotting. *Current Protocols in Molecular Biology*. 1993, 21(1), s. 2-9.
- GHANNAM, J. Y., J. WANG a A. JAN. Biochemistry, DNA Structure. *StatPearls*. 2024.
- GROTENHERMEN, F. Konopí proti rakovině: stav vědy a praktické závěry pro léčení. Přeložila Ivana KRAUS. Olomouc: Fontána. 2022. ISBN 978-80-7651-090-6.
- GUO, L.-T. a A.-M. PYLEOVÁ. RT-based Sanger sequencing of RNAs containing complex RNA repetitive elements. *Methods in Enzymology*. 2023, 691, s. 17-27.
- DAMMANN, H., A. M. RICHTER, A. P. JIMÉNEZ, M. KÜSTER a C. WITHARANA. Impact of Natural Compounds on DNA Methylation Levels of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, 10, 2160 [cit. 2024-02-23]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2160>
- HARIS, M., S. K. YADAV, A. RIZWAN, A. SINGH, E. WANG, H. HARIHARAN, R. REDDY a F. M. MARINCOLA. Molecular magnetic resonance imaging in cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2015, 13, s. 313.
- HE, S. L. a R. GREEN. Northern blotting. *Methods in Enzymology*. 2013, 530, s. 75-87.

- HERINGTON, E. a S. MCCORMACKOVÁ. Genome-Wide Sequencing for Unexplained Developmental Delays and Multiple Congenital Anomalies: A Rapid Qualitative Review. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. 2019.
- HRUBAN, V. a I. MAJZLÍK. Obecná genetika. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. 2004.
- CHEN, C., Z. WANG, Y. DING, L. WANG, S. WANG, H. WANG a Y. QUIN. DNA Methylation: From Cancer Biology to Clinical Perspectives. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2022, 12, s. 326.
- CHRZANOWSKA, N. M., J. KOWALEWSKI a M. A. LEWANDOWSKA. Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors. *Molecules*. 2020, 25(8), s. 1864.
- Jak si Česko stojí v boji s rakovinou – Seznam Zprávy [cit. 09.02.2023]. Dostupné z: <https://www.seznamzpravy.cz/clanek/jak-si-cesko-stoji-v-boji-s-rakovinou-173790>
- JANÍKOVÁ, A., K. STAŇO-KOZUBÍK, B. TICHÝ, J. MAYER, Z. KRÁL, J. MICHALKA, I. VÁŠOVÁ a Š. POSPÍŠILOVÁ. *Transfuze Hematol. dnes*. 2008, 14(4), s. 188-194.
- JENSEN, E. Technical review: In situ hybridization. *Anatomical Record (Hoboken)*. 2014, 297(8), s. 1349-1353.
- JIN, C., X. LUO, X. LI, et al. Positron emission tomography molecular imaging-based cancer phenotyping. *Cancer*. 2022, 128(14), s. 2704-2716.
- KANG, C. C., J. M. LIN, Z. XU, S. KUMAR a A. E. HERR. Single-cell Western blotting after whole-cell imaging to assess cancer chemotherapeutic response. *Analytical Chemistry*. 2014, 86(20), s. 10429-10436.
- KLENER, P. *Klinická onkologie*. Praha: Galén. 2002. ISBN 80-7262-151-3.
- KMOCH, S. a J. ZEMAN. Moderní metody v diagnostice a výzkumu genetických příčin vzácných onemocnění. *Časopis lékařů českých*. 2018, 157, s. 133-136.
- KOLÍSKO, M. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa* [online]. 2017, 3, s. 73-76 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/2017-3/modernimetody-sekvenovani-dna.html>
- KŘEMEN, J., J. STŘÍBRNÁ a P. POHLREICH. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Praha: Karolinum. 1998, s. 27. ISBN 80-7184-525-6.
- LINKOS, Česká republika a rakovina v číslech. *Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [cit. 25.12.2022]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>

- LÓPEZ-GOMOLLÓN, S. Detecting sRNAs by Northern blotting. *Methods in Molecular Biology*. 2011, 732, s. 25-38.
- LOWES, L. E. a A. L. ALLAN. Circulating Tumor Cells and Implications of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Advances in Clinical Chemistry*. 2018, s. 121-181.
- MAČÁK, J. a J. MAČÁKOVÁ. *Patologie*. Praha: Grada Publishing. 2004. ISBN 80-247-0785-3.
- MAHAJAN, M. C. a A. S. MCLELLAN. Whole-Exome Sequencing (WES) for Illumina Short Read Sequencers Using Solution-Based Capture. *Methods in Molecular Biology*. 2020, 2076, s. 85-108.
- MAJUMDER, A. a D. SEN. Artificial intelligence in cancer diagnostics and therapy: current perspectives. *Indian Journal of Cancer*. 2021, 58(4), s. 481-492.
- MAZURA, I. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha: Karolinum. 2001. ISBN 80-246-0258-X.
- MOORE, D. L., T. LE a G. FAN. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013, s. 23-28.
- MRHALOVÁ, M. a R. KODET. Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, Praha. *Československá patologie*. 2013, 49(4), s. 114-122.
- MUZZEY, D., E. A. EVANS a C. LIEBER. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Current Genetic Medicine Reports*. 2015, 4, s. 158-165.
- NAKAGAWA, H. a M. FUJITA. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer Science*. 2018, 109(3), s. 513-522.
- Obecná patologie, molekulární biologie a genetika | zhoubná onemocnění foregutů. Společnost pro gastrointestinální onkologii čls jep. [cit. 21.02.2023]. Dostupné z: <https://www.sgo-cls.cz/onkologie-horni-casti-travicneho-traktu/obecna-cast/obecna-patologie-molekularni-biologie-a-genetika/>
- PAPANICOLAU-SENGOS, A. a K. ALDAPE. DNA Methylation Profiling: An Emerging Paradigm for Cancer Diagnosis. *Annual Review of Pathology*. 2022, 17, s. 295-321.
- PEILONG, L., D. LUTAO, G. MOHSENI, Y. ZHANG a G. MOHSENI. Liquid biopsies based on DNA methylation as biomarkers for the detection and prognosis of lung cancer. *Clinical Epigenetics* [online]. 2022, 14(118) [cit. 2024-02-23]. Dostupné z: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-022-01337-0#citeas>
- POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Obecná patologie*. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-773-8.

- QURESHI-BAIG, K., P. ULLMANN, S. HAAN a E. LETELLIER. Tumor-Initiating Cells: a critical review of isolation approaches and new challenges in targeting strategies. *Molecular Cancer*. 2017, 16.
- RAVIKUMAR, H. a A. R. DURAJPANSKÝ. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2021, 5, s. 800-812.
- ROY, P. S. a B. J. SAIKIA. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*. 2016, 53(3), s. 441-442.
- SHIN, Y. J. WES WGS Panels: Which is the best NGS approach? 3billion [online]. 12.01.2022 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://3billion.io/blog/wes-wgs-panels/>
- SKVORTSOVA, K., C. STIRZAKER a P. TABERLAY. The DNA methylation landscape in cancer. *Essays in Biochemistry*. 2019, 63(6), s. 797-811.
- SLABÝ, O. Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexomové a cílené – hotspot – sekvenování. *CEITEC*. 2019, 1, s. 34-38.
- SOCHIVKO, G. R., A. A. FEDOROV, D. A. VARLAMOV a R. V. PETROV. Accuracy of quantitative real-time PCR analysis. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2013, s. 105-108.
- SOMMEROVÁ, L., E. ONDROUŠKOVÁ a R. HRSTKA. Nádorové buňky jako dynamický systém – molekulární a fenotypové změny v průběhu vzniku, progresu a šíření nádoru. *Klinická Onkologie*. 2016, s. 29.
- STROM, C. M., S. RIVERA, C. ELZINGA, T. ANGELONI, S. H. ROSENTHAL, D. GOOS-ROOT, M. SIAW, J. PLATT, C. BRAASTADT, L. CHENG, D. ROSS a W. SUN. Development and Validation of a Next-Generation Sequencing Assay for BRCA1 and BRCA2 Variants for the Clinical Laboratory. *PLoS One*. 2015, 10(8).
- ŠEDIVCOVÁ, M., P. MARTÍNEK, J. STEHLÍK, P. GROSSMANN, J. KAŠPÍRKOVÁ a T. VANĚČEK. Sekvenování – klasická metodika. *Česká patologie*. 2013, 3, s. 122-128.
- TARUTTIS, A., G. M. VAN DAM a V. NTZIACHRISTOS. Mesoscopic and Macroscopic Optoacoustic Imaging of Cancer. *Cancer Research*. 2015, 75(8), s. 1548-1559.
- WAN, T. S. Cancer Cytogenetics: An Introduction. *Methods in Molecular Biology*. 2017, 1541, s. 1-10.
- WEI, W. a M. T. LEWIS. Identifying and targeting tumor-initiating cells in the treatment of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2015, 22(3).
- WU, X., L. ZHU a P. C. MA. Next-Generation Novel Noninvasive Cancer Molecular Diagnostics Platforms Beyond Tissues. *Journal of Hematology & Oncology*. 2018, 11(1), s. 964-977.

ZENG, Y. a X. ZHANG. Performing custom microRNA microarray experiments. *Journal of Visualized Experiments*. 2011, 56.

ZHANG, Y., M. LI, X. GAO, Y. CHEN a T. LIU. Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges, and opportunities. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019, 12, s. 137.

ZHANG, P., H. ZHOU, K. LU, Y. WANG a T. FENG. Circulating tumor cells in the clinical cancer diagnosis. *Clinical and Translational Oncology*. 2020, 22(3), s. 279-282.

ZHANG, X. H. Why cancer cells metastasize? *Medical Hypotheses*. 2013, 80(5), s. 669-671.