

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2023**

**Jaroslava Králová**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**Jaroslava Králová**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**EXPRESNÍ PROFILY CIRKULUJÍCÍCH MIRNA JAKO  
POTENCIÁLNÍ BIOMARKER MELANOMU**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D.

PLZEŇ 2023

Zde se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Zde se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 3. 2023

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Králová Jaroslava

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Expresní profily cirkulujících miRNA jako potenciální biomarker melanomu

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D.

Počet stran – číslované: 55

Počet stran – nečíslované: 41

Počet příloh: 3

Počet titulů použité literatury: 56

Klíčová slova: melanom, miRNA, izolace RNA, RT real-time PCR, exprese miRNA

Souhrn:

Tato bakalářská práce popisuje problematiku stanovení expresních profilů cirkulujících miRNA jako potenciálních biomarkerů melanomu. Teoretická část se věnuje procesu, který je charakteristický pro vznik a průběh kancerogeneze. Následuje kapitola o nádorovém onemocnění - maligním melanonu. Část teoretické bakalářské práce se také věnovala molekulám miRNA, významnosti tekuté biopsie a metodám pro stanovení expresních hladin miRNA metodou RT real-time PCR.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zvládnutí metodiky izolace plazmy z plné krve a následné izolace RNA z plazmy pacientů chirurgicky léčených pro maligní melanom. Následně byla u vybraných pacientů stanovována exprese předoperačních a pooperačních hladin 23 molekul miRNA pomocí metody RT real-time PCR. Po následném vyhodnocení byl nalezen signifikantní vztah mezi předoperačními hladinami expresí 6 miRNA k celkové době přežití (OS) a signifikantní vztah 5 molekul miRNA k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění (DFI). U předoperačních hladin 4 molekul miRNA nalezen signifikantní vztah jak k celkovému přežití, tak k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění.

## **Abstract**

Surname and name: Králová Jaroslava

Department: The Department of Paramedical science, Medical diagnostics studies and Public health

Title of thesis: Expression profiles of circulating miRNAs as a potential biomarker of melanoma

Consultant: RNDr. Kateřina Houfková, Ph.D.

Number of pages – numbered: 55

Number of pages – unnumbered: 41

Number of appendices: 3

Number of literature items used: 56

Keywords: melanoma, miRNA, RNA isolation, RT real-time PCR, miRNA expression

Summary:

This bachelor thesis describes the problem of determining the expression profiles of circulating miRNAs as potential biomarkers of melanoma. The theoretical part is devoted to the process that is characteristic for the origin and progression of carcinogenesis. This is followed by a chapter focusing on malignant melanoma. The theoretical part of the bachelor thesis was also devoted to miRNA molecules, the importance of liquid biopsy and methods for determination of miRNA expression levels by RT real-time PCR.

The aim of the practical part of the bachelor thesis was to master the methodology of isolation of plasma from whole blood and subsequent isolation of RNA from plasma of patients undergoing surgical treatment for malignant melanoma. Subsequently, the expression of preoperative and postoperative levels of 23 miRNA molecules was determined in selected patients using RT real-time PCR. After subsequent evaluation, a significant relationship between preoperative expression levels of 6 miRNAs and overall survival (OS) and a significant relationship of 5 miRNA molecules and disease-free interval (DFI) was found. In addition, a significant relationship for the preoperative levels of 4 miRNAs to both overall survival and symptom-free recurrence interval was found.

## **Předmluva**

Bakalářská práce pojednává o stále aktuálnějším tématu nádorového onemocnění kůže – maligním melanomu, a to v souvislosti s využitím vybraných molekul miRNA. Molekuly miRNA mají potenciál stát se klinicky užívanými nádorovými biomarkery, a to díky jejich využití k včasnému zachytu onemocnění, volbě nejúčinnější terapie a ke kontrole průběhu léčby.

Úkolem této bakalářské práce bylo osvojení si základních postupů v laboratoři a zvládnutí metodiky izolace plazmy z plné krve s následnou izolací RNA z plazmy u 50 pacientů chirurgicky léčených pro maligní melanom. Dále byla u 22 vybraných pacientů stanovována exprese před a pooperačních hladin 23 molekul miRNA metodou RT real-time PCR a cílem bylo provést statistické vyhodnocení signifikantních rozdílů před a pooperačních hladin miRNA. Také byl hodnocen vztah těchto miRNA k celkové době přežití (OS) a k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění (DFI). Tato bakalářská práce je součástí projektu, probíhajícího na Ústavu biologie LF UK v Plzni.

## **Poděkování**

Poděkování patří RNDr. Kateřině Houfkové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení práce, poskytování cenných rad, materiálních podkladů a za dohled při laboratorní práci. Dále děkuji za její vstřícnost, ochotu, čas a podporu věnovanou během psaní této bakalářské práce.

Děkuji Ústavu biologie LF UK v Plzni za poskytnutí laboratorního vybavení pro zpracování praktické části bakalářské práce.



# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	12
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	13
SEZNAM TABULEK .....	15
SEZNAM ZKRATEK .....	16
ÚVOD .....	20
TEORETICKÁ ČÁST .....	22
1 KANCEROGENEZE.....	22
1.1 Vznik nádorového onemocnění .....	22
1.1.1 Obecné příčiny počátku kancerogeneze .....	22
1.1.2 Poškození protoonkogenů.....	23
1.1.3 Poškození tumor-supresorových genů.....	24
1.2 Rozvoj a průběh kancerogeneze .....	25
1.2.1 Vícestupňový proces.....	25
1.2.2 Průběh kancerogeneze .....	25
1.3 Znaky charakterizující nádory .....	26
1.3.1 Soběstačnost v produkci růstových faktorů.....	26
1.3.2 Necitlivost k signálům zastavující buněčný cyklus .....	27
1.3.3 Schopnost nepodléhat apoptóze.....	28
1.3.4 Neomezený replikační potenciál.....	28
1.3.5 Posílená angiogeneze .....	29
1.3.6 Propuknutí invazivity a následný vznik metastáz.....	30
1.3.7 Změny ve funkci energetického metabolismu .....	30
1.3.8 Necitlivost na reakce vyvolané imunitním systémem .....	31
2 MELANOM.....	33
2.1 Faktory ovlivňující vznik melanomu a etiopatogeneze .....	33
2.2 Klinické vyšetření melanomu .....	34
2.3 Klinické varianty melanomu.....	35
2.3.1 Povrchově se šířící melanom.....	35
2.3.2 Nodulární melanom .....	35
2.3.3 Lentigo maligna melanoma .....	35
2.3.4 Akrolentiginózní melanom .....	36
2.4 Prognóza a mortalita .....	36
2.5 Terapie a prevence .....	37
3 MIKRORNA .....	39
3.1 Biogeneze mikroRNA.....	39

3.2	MikroRNA a kancerogeneze .....	40
3.3	Cirkulující mikroRNA jako biomarkery nádoru .....	40
3.3.1	Původ cirkulujících mikroRNA .....	41
3.3.2	Výskyt cirkulujících mikroRNA .....	41
3.3.3	Stabilita cirkulujících mikroRNA .....	41
3.4	MikroRNA u maligního melanomu .....	42
4	TEKUTÁ BIOPSIE .....	44
4.1	Cirkulující nádorové buňky (CTC) .....	45
4.2	Volná cirkulující DNA (cfDNA) .....	45
4.2.1	Cirkulující nádorová DNA (ctDNA) .....	46
5	METODY STANOVENÍ EXPRESNÍCH HLADIN MIRNA .....	47
5.1	Izolace plazmy z plné krve .....	47
5.1.1	Izolace a purifikace nukleových kyselin .....	47
5.1.2	Izolace miRNA .....	48
5.2	RT-real-time PCR .....	49
5.2.1	PCR (polymerázová řetězcová reakce) .....	49
5.2.2	RT-real time PCR .....	50
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	52
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	52
6.1	Hlavní cíl .....	52
6.2	Dílčí cíle .....	52
7	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	53
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	54
9	METODIKA PRÁCE .....	55
9.1	Izolace plazmy z plné krve .....	55
9.1.1	Přístrojové vybavení .....	55
9.1.2	Postup izolace plazmy z plné krve .....	55
9.2	Izolace RNA (včetně miRNA) z plazmy .....	56
9.2.1	Přístrojové vybavení .....	56
9.2.2	Postup izolace RNA z plazmy .....	60
9.2.3	Postup měření koncentrace miRNA na NanoDropu .....	61
9.3	Stanovení molekul miRNA pomocí RT real-time PCR .....	62
9.3.1	Přístrojové vybavení .....	62
9.3.2	Postup reverzní transkripce při použití kitu: TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit .....	65
9.3.3	Postup pro real-time PCR .....	65
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	67

10.1	Koncentrace a čistota izolovaných patientských vzorků RNA.....	67
10.1.1	Vyhodnocení hodnot koncentrace izolovaných vzorků RNA .....	67
10.1.2	Vyhodnocení čistoty izolovaných vzorků RNA .....	68
10.2	Statistické vyhodnocení získaných expresních hladin miRNA.....	69
10.2.1	Vyhodnocení předoperačních a pooperačních hladin miRNA .....	70
10.2.2	Analýza přežití.....	70
	DISKUZE .....	71
	ZÁVĚR.....	74
	SEZNAM LITERATURY .....	75
	SEZNAM PŘÍLOH .....	82
	PŘÍLOHY .....	83
	Příloha A - Tabulka s naměřenými koncentracemi a čistotou všech zpracovaných vzorků s náběrem před i po chirurgické resekci. ....	83
	Příloha B - Obrázky grafů intervalů bez příznaků recidivy onemocnění (DFI). ....	86
	Příloha C - Obrázky grafů celkového přežití (OS). ....	91

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Koncentrace RNA v izolovaných vzorcích.....	68
Graf 2: Čistota izolovaných vzorků RNA, 260/280 .....	69

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Centrifuga Eppendorf 5804R. ....	55
Obrázek 2: Jednokanálové pipety Eppendorf Research. ....	57
Obrázek 3: Centrifuga Fresco 21. ....	57
Obrázek 4: Centrifuga MiniSpin®. ....	58
Obrázek 5: Centrifuga Micro Star 17. ....	58
Obrázek 6: Křivka koncentrace RNA v softwaru NanoDrop 1000 3.7. ....	59
Obrázek 7: Spektrofotometr NanoDrop ND-1000. ....	59
Obrázek 8: Termocycler T100 Thermal Cycler. ....	63
Obrázek 9: Laminární box ZEPHYRUS® PCR Box Harmony. ....	63
Obrázek 10: Termocycler Stratagene Mx3005P. ....	64
Obrázek 11: Průběh real-time PCR vybraných miRNA. ....	64
Obrázek 12: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-320 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	86
Obrázek 13: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-494 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	87
Obrázek 14: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-1908 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	88
Obrázek 15: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-4487 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	89
Obrázek 16: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-99a ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	90
Obrázek 17: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-221 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	91
Obrázek 18: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-320 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	92
Obrázek 19: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-494 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	93

Obrázek 20: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-1260 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	94
Obrázek 21: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-1908 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	95
Obrázek 22: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-99a ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom. ....	96

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Tabulka s naměřenými koncentracemi a čistotou vzorků izolované RNA před a po operaci.....	83
--	----

## SEZNAM ZKRATEK

3'	3' untranslated region, 3' nepřekládaná oblast
ABCD	Assymetry - Border irregularity - Color variegation - Diameter, asymetrie - nepravidelnost okrajů - barevná pestrost – průměr
acetyl-KoA	Acetyl coenzyme A, acetylkoenzym A
AGO2	Argonaut protein 2, protein rodiny argonaut 2
AJCC	American Joint Committee on Cancer, Americký výbor proti rakovině
AKT/PKB	AKT/PKB signaling pathway, AKT/PKB signální dráha
ATP	Adenosine triphosphate, adenosintrifosfát
Bax	BCL2-associated X protein
bFGF	Basic fibroblast growth factor, bazický fibroblastový růstový faktor
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, V-raf myší sarkomový virový onkogenní homolog B1
CD8+	Cluster of differentiation 8+, diferenciační skupina 8+
CDK	Cyclin-dependent kinase, cyklin-dependentní kináza
Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4, cyklin-dependentní kináza 4
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A
cfDNA	Circulating free DNA, cirkulující volná DNA
CpG	Cytosin-phosphate-Guanin, cytosin-fosfát-guanin
CTC	Circulating tumor cells, cirkulující nádorové buňky
ctDNA	Circulating tumor DNA, cirkulující nádorová DNA



CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, Cytotoxický T-lymfocytární antigen 4
DFI	Disease-free interval, interval bez příznaků recidivy onemocnění
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8, DiGeorgeův syndrom kritická oblast 8
DNA	Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, etylendiaminotetraoctová kyselina
EGF	Epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
EGF-R/erbB	Epidermal growth factor receptor, receptor pro epidermální růstový faktor
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule, adhezní molekula epitelálních buněk
Fas	Fas cells surface death receptor, Fas buněčný povrchový receptor smrti
FN	Fakultní nemocnice
GM 130	Golgi matrix protein 130, protein 130 Golgiho komplexu
GTP	guanosine triphosphate, guanosintrifosfát
HER2/neu	Human epidermal receptor 2, lidský epidermální receptor 2
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1-alpha, hypoxií indukovaný faktor 1-alfa
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase, lidská telomerická reverzní transkriptáza
KIT	KIT proto-oncogene, KIT protoonkogen
LDH	Lactate dehydrogenase, laktátdehydrogenáza

LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
MEK	Mitogen-activated protein kinase, mitogenem aktivovaná proteinkináza
miRNA	MicroRNA - micro ribonucleic acid, mikroRNA – mikro ribonukleová kyselina
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor, mikroftalmus asociovaný transkripční faktor
MMP	Matrix metalloproteinase, matrixová metaloproteináza
mRNA	Messenger RNA, mediátorová RNA
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
OS	Overall survival, celkové přežití
p14	Protein p14
p16	Protein p16
p53	Tumor protein p53, nádorový protein p53
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase, fosfatidylinositol-3-kináza
pRb	Retinoblastoma protein, retinoblastomový protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, fosfatázový a tensinový homolog
PTPRD	Protein-Tyrosine Phosphatase Delta, proteinová tyrozin fosfatáza Delta
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce
Ran	Ras-related nuclear protein, s Ras související jaderný protein

RAS	RAS family genes, geny rodiny RAS
Rb	Retinoblastoma gene, retinoblastomový gen
RISC	RNA-induced silencing complex, RNA indukovaný umlčující komplex
RNA	Ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
RPM	Revolutions per minute, otáčky za minutu
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, reverzní transkripce a kvantitativní polymerázová řetězová reakce
Tc-	Cytotoxic T cell, cytotoxické T-lymfocyty
TNM	Tumor – nodus – metastasis, tumor – regionální mízní uzliny – vzdálené metastázy
TP53	Gene for tumor protein p53, gen pro nádorový protein p53
TRBP	TAR RNA-binding protein, TAR RNA vazebný protein
TSP-1	Thrombospondin-1, trombospondin-1
UV	Ultraviolet, ultrafialové
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor

## ÚVOD

Incidence melanomu v průběhu posledních let celosvětově i v České republice narůstá a je příčinou většiny úmrtí na rakovinu kůže po celém světě. Ještě znepokojivější je míra smrtelné recidivy, která se vyskytuje po léčbě přibližně u 20 % pacientů. Maligní melanom je vysoce agresivní rakovina kůže s metastázemi rychle se rozšiřujícími do regionálních lymfatických uzlin (stadium 3) a do vzdálených orgánů (stadium 4). Jednou ze standardních léčebných metod progresivního melanomu ve 4. stadiu, je cílená onkoterapie a cílená léčba inhibitory BRAF (např. vemurafenib, dabrafenib) v kombinaci s inhibíto rem MEK (např. trametinibem), které mohou účinně působit proti melanomům s mutací BRAFV600E. Pro vhodný výběr terapeutické metody a stanovení prognózy nádoru se v současné době užívají i biomarkery, namísto již už dříve používaných zobrazovacích metod. Díky svým vlastnostem jsou biomarkery vhodnými ukazateli fyziopatologických procesů v těle pacienta a dokážou sloužit i k odhalení eventuální recidivy. V posledních letech se stále zvyšuje popularita biomarkerů nukleových kyselin jako jsou například molekuly ctDNA či miRNA, kterým je věnována pozornost i v této bakalářské práci.

Bakalářská práce je rozdělena na dvě části, a to na teoretickou a praktickou část. Teoretická část se věnuje počátku a průběhu procesu kancerogeneze a také přibližuje osm charakteristických znaků typických pro maligní nádorové onemocnění. Následující část je věnována malignímu melanomu, tedy nádorovému onemocnění kůže. Je zde zmiňována jeho incidence, rizikové faktory ovlivňující jeho vznik, průběh klinického vyšetření pacienta s melanomem, popis čtyř základních histologických typů melanomu, prognóza a mortalita tohoto onemocnění a v neposlední řadě jsou zde zmíněny možnosti terapie a prevence před vznikem maligního melanomu. Následuje část, která je zaměřena na molekuly miRNA, konkrétně na jejich biogenezi, původ, výskyt, stabilitu a funkci při kancerogenezi, která umožňuje extracelulárním molekulám miRNA stát se vhodnými neinvazivními biomarkery fyziopatologických procesů v těle pacienta. V souvislosti se získáním potřebného biologického materiálu pacienta je zde zmíněna metoda tekuté biopsie, která představuje minimálně invazivní metodu pro získání vzorku ke stanovení diagnózy, prognózy ale i pro vybrání eventuální terapie. V poslední řadě se teoretická část bakalářské práce věnuje metodám stanovení expresních hladin miRNA.

V praktické části je úkolem osvojení si základních postupů v laboratoři a zvládnutí metodiky izolace plazmy z plné krve s následnou izolací RNA z plazmy u 50 pacientů (100

vzorků) chirurgicky léčených pro maligní melanom. Dále byla u 22 vybraných pacientů (44 vzorků) stanovována exprese před a pooperačních hladin 23 molekul miRNA metodou RT real-time PCR. Praktická část bakalářské práce byla vykonávána za odborného dohledu na Ústavu biologie LF UK v Plzni. Nedílnou součástí praktické části je také podrobný popis použitých metod, vyhodnocení koncentrace a čistoty izolované miRNA a statistické vyhodnocení naměřených expresních hladin miRNA.

# TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část této bakalářské práce začíná kapitolou, kde je popsán proces kancerogeneze a charakteristické znaky maligního nádoru. V další kapitole je přibliženo čím dál tím častěji zmiňované téma nádorového onemocnění kůže – maligní melanom. Následující kapitola je věnována molekulám miRNA a jejich potenciálnímu praktickému využití k časné diagnostice nádorových onemocnění. V teoretické části je také popsán princip a využití tekaté biopsie, poslední kapitola je věnována metodám stanovení expresních hladin miRNA.

## 1 KANCEROGENEZE

Kancerogeneze, jinak také karcinogeneze, je vícestupňový složitý proces, na kterém se podílejí faktory genetické, ale i vlivy vnějšího prostředí, kdy dochází k postupné transformaci normální buňky na buňku nádorovou (Adam et al., 2011).

### 1.1 Vznik nádorového onemocnění

Nádorová onemocnění v současné době řadíme mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí v České republice (Český statistický úřad, 2014). Stupeň přežití se však u mnoha typů nádorových onemocnění zlepšuje, díky velkému zdokonalení screeningových metod nádorů a pokroku v léčbě a prevenci (Mayoclinic, 2022). Příčin vzniku a rozvoje nádorového onemocnění je mnoho. Základní příčinou je vznik mutací klíčových genů podílejících se na regulaci buněčného cyklu, opravách DNA a případné apoptóze buňky. Tyto mutace nastávají především ve dvou typech genů, a to v protoonkogenech a nádorových supresech (Brdička, 2015).

#### 1.1.1 Obecné příčiny počátku kancerogeneze

Dnes je již známo, že proces, při kterém se normální buňky progresivně mění v buňku plně maligní, obsahuje celou řadu mutací, které vznikají v návaznosti s poškozením genomu. Toto poškození může vzniknout důsledkem endogenních dějů jako je například chybná replikace DNA, vnitřní chemická nestabilita určitých bází DNA nebo působení volných radikálů vzniklých při metabolické přeměně. K poškození genomu může také vést působení exogenních činitelů, jako je UV záření, ionizující záření, chemické karcinogenní látky a následky vzniklé infekcí karcinogenních virů. Buňky jsou vybaveny mechanismy k opravě těchto poškození, ale z nejrůznějších příčin se objeví chyby s trvalými změnami v genomu tedy mutace (Bertram, 2000; Brdička, 2015).

Základem pro vznik kancerogeneze je nestabilita genomu buňky, která vytváří prospěšné prostředí pro vznik nádorové buňky z fyziologicky fungující buňky. Příčinou nestability genomu je poškození hlavních kontrolních, reparačních a regulačních mechanismů – buněčné proliferace, diferenciaci a buněčné smrti. Kancerogeneze tedy propuká ve tkáních, ve kterých došlo k narušení buněčné homeostázy dysplastickými, hyperplastickými či regeneračními změnami. Můžeme pozorovat chyby ve dvou úrovních. První úroveň genomové nestability je defekt reparačních mechanismů genomové DNA. Tyto reparační mechanismy jsou určeny k detekování a reparaci chyb, vzniklých například chybným párováním nukleových bází při replikaci. Pro nádorové buňky jsou také typické numerické a strukturní chromozómové aberace, které podporují jejich růst a bujení. Aby však mohly nádorové buňky s takovými aberacemi přežít, musí dojít u těchto buněk ke vzniku mechanismu, který dokáže obejít kontrolní body buněčného cyklu a vyhnout se tak apoptóze. (Hanahan et Weinberg, 2011; Snustad et Simmons, 2017).

V buňce může také dojít ke změnám epigenetickým. Epigenetické změny jsou dědičné změny v genové expresi, které nezpůsobují změny v sekvenci DNA, ale navozují podobný dopad jako mutace. Tyto změny mají vliv na fenotyp, zatímco genotyp zůstává nezměněn, a to díky tomu, že jejich účinek cílí na změnu chemické struktury chromatinu. Nejčastěji dochází v nádorových buňkách k poškození metylace DNA v oblasti CpG ostrůvků, které způsobí deaktivaci nádorově supresorových genů (Brdička, 2015; Hofmanová, 2013).

### **1.1.2 Poškození protoonkogenů**

Protoonkogeny jsou specifické geny nacházející se v normálních buňkách organismu a mají velký význam pro jejich správnou funkci. Produkty těchto genů se podílejí především na regulaci buněčného cyklu, buněčné diferenciaci a programované buněčné smrti. Mutací v protoonkogenu dojde ke změně jejich funkce v onkogeny, které začnou fungovat ve prospěch nádoru. Zvýšená exprese stimuluje buňky k nadměrné buněčné proliferaci a dochází k inhibici buněčné diferenciaci. Skupina genů, nazývaných se onkogeny, byla poprvé izolována z viru Rousova sarkomu u kuřat, a to v roce 1970. Tento virus se řadí mezi onkogenní retroviry (Hofmanová, 2013; Kontomanoli et al., 2020; Snustad et Simmons, 2017).

Mutace, které vedou k přeměně protoonkogenu, se vyskytují v M fázi, tedy ve fázi buněčného dělení. Jde převážně o chyby jako je například změna v nukleotidové sekvenci, transkripci či expresi, které vznikají spontánní cestou. Nejčastější chyby vedoucí k mutacím jsou na úrovni bodových mutací, chromozomálních aberací a amplifikace genu. Pro přeměnu

protoonkogenu na aktivní onkogen stačí mutace pouze v jedné alele, proto je můžeme označit jako mutace dominantní a vyskytují se až na několik málo výjimek pouze v somatických nádorových buňkách (Hofmanová, 2013; Kontomanolis et al., 2020; Snustad et Simmons, 2017).

Onkogeny jsou rozděleny do několika rodin dle funkčnosti jejich produktů. U různých malignit se objevují mírné změny ve vyskytujících se mutovaných onkogenech, ale geny rodiny RAS byly prokázány u více jak u poloviny maligních nádorů. Onkogenní RAS geny můžeme stanovit u pacientů s kolorektálním karcinomem, malobuněčným plicním karcinomem, a také například u karcinomu slinivky břišní (Goetz et Krutilková, 2002; Tomášek et Berkovcová, 2013).

### **1.1.3 Poškození tumor-supresorových genů**

Na rozdíl od protoonkogenů, tumor-supresorové geny zabraňují růstu nádorů a vedou k fyziologickému vývoji buněk. Účastní se správné regulace buněčného cyklu, proliferace, buněčného dělení a také se podílí na reparaci DNA a případné apoptóze (Kontomanolis et al., 2020).

K nefunkčnosti tumor-supresorových genů musí nastat mutace v obou alelách daného genu. Tím se odlišují od aktivace protoonkogenů a říkáme jim mutace recesivní. Mutace tumor-supresorů se mohou vyskytovat jak v somatických buňkách, tak v heterozygotním stavu v buňkách zárodečných. Inaktivaci tumor-supresorových genů popisuje tzv. Knudsonova teorie dvou zásahů z roku 1971. Podle této teorie dojde nejprve k prvnímu zásahu, což značí zdědění mutace či získání sporadické mutace v první alele. Poté musí proběhnout mutace nebo ztráta i druhé alely, tzv. ztráta heterozygotnosti, čímž dochází k inaktivaci tumor-supresorového genu a vzniku vhodného prostředí pro rozvoj nádorového bujení (Goetz et Krutilková, 2002; Snustad et Simmons, 2017).

Jako příklad tumor-supresorových genů uvedu gen TP53, který kóduje protein p53, který v buňce funguje jako transkripční faktor a je známý také pod pojmem „strážce genomu“. Má funkci detektoru poškození DNA. Zárodečná mutace v genu p53 vede k Li-Fraumeniho syndromu a je spojen se zvýšenou predispozicí ke vzniku nádorového onemocnění. Prvním objeveným a také důležitým tumor-supresorovým genem je gen Rb, jehož produkt-protein pRb je součástí každé buňky, kde reguluje její průchod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu. Mutace genu Rb je příčinou retinoblastomu, tedy zhoubného nádoru oka.



Retinoblastom může být jak dědičný, tak získaný a projevuje se často již v dětském věku (Goetz et Krutílková, 2002; Masopust et Průša, 2003; Snustad et Simmons, 2017).

## **1.2 Rozvoj a průběh kancerogeneze**

### **1.2.1 Vícestupňový proces**

Úplný rozvoj nádorového onemocnění zpravidla nenastane hned po první genetické změně, jak již bylo uvedeno výše. Je známo, že průběh vzniku novotvaru je proces vícestupňový, při kterém dochází k postupné kumulaci genetických změn. Mutace se tedy musí objevit ve více genech kontrolujících růst buňky. Tento proces vzniká v průběhu několika let. Průměrná doba rozvoje nádorového bujení se udává 5 až 10 let. Postupem času, díky nahromadění mutací, dojde k početní převaze buněk nádorových nad buňkami normálně vyskytujícími se v určité tkáni, kde dochází k tvorbě novotvaru. Ke vzniku maligního fenotypu se udává, že je zapotřebí nejméně čtyř různorodých genetických mutací. Různorodost genetických změn způsobuje problémy při správné diagnostice nádorového onemocnění a následně při volbě vhodné terapeutické léčby (Adam et al., 2011; Masopust et Průša, 2003; Snustad et Simmons, 2017).

### **1.2.2 Průběh kancerogeneze**

Průběh kancerogeneze lze rozdělit do tří stádií, a to na iniciační, promoční a stádium progresu. Počáteční iniciační stádium zahrnuje určitou genetickou mutaci. Jde o stádium, které trvá krátkou dobu, ale je nevratné. U buněk postižených mutací dochází k proliferaci a akumulaci nových dysfunkčních buněk (Goetz et Krutílková, 2002; Masopust et Průša, 2003).

Druhým stádiem je stádium promoční, ve kterém dominuje vliv promočních faktorů. Iniciovaná buňka z předchozího stádia je díky promočním faktorům pobízena k ještě usilovnějšímu a mnohonásobnému buněčnému dělení. Promočními faktory mohou být pro příklad hormony a jejich působení u karcinomu prsu nebo negativní vliv alkoholu přispívající k rozvoji karcinomu jícnu. Promoční stádium může trvat roky až desítky let jelikož záleží na intenzitě působení promočních faktorů pro následné dělení a kumulaci mutagenních buněk (Goetz et Krutílková, 2002; Masopust et Průša, 2003).

Třetím a zároveň posledním stádiem je stádium progresu. Zde dochází ke kumulaci nahromaděných genetických mutací typických pro maligní novotvary (Goetz et Krutílková, 2002; Masopust et Průša, 2003).

### 1.3 Znaky charakterizující nádory

Charakteristické znaky maligních nádorů jsou definovány jako 8 biologických schopností, kterých je buňka schopná v průběhu její maligní transformace. Mezi tyto znaky patří: soběstačnost v produkci růstových faktorů, schopnost nepodléhat apoptóze, necitlivost k signálům zastavující buněčný cyklus, neomezený replikační potenciál, posílená angiogeneze, propuknutí invazivity, vznik metastáz, změny ve funkci energetického metabolismu a necitlivost na reakce vyvolané imunitním systémem. Tyto znaky byly formulovány Douglassem Hanahanem a Robertem A. Weinbergem a to už v roce 2000, kdy popsali prvních 6 znaků, ke kterým v roce 2011 po novém bádání přidali další dva. Díky těmto 8 zásahům do fyziologické funkce buňky, dojde k poruše jejích obranných mechanismů a k následnému rozvoji nádorového bujení. Důležitý pro rozvoj charakteristických znaků je již zmíněná nestabilita genomu, ale také zánětlivé reakce podporující funkce znaků. Kvůli genomové nestabilitě dochází k akcelerovanému vzniku náhodných mutací, chromozomálních přestaveb nebo aneuploidiím, což v důsledku způsobí rozvoj dalších získaných znaků maligního nádoru. Dalším umožňujícím znakem je zánět, který je sdružený s premaligní lézí, nebo již se samotným maligním nádorem. Zánět je řízen buňkami imunitního systému a díky řadě mechanismů může podpořit růst nádoru. (Büchler et al, 2019; Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

#### 1.3.1 Soběstačnost v produkci růstových faktorů

Schopnost vytvářet a udržet proliferativní signalizaci je nejspíše nejzákladnější znak rakovinných buněk a byl definován mezi prvními charakteristickými znaky nádoru. Nepoškozená normálně fungující buňka běžně důkladně kontroluje produkci a sekreci růstových signálů, které zajišťují řádný vstup do buněčného cyklu a buněčného dělení, čímž udržují stálé vnitřní prostředí buněk. Ke správné funkci růstových signálů je zapotřebí specifických transmembránových receptorů, které naváží specifický ligand a tím spustí intracelulární signální dráhu vedoucí k sekreci buňky. Od roku 2000, kdy byl článek o typických znacích rakoviny poprvé publikován až do dnes, není stále dopodrobna známá strategie mechanismu uvolňování a předpoklady pro zdroj proliferačních signálů. Předpokládá se ale, že růstové faktory jsou prostorově a časově řízeny z jedné buňky na druhou vedlejší buňku (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

U nádorových buněk jsou známe 3 možné způsoby pro dosažení samostatnosti v tvorbě růstových faktorů a tím pádem k nadměrnému dělení. Tyto způsoby zahrnují změnu

extracelulárních růstových faktorů, transmembránových přenašečů a změnu ve funkci signálních drah uvnitř buňky. Rakovinné buňky mají schopnost tzv. „autokrinní stimulace“. Dokáží si vytvářet růstové faktory a sami na ně reagovat. Jedná se konkrétně o příklad změny na úrovni extracelulárních růstových faktorů. Příkladem deregulovaných transmembránových přenašečů je vysoká exprese receptorů s tyrozinázovou aktivitou. Rakovinná buňka se stává vysoce senzitivní na množství růstového faktoru, při kterých by v normální buňce nenastala proliferace. U pacientů s karcinomem prsu nebo žaludku dochází k upregulaci receptoru HER2/neu, nadměrná exprese receptoru EGF-R/erbB je známá u karcinomu mozku, žaludku nebo prsu. Vlivem nadměrné exprese dochází ke strukturním chybám v molekule receptoru (např.: zkrácení receptoru EGF) a může dojít k signalizaci nezávislé na ligandu (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

### **1.3.2 Necitlivost k signálům zastavující buněčný cyklus**

Ve všech fyziologicky správně fungujících buňkách je zajištěna regulace buněčného cyklu a homeostáza pomocí inhibičních signálů. Tyto signály se vyskytují buď rozpuštěné v extracelulárním prostoru, nebo navázané na povrchu sousedních buněk. Do buňky vstupují pomocí transmembránových buněčných receptorů propojenými s intracelulárními signálními drahami, což je stejný způsob jako u růstových faktorů. Antiproliferativní signály mohou inhibovat proliferaci dvěma rozdílnými ději. V prvním z nich jsou buňky donuceny opustit buněčný cyklus a stáhnout se do klidového stavu (G0 fáze). Z této fáze se buňka může dostat zpět k proliferaci, až po dozrání či reparaci chyb, které bránily v přechodu do další fáze buněčného cyklu. Druhou cestou je přinutit buňky vstoupit do tzv. postmitotického stavu (G1 fáze) a tím se vzdát jejich proliferačního potenciálu (Hanahan et Weinberg, 2000).

Průchod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu je řízen proteiny, označovanými jako cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK). Cykliny vytvářejí regulační podjednotku náležité CDK a jejich párování je velice specifické. Vzniklý komplex cyklin-CDK provádí fosforylaci cílových proteinů na serinu a treoninu. Jako příklad takových proteinů jsou jaderné laminy, protein GM 130 Golgiho aparátu, nádorový supresor pRB a transkripční faktor p53. V různých bodech buněčného cyklu vykonávají svou funkci jiné komplexy cyklin-CDK, které regulují nevratné pochody mezi fázemi. Pokud chce nádorová buňka dosáhnout nekontrolované proliferace, musí dojít k přerušení funkce hlavních komponentů, jako je například protein kontrolního bodu pRB, a tím poškodit celý systém buněčného cyklu (Büchler et al., 2019).

### 1.3.3 Schopnost nepodléhat apoptóze

Apoptóza je přísně regulovaný děj, ke kterému dochází v buněčném cyklu. Jedná se o organizované cílené usmrcení konkrétní buňky, při kterém nedojde k poškození sousedních buněk. Apoptóza může být vyvolána samotnou buňkou (intracelulárně) nebo podnětem pocházejícím zvenčí (extracelulárně), jako je například reakce cytotoxických T-lymfocytů (CD8+) na buňku nádorovou. Nejčastěji fyziologická apoptóza nastává při prenatálním vývoji, při třídění T-lymfocytů v brzlíku k eliminaci autoreaktivních T-lymfocytů a T-lymfocytů neschopných reakce s antigenem (Šípek, 2014).

Získaná rezistence k apoptóze je charakteristickým znakem snad všech typů rakoviny. K indukci apoptózy může dojít uvnitř buňky (intracelulárně) nebo signálem zvenčí (extracelulárně). Intracelulární dráha k indukci apoptózy je zahájena, pokud se vyskytuje hrozba poškození DNA či signalizační nerovnováhy vyvolané působením onkogenu. V této situaci dochází ke zvýšené expresi p53, který zajistí navázání proapoptických proteinů (Bax) na mitochondriální membránu. Bax stimuluje mitochondrie k uvolňování cytochromu C, vedoucí k následnému zániku mitochondrií. Extracelulární signální dráha je využita u nádorových buněk, nebo u paraziticky napadených buněk. Tyto buňky mají na svém povrchu vystaveny Fas-receptory, které rozpoznávají a váží se na ně Fas-ligandy přenášející signál k usmrcení. Intracelulární i extracelulární dráhy vedou k aktivaci kaspázové kaskády, která je pro obě dráhy společná a způsobuje rozpad apoptizované buňky (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

Schopnost rezistence vůči apoptóze získají nádorové buňky hned pomocí několika strategií. Nejběžnějším je způsob ztráty funkce tumor-supresorového genu TP53, který vede k ovlivnění produkce proapoptických proteinů, tím pádem nedochází ke zničení mitochondrií a následné apoptóze. Dalším způsobem, který se podílí na rezistenci nádorových buněk k apoptóze je dráha PI3 kináza-AKT/PKB přenášející antiapoptotické signály přežití. Posledním způsobem je poškození Fas-receptorů, které nereagují na Fas-ligandy a neumožní spuštění extracelulární signální dráhy (Hanahan et Weinberg, 2000).

### 1.3.4 Neomezený replikační potenciál

Pokud dojde v buňce k deregulaci její buněčné proliferace v důsledku již zmíněné rezistenci k apoptóze, necitlivosti k signálům zastavující buněčný cyklus a soběstačnosti buňky v produkci růstových faktorů, s největší pravděpodobností to vede k přeměně normální buňky na nádorovou. Některá studia však ukazují, že pouze tyto změny k transformaci

nestačí. Mnoha výzkumy byla dokázána přítomnost vlastních ochranných autonomních mechanismů, a to téměř ve všech savcích buňkách. Funkce těchto mechanismů není závislá na signálních drahách mezi buňkami. Hlavním úkolem tohoto mechanismu je omezit počet dělení buňky pomocí telomer. Telomery jsou nekódující repetitivní sekvence hexanukleotidů na konci chromozomů, které postupným zkracováním v průběhu buněčného cyklu způsobí neschopnost buňky se dále dělit. U některých buněk v lidském organizmu, jako jsou například zárodečné buňky a některé kmenové buňky, musí být schopnost neomezené replikace zachována. Tyto buňky vylučují enzym telomerázu jinak také lidskou telomerickou reverzní transkriptázu (hTERT). Součástí této telomerázy je vlastní templátová RNA, která přidává nově vzniklé telomerické sekvence a dosyntetizovává telomerické konce chromozomů. Detekce telomerázy u somatických buněk je nemožná, zatímco u nádorových buněk je tomu naopak. Okolo 90% všech nádorových onemocnění vykazuje vysokou expresi enzymu telomerázy, nebo mají schopnost prodloužovat telomery tzv. alternativním prodloužením telomer. Díky této schopnosti zařídí buňce neomezený replikační potenciál a možnost trvalé proliferace (Büchler et al., 2019; Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

### **1.3.5 Posílená angiogeneze**

Angiogeneze je proces tvorby nových krevních kapilár, který je přísně regulován především během embryogeneze. V dospělosti se tento proces vyskytuje v rámci fyziologických procesů, jako je ženský reprodukční cyklus či hojení ran. Pro všechny buňky i pro buňky nádorové je nezbytné mít cévní zásobení k probíhající látkové výměně. U nádorových buněk angiogeneze umožňuje jednodušší přístup do tělní cirkulace a tím pádem i možnost metastatického šíření (Büchler et al., 2019; Hanahan et Weinberg, 2011).

Vznikající nádor využívá k látkové výměně prostou difúzi, protože zatím nemá schopnost novotvorby cév. Tuto schopnost získávají nádorové buňky v průběhu raných až středních fázích kancerogeneze a to tak, že nastane tzv. angiogenní switch (přepnutí) a skokově se nádorová buňka stane angiogenní. Základním principem tohoto rychlého přepnutí je narušení rovnováhy mezi aktivátory a inhibitory angiogeneze a to tím, že dojde ke zvýšení hladiny aktivačních faktorů. Faktorů regulujících spuštění angiogeneze je hned celá řada, a dělíme je na aktivátory stimulující angiogenezi a na inhibitory, které angiogenezi potlačují. Příkladem nejvýznamnějších aktivátorů angiogeneze je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a angiopoetiny. Naopak velice významnými inhibitory jsou např. trombospondin-1 (TSP-1), endostatiny nebo angiostatiny.

Spouštěčem zajišťující zisk angiogenního fenotypu je stav snížené dostupnosti kyslíku (hypoxie). Hypoxie má za následek stabilizaci transkripčního faktoru HIF1 $\alpha$  (hypoxií indukovaný faktor 1 $\alpha$ ), který aktivuje expresi genů vedoucí k zajištění adaptace buňky v prostředí s nižším obsahem kyslíku (např. VEGF) (Büchler et al., 2019).

### **1.3.6 Propuknutí invazivity a následný vznik metastáz**

Metastázy jsou nádorová ložiska, vyskytující se ve tkáních a orgánech vzdálených od místa primárního nádoru. Šíření nádoru je komplexní několikastupňový proces závisící na specifických vlastnostech nádorových buněk jak v místě vzniku primárního ložiska, tak i v místě vzniku metastáz. Celý proces je úzce spjat s nádorovou angiogenezí a velikostí primárního nádoru. Tento několikastupňový proces se také označuje jako tzv. metastatická kaskáda. V prvním kroku pronikají buňky z primárního nádoru skrz stěnu krevních a lymfatických cév a putují cirkulací do doby, než naleznou vhodné místo pro vznik metastáz. Dalším krokem je extravazace, tedy vystoupení nádorových buněk z lumenu cév do tkání, kde nastane metastatická kolonizace (Büchler et al., 2019; Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

Klíčovou rolí pro vznik invazivních vlastností a schopnost migrace nádorové buňky je v první řadě snížení či ztráta adheze mezi nádorovými buňkami. K tomu dojde ztrátou E-kadherinu a procesem epiteliálně-mezenchymální tranzice (přeměna buňky epiteliální na buňku mezenchymovou). Dále je zapotřebí přerušit vazbu na extracelulární matrix. Integriny, zařizující adhezi k extracelulární matrix jako je např.  $\alpha 2\beta 1$ , jsou potlačeny a naopak exprimace integrinů podporujících migraci (např.  $\alpha v\beta 3$  u maligního melanomu), je zvýšená. Na posledním kroku k získání schopnosti invazivity a migrace se podílejí proteolytické enzymy, jako jsou matrixové metaloproteinázy (MMP) či katepsiny. Ty se podílejí na degradaci a remodelaci extracelulární matrix a vytvářejí tím cestu pro migrující buňky. Pokud dojde ke splnění všech výše zmíněných podmínek, nádorové buňky dokážou opustit primární nádor, porušit membránu a dostat se intersticiem k membráně cév (Büchler et al., 2019).

### **1.3.7 Změny ve funkci energetického metabolismu**

Dalším znakem maligní transformace je deregulace energetického metabolismu, která musí být upravena ve prospěch chronického buněčného růstu a dělení. Za fyziologických podmínek při aerobním dýchání je v buňce hlavním zdrojem energie glukóza. Ta je glykolýzou přeměněna na pyruvát a ten je dále přeměněn na acetyl-KoA. Acetyl-KoA rea-

guje v Krebsově cyklu za vzniku citrátu. Naopak při anaerobním dýchání nedochází k přeměně pyruvátu na acetyl-KoA, ale pyruvát je metabolizován enzymem laktát dehydrogenázou na laktát. Anaerobní dýchání je pro buňku energeticky nevýhodné (Büchler et al., 2019).

Kvůli zrychlené proliferaci nádorových buněk, je zapotřebí vysoký přísun živin, které musí být metabolizovány na energii, ale i na produkci makromolekul potřebných k syntéze nukleonových kyselin. Německý biochemik Otto Warburg, provedl již v roce 1920 studii, během které zjistil, že nádorové buňky metabolizují glukózu na laktát i za přísunu kyslíku. Tento jev byl popsán jako tzv. Warburgův efekt jinak řečeno anaerobní glykolýza. Díky tomuto jevu, jsou nádorové buňky schopny akcelerované proliferace. Zvýšené hladiny laktátu také vytvářejí vhodné mikroprostředí pro invazivní vlastnosti nádoru a jeho metastazování (Büchler et al., 2019; Hanahan et Weinberg, 2011).

### **1.3.8 Necitlivost na reakce vyvolané imunitním systémem**

Za fyziologických podmínek je jednou z mnoha funkcí imunitního systému rozpoznat a zničit nádorové buňky. Vzájemné působení mezi imunitním systémem a nádorem je komplexní a do jisté míry je schopno ovlivňovat vlastnosti nádorových buněk. Interakce mezi imunitním systémem a nádorem můžeme rozdělit do tří fází. První fází je tzv. eliminační fáze. Jde o proces, při kterém imunitní systém rozpoznává a likviduje nádorové buňky nebo buňky, u kterých hrozí nádorová transformace. Existuje možnost úniku nádorových buněk imunitnímu systému a ta nastane, pokud dojde ke ztrátě rozpoznávacích antigenů na povrchu nádorových buněk, nebo zahájením nádorem indukované imunosuprese. Pokud některé buňky imunitnímu systému uniknou, přijde na řadu druhá tzv. rovnovážná fáze. Tato fáze je různě dlouhá a zajišťuje dynamickou rovnováhu, kdy imunitní systém už nedokáže zcela zlikvidovat nádor, ale zabraňuje mu v jeho zvětšování a šíření. Poslední fází je tzv. únik nádoru, který nastane při ztrátě kontroly imunitního systému nad nádorem a to způsobí jeho růst a šíření (Büchler et al., 2019).

Nejen experimentální výzkumy na zvířecích modelech dokázaly, že různé chyby ve funkci imunitního systému způsobují vyšší výskyt nádorového onemocnění. Důkazem mohou být i transplantovaní pacienti s nově vzniklými metastázemi po transplantaci, kteří získali např. orgán od pacienta, který prodělal rakovinu, a v době darování byl považován za zdravého. Vysvětlením, proč dojde u pacienta k rozvoji nádorového bujení, je snížená imunita příjemce, způsobená imunosupresivními farmaky, bránícími rejekci transplantovanému

štěpu. Zvýšené riziko nádorů, je popsáno také u pacientů se získanými i vrozenými imuno-  
deficiencemi (Büchler et al., 2019).



## 2 MELANOM

Melanom patří k nádorovému onemocnění kůže, vznikající v melanocytech, tedy v kožních buňkách produkujících pigment. Melanocyty pocházejí z neurální lišty, zodpovídají za syntézu a transport melaninu do okolních buněk, tedy hlavně do keratinocytů, se kterými jsou v úzkém kontaktu. Melanin je hnědý až černý pigment, chránící povrch kůže před UV zářením (Cichorek et al., 2013). Melanom nejčastěji vzniká v kůži, občas bývá v oku a vzácně je lokalizován ve sliznicích orgánů. Nejvíce jsou ohroženi lidé ve věku 65-69 let (Slabý et al., 2012).

Incidence melanomu v posledních letech celosvětově i v České republice narůstá převážně u mladých lidí, a to díky znalosti příznaků tohoto onemocnění obyvateli a zdravotníky a tím pádem i častějšímu zachytu onemocnění (Adam et al., 2011; Slabý et al., 2012). V České republice bylo v roce 2018 nově diagnostikováno 2625 pacientů s melanomem, což odpovídá zachytu 24,7 nových případů na 100000 obyvatel. S touto incidencí se řadí Česká republika na 15. místo v porovnání s mírou nových zachytů mezi státy Evropy. V posledních letech převažuje výskyt tohoto typu nádorového onemocnění spíše u mužů a to v poměru 1,2:1 u žen (uzis.cz, 2021).

### 2.1 Faktory ovlivňující vznik melanomu a etiopatogeneze

Faktory přispívající ke vzniku melanomu můžeme dělit dle genotypu a fenotypu člověka a poté dle působení rizikových faktorů vnějšího prostředí. Přibližně 10 % všech melanomů vzniklo zděděním mutovaného genu od jednoho z rodičů, tedy familiárním způsobem. Definici familiárního melanomu je úzce spjata s rodinou anamnézou, ve které se vyskytují minimálně dva novotvary u přímých příbuzných, nebo více jak tři příbuzní s melanomem z jedné strany rodiny. Nejznámější a nejprozkoumanější je delece části krátkého raménka na chromozomu 9 v oblasti 9p21. V těchto místech se nachází geny CDKN2A a Cdk4, které produkují proteiny p14 a p16 s regulační schopností. K maligní transformaci melanocytů přispívají i další mutace, a to především v genech TP53, PTPRD, PTEN, NRAS a BRAF (Fikrle et Pizinger, 2010; Kodet et Krajsová, 2017; Slabý et al., 2012).

K rizikovým faktorům působícím z vnějšího prostředí můžeme zařadit pouze jediný prokázaný faktor podílející se na vzniku melanomu, a to UV záření. Nejnebezpečnější je opakovaný intenzivní pobyt na slunci s následným spálením kůže u dětí do 12 let věku. Dle odstínu kůže a její reakce na sluneční světlo můžeme rozdělit populaci do šesti základních

fototypů. Zvýšeným výskytem melanomů vzniklých vlivem UV záření se vyznačuje fototypová skupina I. Zástupci této skupiny se charakterizují velmi světlou kůží s nemožností opálení, zrzavými vlasy, modrými očmi a četnými pihy po celém těle (Fikrle et Pizinger, 2010).

Důležitým faktorem pro záchyt melanomu je také počet a vzhled melanocytových névů. Přibližně 10-20 % všech melanomů vzniká z již se vyskytujících melanocytových dysplastických névů. Névy se začínají objevovat od šestého měsíce po narození a jejich počet stoupá až asi do 30 let. U pacientů s počtem melanocytových névů převyšující číslo 100 je vyšší pravděpodobnost k propuknutí melanomu. Zatímco u pacientů s atypickými melanocytovými névy stačí k rozvoji melanomu pouze více jak 5 névů (Fikrle et Pizinger, 2010; Kodet et Krajsová, 2017).

## 2.2 Klinické vyšetření melanomu

Vyšetření pacienta provádí lékař nejprve pohledem celého těla. K důkladnějšímu prozkoumání některých lézí dermatolog používá speciální lupu s osvětlením, která mu umožní 10x zvětšený obraz (dermatoskop). Dermatoskopie zvyšuje diagnostickou úspěšnost při záchytu melanomu a snižuje náročnost na provádění chirurgických excizi s následným histologickým vyšetřením. I přes prvotní jednoduché neinvazivní vyšetření nedochází u většiny melanomů k časnému záchytu převážně z důvodu pozdní návštěvy lékaře pacientem, ze strachu z diagnózy, z neznalosti a nedůslednosti lékaře (Fikrle et Pizinger, 2010; Kodet et Krajsová, 2017).

Vyšetření pomocí dermatoskopu zlepšuje zanalyzování pomocí ABCD diagnostického pravidla. Diagnostický systém ABCD je jednoduchý předepsaný postup pro odhale ní začínajícího melanomu i laickou populací. Jednotlivá písmena zkratky značí počáteční písmeno charakteristických vlastností melanomu v anglickém jazyce. A (Asymmetry = asymetrie) značí nepravidelnost pigmentové skvrny. B (Border irregularity = nepravidelnost ohraničení) říká, že okraje jsou neohraničené, neostře a nepravidelné. C (Color variegation = barevná pestrost) udává zbarvení névu, které je často hnědé až černé. Při výskytu bílé, modré, červené a šedé barvy je věnována nálezu zvýšená pozornost. D (Diameter = průměr) vyjadřuje velikost névu v průměru. Charakteristický pro melanom je průměr névu větší než 6 mm, ale mohou se vyskytovat i menší (mikromelanomy). K těmto čtyřem parametrům byl později ještě přidán další a to E (Evolution = vývoj), který udává změnu névu v čase (změna okrajů, zbarvení, tvaru, velikosti). Tento parametr je důležitý hlavně k diagnostice např.: nodulárního a amelanotického melanomu (Fikrle et Pizinger, 2010; Kodet et Krajsová, 2017).

Ve výsledku mohou být jednotlivá stádia melanomu rozdělena podle různých měřítek jako je Breslowova stupnice, Clarkeho stupnice a TNM klasifikace. TNM klasifikace značí rozsah primárního nádoru, metastáze ve spádových uzlinách a vzdálené orgánové metastatické postižení (Rastrelli et al., 2014).

## **2.3 Klinické varianty melanomu**

Kožní melanom se vyskytuje ve čtyřech základních histologických typech – povrchově se šířící melanom, nodulární melanom, lentigo maligna melanoma a akrolentiginózní melanom (Rastrelli et al., 2014).

### **2.3.1 Povrchově se šířící melanom**

Jedná se o nejčastější formu maligního melanomu, která tvoří cca 60-70 % všech záchyťů. Převážně vzniká na kůži zdravé, ale lze se také může vyvinout z dysplastického névu. Povrchově se šířící melanom je zaznamenáván převážně u pacientů středního věku, kdekoliv po celém těle. U mužů častěji v horní polovině těla, zatímco u žen v oblasti nohou. Tento nádor roste ze začátku horizontálně a to tak, že se na kůži nejprve vyvíjí nerovnoměrně zbarvené ložisko s hladkým povrchem. Další fází je vertikální růst, kdy ložisko roste do výšky, převyšující úroveň okolní kůže. Často mívá hnědou nebo černou barvu, ale může být i modrošedý a bílý což značí regresi melanomu (Fikrle et Pizinger, 2010; Třešková et al., 2014; Kružicová, 2010).

### **2.3.2 Nodulární melanom**

Je řazen jako druhý nejčastější typ maligního melanomu, tvoří přibližně 15-30 % všech melanomů. V agresivitě je řazen na první místo a charakterizuje se svou rychlou progresí, metastazováním a špatnou prognózou. Roste výhradně vertikálně a vzniká de novo. Léze je pevná, přisedlá, má symetrické okraje, jednobarevně zbarvená většinou černě, hnědě, modrošedě ale i růžovočerveně. Na povrchu je celistvá či se odlupuje a často dochází k tvorbě vředů s následným krvácením (Fikrle et Pizinger, 2010; Třešková et al., 2014; Kružicová, 2010).

### **2.3.3 Lentigo maligna melanoma**

Lentigo maligna melanoma je forma melanomu, vyskytující se převážně u starších pacientů na místech, která jsou nejčastěji vystavována působení UV složky slunečního záření (v obličeji, v oblasti krku). Vzniká maligní přeměnou prekurzorové léze lentigo maligna. Zpočátku roste horizontálně a projevuje se nevýraznou ale stále se rozšiřující hnědou

skvrnou s neohrazenými okraji. Takto může růst do šířky i desítky let. Vertikální růst vyvyšující ložisko nad povrch okolní kůže, charakterizuje změnu lentigo maligna na lentigo maligna melanoma (Fikrle et Pizinger, 2010; Třešková et al., 2014; Kružicová 2010).

#### **2.3.4 Akrolentiginózní melanom**

Akrolentiginózní melanom není úplně typický pro europoidní lidskou rasu a v České republice se vyskytuje jen asi ve 3 % případů melanomů. Tato forma je častěji diagnostikována u lidí mongoloidní a negroidní rasy. Nejčastěji je lokalizována na periférii těla, a to na ploskách nohou, dlaních a v podnehtové oblasti, kde je označována názvem subunguální melanom. Na ploskách nohou bývá často mylně zaměňována za bradavici či otlak a poté nedochází k časné diagnóze. Díky záchytu až v pozdější pokročilé fázi onemocnění se tento typ melanomu vyznačuje nejhorší prognózou (Fikrle et Pizinger, 2010; Třešková et al., 2014; Kružicová, 2010).

### **2.4 Prognóza a mortalita**

Melanom je řazen mezi jedno z nejzlobnějších nádorových onemocnění především díky tvorbě metastáz v lymfatických uzlinách a později i ve vzdálených tkáních od místa primárního novotvaru. V pokročilém stádiu je jen velice těžko léčitelný a způsobuje úmrtí v intervalu od šesti do devíti měsíců od počátku diagnózy (Slabý et al., 2012).

Pro upřesnění prognózy se užívá TNM (T=tumor, N=node, M=metastasis) klasifikace a AJCC (American Joint Committee on Cancer) stagingový systém, který přesněji rozděluje pacienty dle rizika do čtyř stádií. Rozřazení vychází ze stanovení tloušťky nádoru, ulcerace, počtu mitóz a dalších kritérií (Krajsová, 2012).

Prognóza nemocných ve stádiu I a II je příznivá. Míra desetiletého přežití od záchytu je velmi vysoká, je však ovlivněna podskupinami T1, T2, T3 a T4. Smyslem AJCC klasifikace je průkaz přítomnosti nádorových buněk v sentinelové uzlině, kde může být infiltrace ve formě mikrometastáz nebo makrometastáz. Pacienti s metastázemi v sentilové uzlině jsou řazeni do stádia III. Hlavním prediktivním faktorem přežití je počet lymfatických uzlin zasažených metastázemi. Podle počtu zasažených uzlin jsou pacienti dále kvalifikováni do skupin N1, N2 a N3. Stádium IV označuje skupinu pacientů se vzdálenými metastázemi a naznačuje velmi špatnou prognózu. Důležitým faktorem je zde hladina enzymu LDH (laktátdehydrogenáza), podle kterého se dále dělí nemocní do podkategorií. Pacienty se zvýšenou hladinou LDH mají obvyklejší prognózu s 33% ročním přežitím (Krajsová, 2012; Třešková et al., 2014).

Pouhá 4 % ze všech kožních nádorů zastupuje maligní melanom, ale i přesto způsobuje až 80 % úmrtnost z důvodu kožních malignit (Slabý et al., 2012). Jak již bylo zmíněno výše, incidence maligního melanomu narůstá každý rok až o 5 %, ale mortalita se v poměru s incidencí nezvyšuje, a to hlavně díky časným záchytům a účinné léčbě (Třešková et al., 2014).

## 2.5 Terapie a prevence

Základním léčebným postupem u melanomu je chirurgické odstranění nádoru a jeho histologické a imunohistochemické vyšetření. Při totální excizi nádorového ložiska je také rovnou odstraňován lem zdravé okolní kůže, jehož šířka se odvíjí od tloušťky nádoru od 0,5 cm do 2 cm. Kromě excize primárních nádorů je také prováděno vyšetření sentinelové uzliny. Jedná se o první spádovou uzlinu od místa s novotvarem, do které se začínají šířit metastázy lymfatickým systémem. Indikací k tomuto vyšetření je tloušťka nádoru větší než jeden milimetr či nádory s ulcerací a vysokým mitotickým indexem (Krajsová, 2012).

Po excizi primárního nádoru je u rizikových pacientů indikována adjuvantní léčba. Adjuvantní léčba slouží k likvidaci pravděpodobných mikrometastáz u pacientů s melanomem ve III. a IV. stádiu. Vlivem této léčby dochází ke zlepšení přežívání nemocných, a hlavně k prodloužení stavu bez recidivy. V adjuvantní imunoterapii se nejčastěji podává interferon alfa. Dále je sem řazena chemoterapie, radioterapie, imunoterapie cytokiny a nádorovými vakcínami (Firkle et Pizinger, 2010; Krajsová, 2012).

Maligní melanom je však řazen mezi vysoce chemi- i radio- rezistentní nádory, a proto se využívá nových terapeutických postupů, zaměřujících se cíleně na hlavní molekuly signálních drah v patogenezi melanomů, či na zesílení cytotoxické imunitní reakce mířené proti melanoblastům. Příkladem léčiv užívajících se v cílené terapii jsou inhibitory kinázy BRAF, a to dabrafenib a vemurafenib, na jehož léčbu reaguje nádor skoro u poloviny pacientů s melanomem s mutací BRAF V600E. Pro inhibici signální dráhy genu MEK se užívá trametinib, na tyrozin kinázu N cílí imatinib. V imunoterapii se užívá například monoklonální protilátka limumab namířena proti CTLA-4 antigenu na Tc-lymfocytech (Slabý et al., 2012).

Prevenici vzniku melanomu lze rozdělit na primární a sekundární. Primární prevence se zaměřuje na změnu opalovacích návyků populace, a to především snížením času stráveném na přímém slunci, užíváním kvalitních opalovacích krémů s UV filtry, popřípadě nošení

fotoprotektivního oblečení. Sekundární prevence cílí formou kampaní na povědomí o melanomech u běžné populace. To přivádí pacienty do dermatologických ambulancí včas a zvyšuje se tím počet melanomů s příznivou prognózou pro uzdravení (Fikrle et Pizinger, 2010).

### 3 MIKRORNA

Pojem mikroRNA představuje krátké nekódující úseky RNA o velikosti 19-25 nukleotidů (Ambros et al., 2003). První molekula miRNA byla objevena v roce 1993 u háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) zařazeného do kmene hlístic ve spolupráci dvou vědeckých týmů (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Bylo zjištěno, že molekuly miRNA negativně ovlivňují genovou expresi, čímž brání vzniku proteinu a také, že hrají důležitou roli v různých buněčných procesech, jako je např.: proliferace, diferenciaci a apoptóza. Později díky tomuto poznatku byla zaznamenána spojitost s převážnou většinou druhů karcinomů, a to hlavně kvůli deregulaci exprese tumor-supresorových genů a onkogenů (Baek et al., 2008; Kanaan et al., 2012).

#### 3.1 Biogeneze mikroRNA

Vznik miRNA probíhá v jádře i cytoplazmě buňky a doposud bylo u člověka objeveno přes 2500 genových sekvencí kódujících různé miRNA (Lee et al., 2002).

Existuje kanonická a nekanonická cesta biogeneze miRNA. V současné době převládá tzv. kanonický model biogeneze miRNA. V první řadě v tomto přísně regulovaném procesu dojde k transkripci DNA za pomoci enzymu RNA polymerázy II na jednovláknový několik set nukleotidů dlouhý primární transkript miRNA. Tento dlouhý primární transkript je ještě v jádře sestříhán na prekurzorovou miRNA dlouhou přibližně 70 nukleotidů. K tomuto sestřihu může dojít díky mikroprocesoru což je komplex několika proteinů skládající se z ribonukleázy Drosha a proteinu Pasha (známého také jako DGCR8), který slouží jako kofaktor ribonukleázy Drosha a je nezbytný pro správnou funkci mikroprocesoru. Poté musí dojít k transportu prekurzorové miRNA přes jadernou membránu do cytoplazmy za pomoci Ran-GTP-dependentního transportního proteinu Exportinu-5. V cytoplazmě se vyskytuje nukleáza Dicer v komplexu s proteinem TRBP, která se naváže na dvoušroubovici pre-miRNA a následně ji začne štěpit na řetězce o délce asi 22 nukleotidů. Jeden z řetězců bývá označen jako vedoucí řetězec (guide strand) a ten druhý jako doprovodný řetězec (passenger strand). Poslední fází biogeneze je rozpletení dvoušroubovice komplexem RISC (RNA-induced silencing complex). Řetězec, který je označen jako doprovodný, je z RISC uvolněn a degradován. Vedoucí řetězec zůstává součástí komplexu RICS a váže se na 3' nepřekládaný konec mRNA. Důležitou roli zde hraje komplementarita mezi miRNA a mRNA, která rozhoduje o tom, zda dojde k degradaci či inhibici translace. Pokud je komplementarita úplná

dojde k degradaci mRNA a při neúplné komplementaritě k potlačení translace (Slabý et al., 2012).

### **3.2 MikroRNA a kancerogeneze**

Během kancerogeneze dochází k poruše jednoho či více regulačních mechanismů buňky, které vedou k transformaci fyziologické buňky na buňku nádorovou, jak již bylo zmíněno v první kapitole. Jelikož se molekuly miRNA podílí na správné funkci všech základních buněčných procesů, mohou jejich rozdílné hladiny ve tkáních způsobit deregulaci vedoucí také k rozvoji onkologického onemocnění. Molekuly miRNA se mohou chovat podobně jako regulační proteiny, a proto je můžeme rozdělit na miRNA s tumor supresorovou funkcí a s funkcí onkogenní. Jako onkogenní miRNA vnímáme takové, které řídí expresi tumor supresorových genů, genů diferenciaci buňky a programovanou buněčnou smrt. Jako miRNA s tumor supresorovou funkcí označujeme takové, které inhibují expresi onkogenů. V nádorové tkáni se pak nachází nižší hladiny miRNA s tumor supresorovou funkcí, a naopak onkogenní miRNA bývají v nádorech nadměrně exprimovány (Chen, 2010; Slabý et al., 2012).

### **3.3 Cirkulující mikroRNA jako biomarkery nádoru**

Nádorový biomarker je látka produkovaná přímo nádorem nebo organismem jako odpověď na přítomnost nádoru, která by měla odrážet biologické vlastnosti a chování nádoru. Hladiny takových biomarkerů by měly sloužit k diagnostice onemocnění, predikci účinnosti léčby nebo prognóze vývoje onemocnění. Jako nádorové biomarkery se v současné době stanovují především proteiny. Vývoj nových proteinových biomarkerů je však zatížen důkladným zkoumáním proteinových struktur v biologických materiálech a post-translačními úpravami proteinu. Nízké hladiny sledovaných proteinů v plazmě a séru, mohou také komplikovat vývoj nových biomarkerů. Vlivem těchto zatížení a potřebou vhodných diagnostických specificit a senzitivit se vývoj nových biomarkerů v posledních letech zaměřuje na detekci molekul RNA, konkrétně pak malých nekódujících molekul miRNA. Využitím syntetických komplementárních oligonukleotidů, můžeme získat dostatečnou detekční specificitu a použitím PCR (polymerázové řetězcové reakce) nebo odlišné metody amplifikace DNA jsme schopni docílit zlepšení detekčního limitu. Jednodušší struktura, lehčí metody detekce a amplifikace, tkáňová specifita expresních profilů a konzervace sekvencí mezi lidmi a modelovými organismy činí extracelulární molekuly mikroRNA stát se vhodnými



neinvasivními biomarkery, které vykazují fyziopatologický proces v těle pacienta (Weber et al., 2010).

### **3.3.1 Původ cirkulujících mikroRNA**

MikroRNA mohou být uvolňovány do krevní cirkulace pasivní či aktivní sekrecí z buněk. První dráhou vedoucí k přítomnosti miRNA v krevním oběhu je dráha, při které dochází k pasivnímu uvolňování molekul miRNA z poškozených, nekrotických a apoptických buněk. Toto pasivní uvolňování nespotřebovává žádnou energii. Za normálních fyziologických podmínek není tato forma běžně uskutečnitelná, ale může k ní docházet při poškození tkání a u buněk v apoptóze. U maligního nádoru či u chronického nádorového zánětu se může uvolnit obsah nekrotických a apoptických buněk při odumírání primárního nádoru do krevní cirkulace pacienta. Podobně dochází k uvolnění miRNA u krevních destiček a monocytů z důvodu jejich krátké životnosti (Slabý et al., 2012).

Druhá dráha je označována jako aktivní sekrece miRNA probíhající ve formě buněčných mikrovezikul. Mikrovezikuly jsou váčky, které se používají při fyziologických i patologických stavech pro aktivní transport buněk. Do skupiny mikrovezikul můžeme zařadit exozomy a mikropartikuly, jejichž funkcí je zajistit mezibuněčnou komunikaci. Tento proces je na rozdíl od předchozího energeticky závislý na ATP (Slabý et al., 2012).

### **3.3.2 Výskyt cirkulujících mikroRNA**

MikroRNA jsou detekovatelné v různých tělních tekutinách, jako je plazma, sliny, mozkomíšní mok, moč, kolostrum, mateřské mléko, plodová voda, sperma, peritoneální a pleurální tekutina. Mateřské mléko, sperma a sliny obsahují vyšší hladiny odlišných miRNA než například v mozkomíšním moku, moči nebo pleurální tekutině, kde jsou hladiny o dost nižší. Zatímco v pleurální tekutině bylo detekováno zhruba 200 různých molekul miRNA, ve slinách bylo nalezeno až 450 takových molekul. (Weber et al., 2010).

### **3.3.3 Stabilita cirkulujících mikroRNA**

Výhodou využití molekul miRNA jako nádorových biomarkerů je jejich vysoká stabilita v biologických vzorcích, včetně tělních tekutin. MiRNA zůstávají stabilní i za zhoršených podmínek, za které je považována vyšší teplota, dlouhá skladovací doba nebo snížené či zvýšené pH. Při těchto podmínkách by běžně u ostatních druhů RNA došlo k degradaci. Jejich životnost se pohybuje v řádech desítek hodin až dnů. Cirkulující miRNA mohou být chráněné samotnou strukturou mikrovezikul. Extracelulární miRNA, nevyskytující se v tělních tekutinách ve formě mikrovezikul, jsou ještě před vlastním štěpením ribonukleázou

chráněny proteinem AGO2 z Argonautové rodiny proteinů, který způsobuje stabilitu miRNA. (Chen et al., 2008; Slabý et al., 2012).

### **3.4 MikroRNA u maligního melanomu**

Bylo prokázáno, že podle určitých hladin různých molekul miRNA, lze rozlišit pacienty zdravé či s melanomem, a dále pacienty s melanomem benigním či maligním. Testy založené na detekci hladin miRNA mohou také zlepšit staging nádoru, zkvalitnit určování prognózy a ulehčit výběr účinné léčby. Mnoho případů deregulace miRNA bylo zachyceno jak v samotném nádoru, tak i v krvi pacienta. Očekává se, že právě detekce hladin miRNA v krvi pacienta nahradí v budoucnu invazivní metody užívané k diagnostice nádoru (Ghafouri-Fard et al., 2021).

Deregulací hladin miRNA ve vzorcích melanomu a melanomových buněčných linií se věnovalo již několik studií, které zároveň hodnotily důsledky deregulace a následné chování buňky. Za deregulaci miRNA v průběhu melanomogeneze mohou být zodpovědné různé kombinace počtu kopií v genech kódující miRNA nebo v genech spojených s jejich funkcí, ale také nesmíme zapomenout na působení epigenetických vlivů. Příkladem, kdy vlivem epigenetických změn dojde k deregulaci miRNA, je CpG metylace promotoru miR-34a, která je považována jako hlavní mechanismus down-regulace miRNA ve zkoumaných vzorcích melanomu (Ghafouri-Fard et al., 2021).

Dalším možným mediátorem deregulace miRNA a následného rozvoje melanomu mohou být transkripční faktory, které jsou kódovány genem MITF. Tyto transkripční faktory ovlivňují cyklus melanocytů a jejich nízké koncentrace způsobují větší invazivnost melanomu a vyšší pravděpodobnost vzniku vzdálených metastáz. Na regulaci genu MITF se podílí celá řada molekul miRNA jako jsou například: miR-26a, miR-101, miR-137, miR-148, miR-182, miR-211, miR218, miR-340 nebo miR-542-3p. Bylo zjištěno a publikováno, že zvýšená hladina miR-137 svým účinkem snižuje expresi MITF a jsou spojené se špatnou prognózou pacienta. Naopak v případě zvýšených hladin molekuly miR-182 na MITF dojde ke zvýšení proliferace, migraci, invazi, inhibici buněčné apoptózy a k blokování buněčného cyklu v S fázi (Varrone et Caputo et al., 2020).

Příkladem další studie je práce, kterou vedl Shultz et al. Porovnával 10 vzorků získaných z primárního melanomu a 10 z benigních névů. V průběhu studie poznamenali 72 deregulovaných hladin miRNA. Nejzajímavější bylo zjištění, že došlo k deregulaci skoro

celé rodiny let-7 a dalších molekul miRNA, které však již byly popsány v jiných studiích v souvislosti s odlišnými nádorovými onemocněními (Slabý et al., 2012).

## 4 TEKUTÁ BIOPSIE

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí po celém světě. Jedná se o dynamický proces, kterého se účastní různé komponenty, jako jsou nádorové buňky, mesenchymální stromální buňky a buňky imunitního systému. Dodnes byla za nejpoužívanější metodu při diagnostice různých typů karcinomů pokládána tkáňová biopsie. Jedná se o metodu pro pacienta invazivní tedy zatěžující jeho organismus. Nevýhodou této metody je často problematické získání vzorku z nádorové tkáně, což představuje problém pro monitorování léčebné odpovědi a dalšího vývoje onemocnění, kdy je potřeba provádět vyšetření opakovaně. Zdá se také, že tkáňový vzorek hůře odráží heterogenitu nádoru v porovnání s komponenty tekuté biopsie (Yu et al., 2022).

Právě metoda tekuté biopsie představuje vyšetření z alternativního typu biologického vzorku, který by mohl v budoucnu nahradit tkáňový vzorek v případě, kdy ho nelze získat nebo jeho získání představuje riziko pro pacienta. Metoda tekuté biopsie umožňuje detekovat nádorové biomarkery nejčastěji z periferní krve a současné době je intenzivně zkoumána v oblasti výzkumu nádorových onemocnění. Výhodou této metody je minimálně invazivní přístup, právě z důvodu provádění analýzy z tělních tekutin, což umožňuje snadné a opakované získání biologického vzorku a tedy snadnější detekování progresu onemocnění a odpovědi na léčbu (Jin et Burnier, 2021). Koncept tekuté biopsie byl zaveden již před několika lety ve vztahu s cirkulujícími nádorovými buňkami (CTC). Později však začal využívat i jiných nádorových komponentů tekuté biopsie jako je cirkulující nádorová DNA (ctDNA), volná cirkulující RNA, extracelulární vezikuly a nádorem ovlivněné trombocyty. V současné době se oblast výzkumu zaměřuje především na detekci cirkulující nádorové DNA (ctDNA), která tvoří malou subpopulaci celkové cirkulující DNA a představuje vhodný prediktivní a prognostický nástroj nádorového onemocnění. Z tělních tekutin lze k tekuté biopsii použít kromě periferní krve také moč, sliny, mozkomíšní mok, sputum a kostní dřeň (Alix-Panabières et Pantel, 2021). O tom jakou tělní tekutinu je vhodné použít, rozhoduje typ a anatomické uložení nádoru. Sliny mohou být použity v případě rakoviny krku nebo hlavy, moč využijeme převážně u rakoviny močového měchýře a mozkomíšní mok při nádoru na mozku (Jin et Burnier, 2021).

## 4.1 Cirkulující nádorové buňky (CTC)

Cirkulující nádorové buňky jsou buňky pocházející z primárního tumoru a metastáz, které jsou uvolňovány do krevního oběhu a dalších tělních tekutin. Jejich počet v krvi je poměrně nízký, a to okolo 1 CTC na 1 milion leukocytů. Studie prokázaly, že morfologie CTC se liší v závislosti na stádiu a typu nádorového onemocnění. Je také známo šíření CTC, ve formě agregátů navázaných na fibroblasty či trombocyty, do vzdálenějších tkání po těle a tvorbě metastáz. Tyto buněčné agregáty jsou tak chráněny před oxidačními účinky stresu a imunitnímu systému. CTC v posledních letech získávají obrovský význam při detekci nádorů a začínají nahrazovat tkáňovou biopsii. Hlavními důvody k přechodu na tekutou biopsii je její nenáročný odběr vzorku a poskytování údajů o stavu nádoru v reálném čase (Lone et al., 2022).

Vzhledem k tomu, že téměř u všech onkologických pacientů jsou hadiny CTC v krvi velice nízké a tudíž obtížně detekovatelné, nebyla dodnes zavedena všeobecně uznávaná standardní metoda umožňující identifikaci a sběr CTC u nádorových onemocnění. K izolaci CTC z nádorů se nejčastěji používá metoda užívající adhezní molekulu epitelálních buněk (EpCAM). Tato molekula je využívána jako povrchový marker, který je exprimován výhradně na epitelích, nikoliv na povrchu leukocytů, může docházet k selektivnímu hromadění CTC (Eibl et Schneemann, 2021). Expres EpCAM se u různých druhů nádorových onemocnění liší. Metody detekce CTC založené na EpCAM jsou hojně používané u nádorů, které silně exprimují EpCAM, jako je například karcinom prostaty či rakovina prsu. Detekce EpCAM pozitivních CTC je možná i u dalších typů nádorů pocházejících z epitelálních buněk, kterým je kolorektální karcinom, hepatocelulární karcinom a karcinom slinivky. Tento způsob detekce má i svá omezení a tím je nemožnost použití EpCAM u nádorů, které jsou EpCAM negativní. Příkladem takového nádoru mohou být nádory neurogenního typu (Lin et al., 2021).

## 4.2 Volná cirkulující DNA (cfDNA)

Vedle CTC se oblast výzkumu nádorových biomarkerů zaměřuje i na další komponenty tekuté biopsie, a to především na detekci hladin volné cirkulující DNA (cfDNA), respektive volné nádorové DNA (ctDNA). Ukázalo se, že cfDNA slouží jako dobrý zdroj informací o specifických mutacích a genetických změnách. Jedná se o dvouřetězcový úsek DNA tvořící proteinový komplex dlouhý okolo 18 až 10 000 páru basí. Přítomnost cfDNA je úzce spjata s fyziologickou funkcí buňky, a to konkrétně s buněčnou sekrecí, apoptózou

nebo nekrotizací a lze ji najít v různých typech tělních tekutin. Později bylo zjištěno, že pacienti s nádorovým onemocněním vykazují v krvi vyšší koncentrace cfDNA než zdraví jedinci a proto představuje vhodný diagnostický nástroj nádorového onemocnění. Zatímco cirkulující nádorová DNA (ctDNA) tvoří pouze malou část celkové cirkulující DNA u onkologických pacientů a její hladiny mohou sloužit jako prediktivní nebo prognostický marker nádorového onemocnění. (Kamińska et al., 2021).

#### **4.2.1 Cirkulující nádorová DNA (ctDNA)**

Obecně se množství cirkulující nádorové DNA (ctDNA) zvyšuje s rostoucím počtem nádorových buněk. Zatímco v časných stádiích kancerogeneze může množství ctDNA tvořit pouhé 1 % celkové cfDNA, v pozdních stádiích může toto zastoupení vystoupat až na 40 %. Z toho důvodu se mohou hladiny ctDNA využívat k monitoraci odpovědi na léčbu nebo k brzké detekci relapsu. Podobně jako u CTC je koncentrace ctDNA v krvi nízká a je zapotřebí citlivé detekční analýzy. Ve většině případů se ctDNA využívá ke screeningu známých bodových mutací (Neumann et al., 2018).

## 5 METODY STANOVENÍ EXPRESNÍCH HLADIN MIRNA

Molekuly miRNA jsou velmi stabilní a snadno detekovatelné v tělních tekutinách jako je plazma, moč a sliny. Z tohoto důvodu jsou považovány za ideální prognostické biomarkery při neinvazivní diagnostice (Ramón-Núñez et al., 2017). Po extrakci miRNA z buněk nebo tkání a jejich následné izolaci, se z nich však stávají nestabilní molekuly s krátkým poločasem rozpadu (Tan et Yiap, 2009). Nejčastěji se miRNA potřebné k vyšetření získávají z plazmy. K tomuto vyšetření je zapotřebí odebrat pacientovi nesrážlivou žilní krev do zkumavky s protisrážlivými činidly, kterými jsou EDTA nebo citrát. Pro molekulárně genetická vyšetření není naopak vhodné užívat antikoagulační činidlo heparin, který způsobí inhibici DNA polymerázy (Beránek, 2016).

### 5.1 Izolace plazmy z plné krve

Prvním krokem pro získání potřebné miRNA k diagnostice je získat plazmu z plné krve, která byla odebrána pacientovi. Získaná krev v EDTA zkumavce je centrifugována ve vychlazené centrifuzě při 4°C. Zkumavky s plnou krví jsou centrifugovány po dobu 10 minut při 3000 otáčkách za minutu (RPM). Centrifugace způsobí oddělení plazmy, nacházející se jako vrchní vrstva ve zkumavce, od krevních elementů, které se usadí na dně. Po dokončení centrifugace se zkumavky opatrně vyjmou, aby nedošlo k promíslení plazmy s krevními elementy. Odstředěná plazma je přepipetována do 2ml mikrozskumavek, které jsou následně dalších 10 minut centrifugovány při 4°C, ale při rychlosti 11000 otáček za minutu. Poté se stočená plazma přepipetuje do nových mikrozskumavek. Takto získanou plazmu je možné, pro molekulárně genetickou diagnostiku, uchovávat až několik let a to při teplotě -70°C (SOP080320 Ústavu biologie LF UK v Plzni pro izolaci plazmy z plné krve, 2020).

#### 5.1.1 Izolace a purifikace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin (DNA a RNA) je jednou z nejdůležitějších metod používaných v molekulární biologii a představuje počáteční bod pro další navazující analýzy. Nukleové kyseliny je možné izolovat z kteréhokoliv biologického materiálu, a to například z nativních nebo konzervovaných tkání, buněk nebo virových částic. Obecně je k dosažení úspěšné izolace a purifikace nukleových kyselin zapotřebí čtyř důležitých kroků, kterými jsou narušení buněčné stěny, denaturace nukleoproteinových komplexů, inaktivace nukleáz například RNázy pro izolaci RNA a DNázy pro izolaci DNA a zabránění kontaminace v průběhu celého procesu. Prvním z nich je účinné narušení buňky či tkáně s výskytem nukleových kyselin. (Tan et Yiap, 2009). K narušení buněčné stěny se dají použít detergenty, jako

je například laurylsíran sodný. Po správném narušení buněčné stěny a cytoplazmatické membrány dojde ke smísení degradačních produktů s nitrobuněčnými složkami za vzniku směsi z DNA, RNA, lipidů, proteinů, sacharidů a uhlohydrátů. Po celou dobu procesu je potřeba eliminovat možnost degradace nukleových kyselin, zajištěním podobných podmínek odpovídajících fyziologickým hodnotám. V následujícím kroku je zapotřebí pomocí proteáz odstranit z buněčného lyzátu proteiny. Tento krok je pro purifikaci nukleových kyselin velice důležitý, protože navázané proteiny mohou negativně ovlivňovat účinnost následující práce s DNA či RNA (Šmarda et al., 2005).

### 5.1.2 Izolace miRNA

Dříve se k izolaci miRNA užívala extrakce směsí fenol-chloroform. Fenol a chloroform jsou látky nemísitelné s vodou, a proto po přidání do vodného roztoku lyzátu zařídí denuraci a vysrážení proteinů. Následnou centrifugací dojde k rozdělení objemu na fázové rozhraní, kdy je oddělena těžší organická část od vodné lehčí části. Při použití kyselého fenolu dojde k usazení DNA v organické části a ve vodné části zůstane RNA. Případné zbytky fenolu a chloroformu jsou zničeny po promytí etanolem. U této metody izolace však byl problém časté kontaminace a nízké výtěžnosti. Těmto problémům předchází postup, který pro izolaci miRNA využívá tzv. kolonkovou metodu. V současné době jsou nejčastěji užívanými komerčně dodávanými kity mirVana a miRNeasy, které jsou uzpůsobené k izolaci co největšího množství miRNA z tělních tekutin (Lu et Rothenberg, 2018; Šmarda et al., 2005).

Pro tuto bakalářskou práci byla použita k izolaci miRNA z plazmy kolonková metoda pomocí miRNeasy Serum/Plasma kitu dodávaného firmou QIAGEN (Qiagen, Hilden, Německo). RNA získaná použitím těchto souprav se vyznačuje vysokou čistotou a je připravena k využití pro následující citlivé analýzy. Postupy miRNeasy také eliminují riziko kontaminace solemi či fenolem, které mohou interferovat výsledky následujících analýz. Sada miRNeasy poskytuje možnost získání RNA i z malého množství plazmy nebo séra, jako je 200 mikrolitrů. Tato sada využívá lýzu vzorků na základě fenolu nebo guanidinu a k purifikaci RNA slouží křemičité membrány. Pro lýzi je zapotřebí přidat k séru nebo plazmě lyzační roztok QIAzol, který je součástí soupravy. QIAzol Lysis Reagent je roztok fenolu a guanidin-thiokyanátu sloužící k ulehčení lýzy, k inhibici RNáz a také odstraňuje téměř všechno množství DNA a proteinů z roztoku vzniklé lýzí. Po přidání chloroformu a následné centrifugaci dojde k oddělení vodné fáze od organické. Potřebná RNA se separuje do vrchní fáze, která musí být následně přenesena do nové mikroskopické zkumavky a je k ní přidán



etanol k zajištění vhodných vazebných podmínek molekul RNA. V dalším kroku je vzniklý lyzát přenesen na kolonku, kde se na membráně zachytí všechna RNA a dojde k odplavení nečistot. Zachycená velmi kvalitní RNA je dále eluována velmi malým množstvím vody bez RNáz (upraveno podle protokolu dodávaného firmou Qiagen, Hilden, Německo, 2022).

## 5.2 RT-real-time PCR

Dalším krokem v molekulárně biologické analýze miRNA je zapotřebí namnožit vyšetřovaný úsek genu. Za nenahraditelnou metodu užívanou k namnožení sledovaného úseku je považována PCR neboli polymerázová řetězcová reakce i s jejími ostatními modifikacemi, jako je například real-time PCR (Foretová et al., 2014).

### 5.2.1 PCR (polymerázová řetězcová reakce)

Pojem polymerázová řetězcová reakce byl poprvé použit před více než 30 lety v publikaci popisující novou enzymatickou amplifikaci DNA. První využití PCR, vzhledem k využití termolabilního Klenova fragmentu, bylo nepraktické. Bylo ho nutné přidávat do reakce po každé denaturaci. Zásadním poznatkem k zařazení PCR do rutinních metod bylo užití termostabilní polymerázy izolované z bakterie *Thermus aquaticus* (Kralík et Ricchi, 2017).

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) je metoda používaná k amplifikaci konkrétního úseku DNA. Princip této in vitro amplifikační metody spočívá v syntéze kopií úseku DNA, který slouží jako templát (pouze jeden řetězec DNA), za pomoci enzymu DNA-polymerázy při dodržení pravidla komplementarity bází. Vysokou teplotou dojde k denaturaci dvoušroubovice DNA, která se rozpadne na jednořetězcové vlákno, neboli templát. K průběhu reakce jsou dále zapotřebí krátké oligonukleotidy (primery) o délce 10-30 bází, které díky pravidlu komplementarity hybridizují na obou koncích vlákna DNA. K amplifikaci DNA je také nutné přidat termostabilní DNA polymerázu, která nasedá na primery a umožňuje připojení nukleotidů k řetězci. Reakční směs složenou z templátové DNA, primerů, deoxyribonukleosidtrifosfátů a DNA polymerázy se napipetuje do PCR zkumavek a vloží do termocycleru, který zajistí správné teploty pro konkrétní fáze. PCR probíhá celkem ve třech fázích:

1. Denaturace - separace dvoušroubovice DNA při vysoké teplotě (94°C – 95°C)

2. Annealing – připojení primerů podle pravidla komplementarity bází na vlákno DNA (50°C-60°C)
3. Elongace (polymerace) – nasednutí DNA polymerázy na primery a následné připojování volných nukleotidů k vláknu DNA (72°C)

Tento cyklus se opakuje přibližně 40x, za vzniku až několika milionů kopií templátové DNA (Bártová, 2011; Foretová et al., 2014).

### 5.2.2 RT-real time PCR

Real-time PCR je určitá modifikace PCR, která sleduje amplifikaci DNA v reálném čase. Amplifikace je tedy sledována v průběhu reakce a nikoli až na jejím konci. Jelikož je amplifikace DNA sledována v reálném čase na přístroji pro PCR, je real-time PCR kvantitativní metodou, a je také běžně označován jako qPCR (kvantitativní PCR) (Baria, 2021).

Tato metoda je používána za předpokladu, jestliže je vstupním materiálem RNA. Při RT-qPCR dojde v první řadě k přepsání RNA do komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptáza. Komplementární DNA se následně využije jako templát pro reakci qPCR. Kvantitativní PCR využívá reverzní transkripci v mnoha případech, hlavně v analýze genové exprese, při validaci RNA, validaci microarray, detekci patogenů, i při genetickém testování a výzkumu onemocnění. Podle počtu využitých testovacích zkumavek můžeme rozdělit RT-qPCR na jednokrokovou, či dvoukrokovou. Při jednokrokové metodě se kombinuje reverzní transkripce a PCR v jedné zkumavce a pufru. K tomuto typu metody se využívá buď enzym s reverzní transkriptázou a zároveň s polymerázovou aktivitou, nebo DNA polymeráza dohromady s reverzní transkriptázou. Dvoukroková metoda je naopak prováděna ve dvou zkumavkách s různými optimalizovanými pufrů (Biogen, 2023).

Sledovat nárůst templátových kopií v reálném čase je umožněno přidáním fluorescenční molekuly do PCR reakce. Fluorescenční molekula produkuje fluorescenční signál, který zesiluje svou intenzitu v závislosti na zvyšujícím se množství amplikonu. Pro zvýraznění reakce real-time PCR existují dva typy fluorescenčních sond. Za prvé se využívají barviva vázající DNA, jako je například SYBR Green a druhým typem jsou DNA specifické fluorescenční zhášecí sondy, kde jsou zařazeny sondy SensiFAST, sondy TaqMan a nebo molekulární majáky a sondy Scorpions. Termocyclery pro real-time PCR jsou upraveny a vybaveny fluorescenčními detektory tak, aby mohly zachytit fluorescenční signál vzniklý v průběhu amplifikace. Intenzita změřené fluorescence je úměrná množství vzniklého PCR

amplikonu. Změna fluorescenčního signálu v čase se používá k výpočtu množství amplikonu vzniklého v jednotlivých cyklech a tímto postupem je možné provádět sběr dat v reálném čase. Valná část moderních přístrojů pro real-time PCR už rovnou obsahuje analytický software umožňující vytvoření grafu, který znázorňuje počet cyklů a intenzitu fluorescence. Tímto způsobem dojde ke zjištění kvantity amplifikované DNA (Baria, 2021).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

Praktická část této bakalářské práce probíhala na Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni ve spolupráci s oddělením Plastické chirurgie Fakultní nemocnice v Plzni.

## **6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE**

### **6.1 Hlavní cíl**

Cílem práce bylo především zvládnutí metodiky izolace plazmy z plné krve a izolace RNA z plazmy pro následné kvantitativní stanovení hladin exprese vybraných molekul miRNA.

### **6.2 Dílčí cíle**

1. Izolace plazmy z plné krve odebrané 50 pacientům před a po chirurgické resekci maligního melanomu.
2. Izolace RNA ze 100 vzorků plazmy v dostatečném množství a čistotě pro následnou kvantitativní analýzu.
3. Stanovení hladin exprese vybraných molekul miRNA pomocí metody RT real-time PCR.
4. Statistické vyhodnocení získaných expresních hladin miRNA.

## 7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

Po osvojení si základních postupů v laboratoři a zvládnutí metodiky izolace plazmy z plné krve a následné izolace RNA z plazmy u celkem 50 pacientů chirurgicky léčených pro maligní melanom, byla u 22 vybraných pacientů stanovována exprese předoperačních a pooperačních hladin 23 molekul miRNA pomocí metody RT real-time PCR. Před statistickým vyhodnocením získaných hodnot byly stanoveny následující výzkumné otázky:

1. Došlo k signifikantním změnám v hladinách vybraných molekul miRNA v plazmatických předoperačních a pooperačních vzorcích?
2. Mohou být hladiny stanovených molekul miRNA ve vztahu k celkové době přežití pacientů (OS) nebo intervalu bez příznaků recidivy onemocnění (DFI)?

## 8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Do studie probíhající na Ústavu biologie LF UK v Plzni ve spolupráci s oddělením Plastické chirurgie FN v Plzni bylo zahrnuto celkem 100 pacientů chirurgicky léčených pro maligní melanom. V letech 2017 – 2022 byly od těchto pacientů sbírány vzorky plazmy získané z plné krve odebrané pacientům před a po chirurgickém odstranění maligního melanomu na oddělení Plastické chirurgie FN v Plzni. Do pilotního pokusu probíhajícího na Ústavu biologie pro kvantitativní analýzu předoperačních a pooperačních plazmatických vzorků bylo vybráno 22 pacientů (15 mužů a 7 žen) v I. až III. stádiu maligního melanomu. Věkový medián pacientek byl 67 let a u pacientů mužů byl průměrný věk 60 let. Všichni pacienti zahrnutí v této studii podepsali informovaný souhlas o poskytnutí krevních vzorků pro vědecké účely.

V praktické části této bakalářské práce bylo izolováno celkem 100 vzorků plazmy získaných z plné krve od pacientů zahrnutých v této studii.

## 9 METODIKA PRÁCE

### 9.1 Izolace plazmy z plné krve

Plná krev odebraná do EDTA zkumavek byla dodána na Ústav biologie LF UK v Plzni z oddělení Plastické chirurgie FN v Plzni, kde byla odebrána pacientům zařazených do studie. Plná krev byla dále na Ústavu biologie LF UK v Plzni zpracovávána podle předem určených postupů.

#### 9.1.1 Přístrojové vybavení

K izolaci plazmy z plné krve bylo použito toto přístrojové vybavení laboratoře:

- Centrifuga Eppendorf 5804R (od firmy Eppendorf, Německo).
- Jednokanálové pipety Eppendorf Research s nastavitelným objemem od 2  $\mu$ l do 1000  $\mu$ l (od firmy Eppendorf, Německo).

*Obrázek 1: Centrifuga Eppendorf 5804R.*



*Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.*

#### 9.1.2 Postup izolace plazmy z plné krve

1. Zapnout chlazenou centrifugu a nechat vychladit na 4°C.

2. Po nachlazení na 4°C centrifugovat EDTA zkumavky s plnou krví po dobu 10 minut při 3000 otáčkách za minutu (RPM).
3. Opatrně vyndat zkumavky z centrifugy, ve vrchní části zkumavky se nachází oddělená plazma od zbytku plné krve, který je na dně zkumavky.
4. Přepipetovat plazmu do 2 ml mikrozkuhavek.
5. Následuje centrifugace izolované plazmy po dobu 10 minut při 11000 RPM a za teploty 4°C.
6. Přepipetovat plazmu do nových řádně nadepsaných mikrozkuhavek a všechny vzorky skladovat při teplotě -70°C.

## **9.2 Izolace RNA (včetně miRNA) z plazmy**

### **9.2.1 Přístrojové vybavení**

K izolaci molekul RNA z plazmy a k měření získaných koncentrací RNA bylo použito toto přístrojové vybavení:

- Jednokanálové pipety Eppendorf Research s nastavitelným objemem od 2 µl do 1000 µl (od firmy Eppendorf, Německo).
- Vortex TX4 Digital IR Vortex Mixer (od firmy Velp Scientifica, Itálie).
- Centrifuga Fresco 21 (od firmy Thermo Fisher Scientific, USA).
- Centrifuga MiniSpin® (od firmy Eppendorf, Německo).
- Centrifuga Micro Star 17 (od firmy VWR International, USA).
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (od firmy NanoDrop Technologies, USA).
- Software NanoDrop 1000 3.7 (od firmy NanoDrop Technologies, USA).



*Obrázek 2: Jednokanálové pipety Eppendorf Research.*



*Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.*

*Obrázek 3: Centrifuga Fresco 21.*



*Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.*

Obrázek 5: Centrifuga Micro Star 17.



Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 4: Centrifuga MiniSpin®.



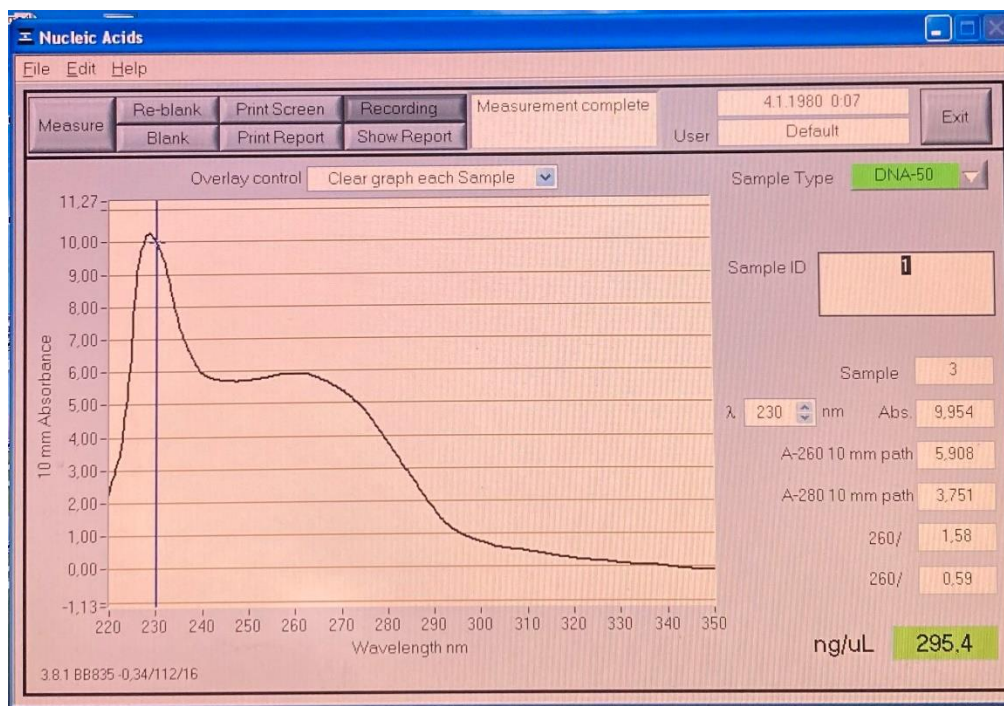
Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 7: Spektrofotometr NanoDrop ND-1000.



Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 6: Křivka koncentrace RNA v softwaru NanoDrop 1000 3.7.



Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

### 9.2.2 Postup izolace RNA z plazmy

1. Nechat při pokojové teplotě volně rozmrazit hluboce zamrazenou plazmu.
2. Zapnout a nechat nachladit centrifugu Fresco 21 na 4°C.
3. Rozmraženou plazmu řádně protřepat na vortexu a krátce ji stočit v centrifuze MiniSpin® po dobu 10 s.
4. Přepipetovat 200 µl plazmy do nové 1,5 ml mikrokumavky a přidat 5ti násobné množství QIAzol Lysis Reagent (to odpovídá 1 ml při použití 200 µl plazmy). Celou směs krátce zvortexovat.
5. Následuje 5ti minutová inkubace při pokojové teplotě.
6. Během inkubace vyndat miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control z lednice, zvortexovat a krátce stočit v MiniSpin® centrifuze.
7. Po inkubaci přidat 3,5 µl miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control.
8. Přidat chloroform ve stejném objemu jako vstupní vzorek plazmy, tedy v našem případě přidat 200 µl chloroformu.
9. Zavřít mikrokumavku a celou směs velmi prudce a důkladně protřepat – nejdříve v ruce, pak 20 s zvortexovat.
10. Nechat inkubovat 3 min při pokojové teplotě.
11. Centrifugovat 15 min při 14 000 RPM ve vychlazené centrifuze Fresco 21 na teplotu 4°C.
12. Pomocí automatické pipety přenést 650 µl z celkového objemu horní fáze do čisté 2 ml mikrokumavky, přidat 975 µl 100% ethanolu a následně řádně promíchat.
13. Odebrat cca 550 µl vzniklé směsi, přenést na kolonku umístěnou ve 2 ml mikrokumavce bez víček, centrifugovat při 10 000 RPM, po dobu 30 s, při pokojové teplotě.
14. Po centrifugaci vylít odpad ze dna, mikrokumavku osušit buničinou a znovu použít.

15. Krok 13. a 14. provést celkem 3x, dokud není celý vzorek profiltrován kolonkou.
16. Na kolonku přidat 700  $\mu$ l RWT.
17. Centrifugovat při 10 000 RPM, po dobu 30 s, při pokojové teplotě. Přefiltrovaný odpad vylít, mikrozkuhavku osušit buničinou a znovu použít.
18. Přidat na kolonku 500  $\mu$ l RPE.
19. Centrifugovat při 10 000 RPM, po dobu 30 s, při pokojové teplotě. Přefiltrovaný odpad vylít, mikrozkuhavku osušit buničinou a znovu použít.
20. Přidat 500  $\mu$ l 80% ethanolu.
21. Centrifugovat při 10 000 RPM, po dobu 2 min, při pokojové teplotě. Mikrozkuhavku s odpadem vyhodit (při manipulaci s mikrozkuhavkou dát pozor, aby nedošlo ke kontaktu membrány s odpadem na dně mikrozkuhavky).
22. Následně kolonku přemístit do nové čisté 2 ml mikrozkuhavky a sušit membránu centrifugací při maximálních otáčkách, po dobu 5 min, při pokojové teplotě.
23. Poté kolonku přemístit na 1,5 ml mikrozkuhavky s víčky a přidat 25  $\mu$ l RNase-free vody přímo na střed membrány.
24. Inkubovat cca 5 min, při pokojové teplotě.
25. Centrifugovat 75 s při maximálních otáčkách. 1,5 ml mikrozkuhavku umístit do centrifugy MicroStar 17 tak, aby otevřená víčka byla po směru točení rotoru a nedošlo k jejich odtržení.
26. Přefiltrovaný eluát znovu napipetovat na membránu a centrifugovat za stejných podmínek jako v předchozím kroku.

### **9.2.3 Postup měření koncentrace miRNA na NanoDropu**

1. Na notebooku připojeného k Nanodropu spustit na ploše program NanoDrop 1000.
2. Poprvé iniciovat přístroj pomocí 1  $\mu$ l RNase-free vody.

3. Pro měření kliknout v programu na ikonu NUCLEIC ACID a dále vybrat RNA-40.
4. Změřit BLANK použitím 1  $\mu$ l RNase-free vody nanesené na čidlo, ve výběru SAMPLE ID zvolit – BLANK.
5. Poté můžeme měřit naše vzorky - napipetovat 1  $\mu$ l vzorku na čidlo, do kolonky SAMPLE ID napsat číslo vzorku a měření spustit tlačítkem MEASURE.
6. Čidlo před nanesením dalšího vzorku vždy otřeme buničinou.
7. Uložit soubor pomocí ikon SHOW REPORT – REPORTS - SAVE REPORT - EXPORT REPORT AND STANDARTS TABLES.

### **9.3 Stanovení molekul miRNA pomocí RT real-time PCR**

#### **9.3.1 Přístrojové vybavení**

K provedení RT real-time PCR bylo použito toto přístrojové vybavení:

- Jednokanálové a multikanálové pipety Eppendorf Research s nastavitelným objemem od 2  $\mu$ l do 1000  $\mu$ l (od firmy Eppendorf, Německo).
- Vortex MS3 B S000 (od firmy IKA® Werke GmbH & Co. KG, Německo).
- Centrifuga PCR Plate Spinner (od firmy VWR International, USA).
- Termocycler T100 Thermal Cycler (od firmy Bio-Rad, USA).
- Termocycler Stratagene Mx3005P (od firmy Agilent Technologies, USA).
- Laminární box ZEPHYRUS® PCR Box Harmony (od firmy Elisabeth Pharmacon, Česká republika).

Obrázek 8: Termocycler T100 Thermal Cycler.



Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 9: Laminární box ZEPHYRUS® PCR Box Harmony.



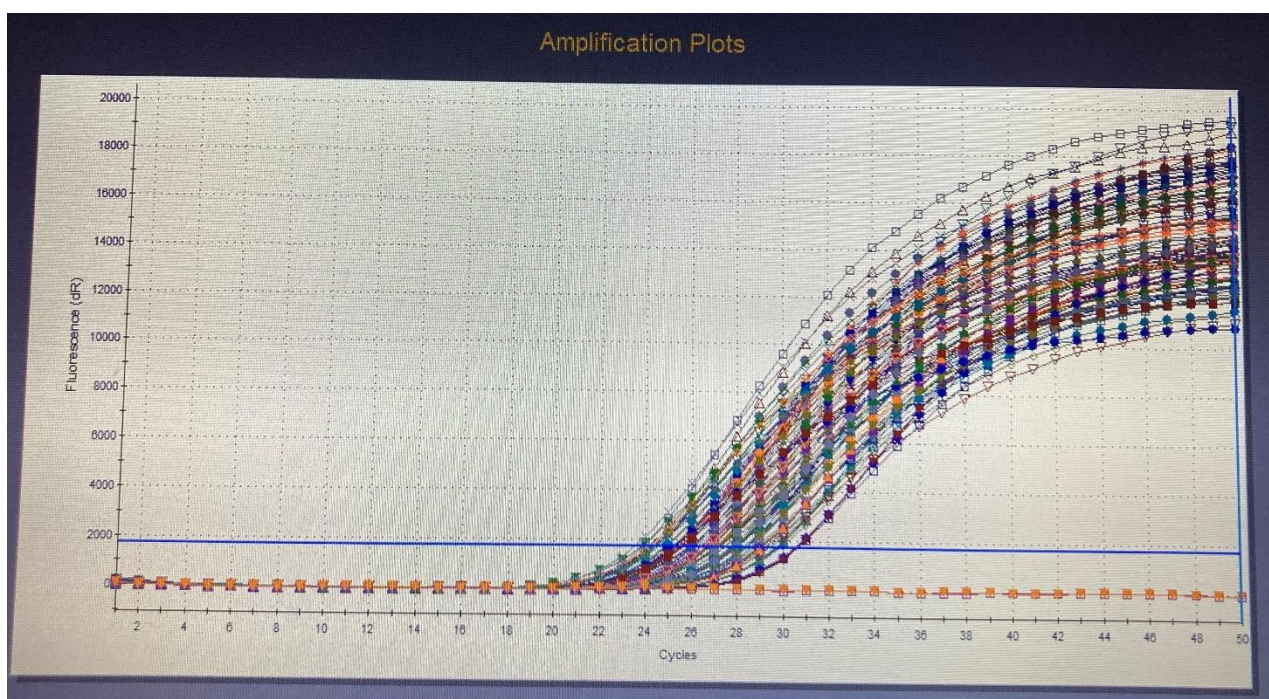
Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 10: Termocycler Stratagene Mx3005P.



Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 11: Průběh real-time PCR vybraných miRNA.



Zdroj: Vlastní, Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.



### 9.3.2 Postup reverzní transkripce při použití kitu: TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit

1. Krátce zvortexovat a stočit všechny potřebné reagenty.
2. Do 2 ml mikrozkušavky připravit Master MIX, který se pro jeden vzorek skládá z: 8,66  $\mu$ l PCR vody, 0,19  $\mu$ l RNase inhibitoru, 0,15  $\mu$ l dNTP Mixu, 1,5  $\mu$ l RT pufru a z 1  $\mu$ l MultiScribe reverzní transkriptázy.
3. Rozpipetovat získaný Master MIX do 8 jamkového stripu, který je umístěn v chladícím bločku.
4. Uložit mikrotitrační destičku s 96 jamky do chladícího bloku.
5. Pomocí multikanálové pipety napipetovat 11,5  $\mu$ l Master MIXu do každé jamky mikrotitrační destičky, podle počtu odpovídajícímu počtu vzorků.
6. Rozpipetovat primer do čistého 8 jamkového stripu.
7. Pomocí multikanálové pipety napipetovat 2,5  $\mu$ l primeru do každé jamky mikrotitrační destičky, podle počtu odpovídajícímu počtu vzorků.
8. Dále pomocí multikanálové pipety přidat 1  $\mu$ l RNA vzorku do každé jamky mikrotitrační destičky, podle počtu odpovídajícímu počtu vzorků.
9. Destičku důkladně uzavřít, zvortexovat a zkontrolovat dno jamek, kvůli vzniku nechtěných vzduchových bublin.
10. Vložit do termocycleru BioRad na program s názvem „MiRNA“.

### 9.3.3 Postup pro real-time PCR

1. Krátce zvortexovat a stočit všechny potřebné reagenty.
2. Do 2 ml mikrozkušavky připravit Master MIX, který se pro jeden vzorek skládá z: 6,5  $\mu$ l PCR vody, 10  $\mu$ l pufru TaqMan Universal Master Mix II, 1  $\mu$ l sondy + primeru TaqMan MicroRNA Assay.
3. Rozpipetovat získaný Master MIX do 8 jamkového stripu, který je umístěn v chladícím bločku.
4. Uložit mikrotitrační destičku s 96 jamky do chladícího bloku.

5. Pomocí multikanálové pipety napipetovat 17,5  $\mu$ l Master MIXu do každé jamky mikrotitrační destičky, podle počtu vzorků, kalibrátoru a negativní kontrole (vše pipetovat v doubletu).
6. Multikanálovou pipetou několikrát promíchat RT-cDNA.
7. Pomocí multikanálové pipety napipetovat 2,5  $\mu$ l RT-cDNA do každé jamky mikrotitrační destičky podle počtu vzorků v duplikátu.
8. Poté několikrát promíchat multikanálovou pipetou RT-cDNA s Master MIXEM v každé jamce.
9. Do mikrotitrační destičky přidat kalibrátor (také v duplikátu).
10. Do jamek s negativní kontrolou nepřidávat další reagenty.
11. Destičku důkladně uzavřít, zvertexovat a zkontrolovat dno jamek, kvůli vzniku nechtěných vzduchových bublin.
12. Vložit do termocycleru Stratagene a spustit průběh real-time PCR.

## 10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 10.1 Koncentrace a čistota izolovaných patientských vzorků RNA

Pro účely měření koncentrace a čistoty izolovaných vzorků RNA byl využit spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (od firmy NanoDrop Technologies, USA) a software NanoDrop 1000 3.7 (od firmy NanoDrop Technologies, USA).

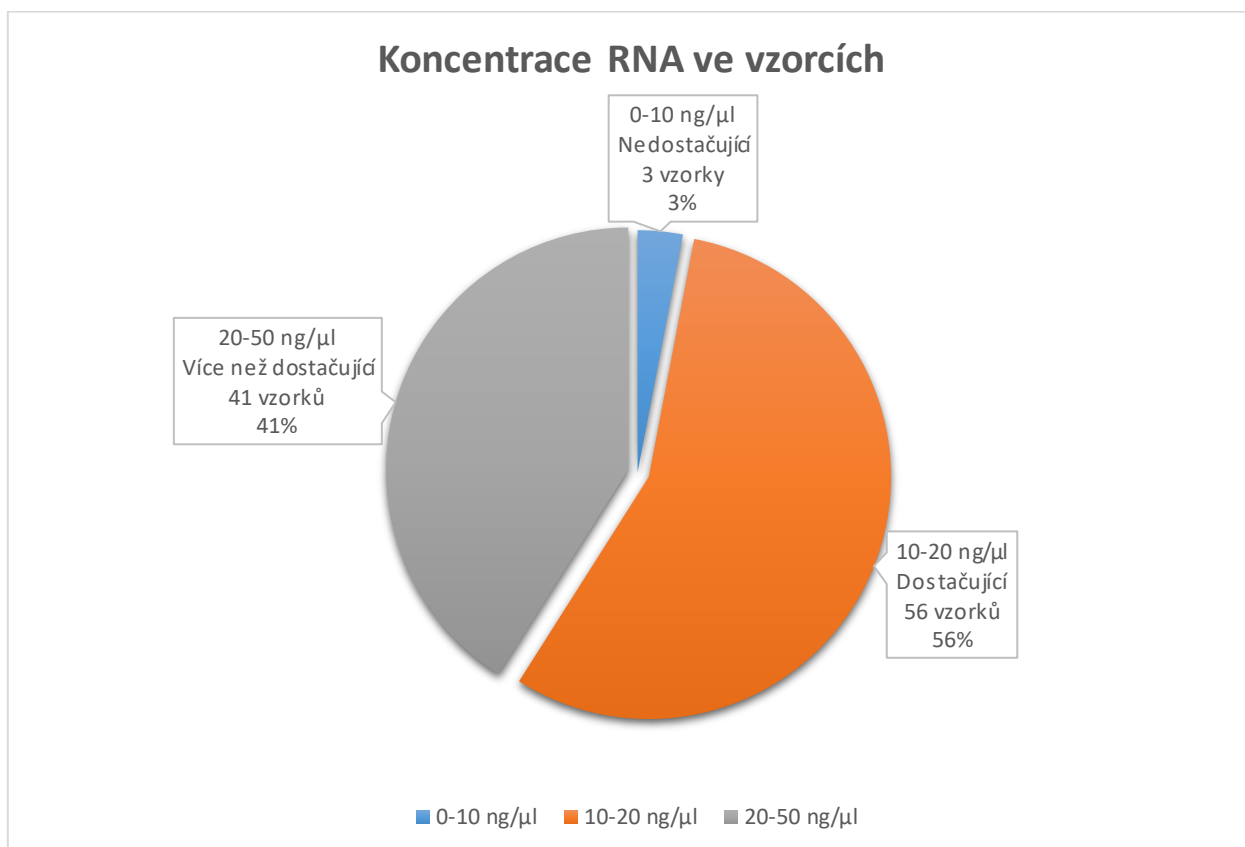
Celková tabulka s naměřenými koncentracemi a hodnotami čistoty izolovaných patientských vzorků RNA je uvedena v Příloze A.

#### 10.1.1 Vyhodnocení hodnot koncentrace izolovaných vzorků RNA

K vyhodnocení izolované koncentrace RNA všech 100 zpracovaných vzorků bylo zapotřebí rozdělit získané hodnoty do třech skupin podle koncentrace. První skupina představuje vzorky, u kterých získaná koncentrace nepřesáhla více jak 10 ng/μl. Do druhé skupiny jsou zařazeny hodnoty koncentrací 10-20 ng/μl a třetí skupina zahrnuje výsledky koncentrací 20-50 ng/μl. Vzorky patřící do první skupiny s koncentrací 0-10 ng/μl jsou pro vlastní stanovení nedostačující. Při stanovení koncentrace mnou izolovaných vzorků bylo zjištěno, že pouze 3 vzorky ze 100 mají nedostačující koncentraci RNA. Druhá skupina zahrnuje vzorky s dostatečnou koncentrací RNA a z Grafu 1 lze vyčíst, že se jedná o nejpočetnější skupinu s 56 vzorky. Třetí skupinu tvoří podle Grafu 1 41 vzorků s koncentracemi RNA více než dostačujícími.

Aby nadále mohlo dojít k analýze metodou RT real-time PCR, musí být koncentrace vyšší než 10 ng/μl. V našem případě bylo zjištěno, že těmto požadavkům vyhovuje 97 vzorků ze 100 izolovaných. Vzorky s vyhovující koncentrací pro další analýzu se nacházejí ve druhé a třetí skupině Grafu 1, tedy v oranžové a šedé výseči.

Graf 1: Koncentrace RNA v izolovaných vzorcích

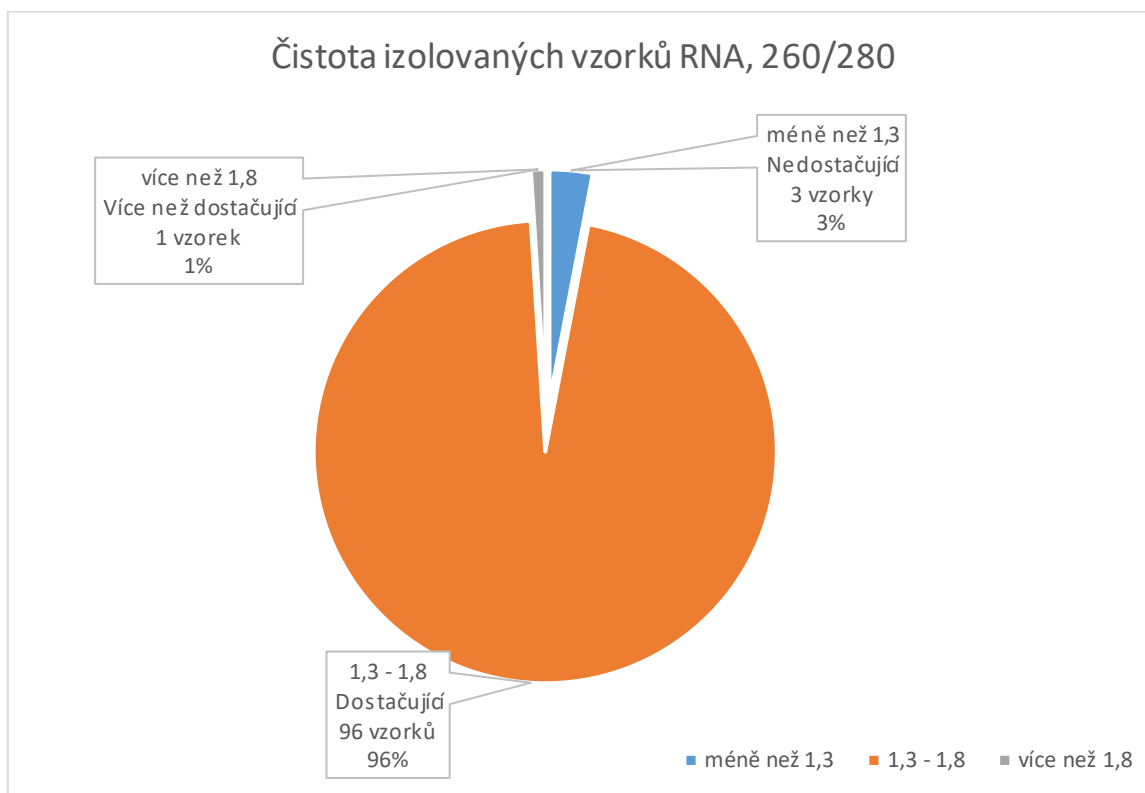


Zdroj: Vlastní, podle poskytnutých dat Ústavem biologie LF UK v Plzni, 2023

### 10.1.2 Vyhodnocení čistoty izolovaných vzorků RNA

Čistotu izolovaného vzorku RNA lze určit jako poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm. Takto vypočítané hodnoty najdeme v Tabulce 1 v Příloze A. Čistota vzorku vhodného pro použití k další analýze by měla být vyšší než 1,3; proto byly získané hodnoty čistoty vzorků rozděleny do následujících tří skupin. První skupina představuje vzorky s čistotou do 1,3; druhá skupina v rozmezí 1,3-1,8 a ve třetí skupině se nacházejí vzorky o čistotě vyšší než 1,8. Z Grafu 2 lze poznat, že do první skupiny s čistotou do 1,3 spadají 3 vzorky a ty jsou tedy nedostačující pro následnou analýzu metodou RT real-time PCR. Druhá skupina, v grafu vyznačena oranžovou barvou, představuje skupinu 96ti vzorků s dostačující čistotou. Třetí skupinou je více než dostačující čistota vzorku a patří sem pouze 1 vzorek s čistotou vyšší než 1,8. Vzorky vyskytující se v 2. a 3. skupině jsou vhodné pro následnou analýzu.

Graf 2: Čistota izolovaných vzorků RNA, 260/280



Zdroj: Vlastní, podle poskytnutých dat Ústavem biologie LF UK v Plzni, 2023

Ze všech 50 pacientů, od kterých jsem v rámci praktické části této bakalářské práce zpracovávala 100 vzorků plné krve s následnou izolací plazmy, bylo na základě jejich klinických stavů vybráno 22 pacientů, u nichž byly stanovovány expresní profily vybraných molekul miRNA. Žlutě jsou v Tabulce 1 v Příloze A označeny čísla vzorků, které byly dále zpracovávány.

## 10.2 Statistické vyhodnocení získaných expresních hladin miRNA

U 22 pacientů, na základě jejich klinických stavů, byly dále stanoveny expresní hladiny 23 miRNA vybraných na základě literatury, u kterých je předpokládán vztah k melanomům.

Statistická analýza získaných expresních hladin miRNA byla provedena pomocí SPS 22 softwaru (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Rozdíly v předoperačních a pooperačních expresních hladinách molekul miRNA byly porovnávány Wilcoxonovým testem na zvolené hladině statistické významnosti  $p \leq 0,05$ . Analýza přežití byla provedena Kaplan-Meierovou metodou.

### 10.2.1 Vyhodnocení předoperačních a pooperačních hladin miRNA

Pro normalizaci dat byla použita spike-in exogenní kontrola cel-miR-39-3p.

Nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v předoperačních a pooperačních expresních hladinách.

Důvodem nenalezení žádného signifikantního rozdílu mezi předoperačními a pooperačními hladinami miRNA může být to, že degradace miRNA probíhá zpravidla velice pomalu, což může výrazně ovlivňovat výsledky a bránit tak dosažení rozdílných hladin v před a pooperačních vzorcích.

### 10.2.2 Analýza přežití

Byl nalezen signifikantní vztah mezi předoperačními hladinami expresí 6 miRNA (miR-221, miR-320, miR-497, miR-1260, miR-1908 a miR-99a) a celkovou dobou přežití. Pacienti, kteří měli nízké hladiny expresí těchto miRNA, měli signifikantně delší dobu celkového přežití než ti, kteří měli vysoké předoperační hladiny těchto miRNA. U pooperačních hladin těchto miRNA nebyl nalezen žádný signifikantní vztah k celkové době přežití. Obrázky grafů jsou uvedeny v Příloze C.

Dále byl nalezen signifikantní vztah 5 předoperačních hladin miRNA (miR-320, miR-497, miRNA-1908, miR-4487 a miR-99a) k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění. U pacientů s nízkými hladinami expresí těchto miRNA, bylo zaznamenáno výrazně delší období bez známek onemocnění. U pooperačních hladin těchto miRNA nebyl nalezen žádný signifikantní vztah k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění. Obrázky grafů jsou uvedeny v Příloze B.

U předoperačních hladin 4 miRNA (miR-320, miR-497, miR-1908 a miR-99a) byl nalezen signifikantní vztah jak k celkovému přežití, tak k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění.

## DISKUZE

Před napsáním bakalářské práce na téma expresní profily cirkulujících miRNA jako potenciální biomarkery melanomu byly stanoveny cíle této práce. Hlavním cílem bylo především zvládnutí metodiky izolace plazmy z plné krve a následná izolace RNA z plazmy pro následné kvantitativní stanovení hladin exprese vybraných molekul miRNA. V rámci praktické části této bakalářské práce bylo tedy zpracovááno 100 vzorků plné krve od 50 pacientů léčených pro maligní melanom. Jednalo se vždy o jeden předoperační a jeden pooperační náběr od každého pacienta. Ze vzorků plné krve byla izolována plazma do 2 ml mikrozkuvek, která se následně uchovávala při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ , aby nedošlo k degradaci nukleové kyseliny. Takto izolovaná plazma se dále využívala k práci se soupravou QIAGEN miRNeasy Serum/Plazma Kit, díky které bylo možné z plazmy izolovat celkovou RNA včetně miRNA. Izolace byla prováděna v sadě vždy po deseti vzorcích a trvala celkově přes 20 hodin, které byly rozloženy do přibližně deseti dnů během 3 měsíců.

Dalším krokem bylo statistické vyhodnocení koncentrace RNA izolované z plazmy, kvůli zjištění, zda je vzorek vhodný pro následnou analýzu metodou RT real-time PCR. Po statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že největší počet vzorků (56 vzorků) byl obsažen ve skupině s koncentrací 10–20 ng/ $\mu\text{l}$  a odpovídá dostačující koncentraci pro následnou analýzu. Dalších 41 vzorků splňovalo hodnoty koncentrace 20–50 ng/ $\mu\text{l}$  a spadaly do skupiny s více než dostačující koncentrací. Zbylé 3 vzorky nedosahovaly požadované minimální koncentrace RNA potřebné pro následnou analýzu metodou RT real-time PCR.

Nedílnou součástí pro následnou analýzu metodou RT real-time PCR je také čistota izolované RNA, která by neměla být menší než 1,3. Čistota izolované RNA je vyjádřena poměrem absorbancí při 260 nm a při 280 nm a je vypočítána u každého izolovaného vzorku. Po statistickém vyhodnocení hodnot čistoty jednotlivých vzorků izolované RNA a jejich rozdělení do třech skupin bylo zjištěno, že 3 vzorky nedosahují takové čistoty, aby u nich mohla být provedena následná analýza. Tyto vzorky dosahovaly hodnot 1,21; 1,09 a 1,27. Jeden vzorek dosahoval dokonce čistoty nad horní hranici 1,8 a zbylých 96 vzorků spadalo do skupiny s hodnotou čistoty 1,3–1,8, tedy dosahovaly dostatečné čistoty pro stanovení exprese metodou RT real-time PCR.

Po statistickém vyhodnocení koncentrace a čistoty izolované RNA byla u vybraných vzorků stanovena exprese miRNA metodou RT real-time PCR. Z 50 pacientů bylo vybráno na základě jejich klinických stavů 22 pacientů pro následné stanovení exprese vybraných

molekul miRNA. Stanovovala se tedy exprese miRNA u 44 vzorků metodou RT real-time PCR. V prvním kroku metody bylo nutné provést reverzní transkripci, kdy byla izolovaná RNA přepsána do cDNA pomocí kitu TaqMan MicroRNA Reverse Transcription. Vzniklá cDNA byla dále využita v druhém kroku pro metodu real-time PCR.

Po stanovení expresních hladin vybraných 23 molekul miRNA jak u předoperačních, tak i u pooperačních vzorků 22 pacientů, bylo možné odpovědět na následující otázku: „Došlo k signifikantním změnám v hladinách vybraných molekul miRNA v plazmatických předoperačních a pooperačních vzorcích?“.

Nevedošlo. Nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v předoperačních a pooperačních expresních hladinách. Důvodem nenalezení žádného signifikantního rozdílu mezi předoperačními a pooperačními hladinami miRNA může být to, že degradace miRNA probíhá zpravidla velice pomalu, což může výrazně ovlivňovat výsledky a bránit tak dosažení rozdílných hladin v před a pooperačních vzorcích.

Druhou výzkumnou otázkou byla: „Mohou být hladiny stanovených molekul miRNA ve vztahu k celkové době přežití pacientů (OS) nebo intervalu bez příznaků recidivy onemocnění (DFI)?“.

Ano mohou a byl nalezen signifikantní vztah mezi předoperačními hladinami expresí 6 miRNA (miR-221, miR-320, miR-497, miR-1260, miR-1908 a miR-99a) a celkovou dobou přežití (OS). Pacienti, kteří měli nízké hladiny expresí těchto miRNA, měli signifikantně delší dobu celkového přežití než ti, kteří měli vysoké předoperační hladiny těchto miRNA. U pooperačních hladin expresí těchto 6 miRNA nebyl nalezen signifikantní vztah k celkové době přežití.

Dále byl nalezen signifikantní vztah 5 předoperačních hladin miRNA (miR-320, miR-497, miRNA-1908, miR-4487 a miR-99a) k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění (DFI). U pacientů s nízkými hladinami expresí těchto miRNA, bylo zaznamenáno výrazně delší období bez známek onemocnění.

U předoperačních hladin 4 miRNA (miR-320, miR-497, miR-1908 a miR-99a) byl nalezen signifikantní vztah jak k celkovému přežití, tak k intervalu bez nemoci. Z těchto výsledků je patrné, že největší výpovědní hodnotu pro stanovení prognózy, tzn. eventuální recidivy onemocnění, mají právě hladiny těchto čtyř miRNA.



Ukázalo se, že pooperační hladiny nejsou ve vztahu k celkovému přežití ani k intervalu bez nemoci na rozdíl od předoperačních hladin. Důvod tohoto pozorování zřejmě souvisí s vlastním operačním výkonem. Při odstranění nádoru může vlivem jak manipulace s vlastním nádorem, tak vlivem ovlivnění okolní tkáně, dojít k uvolnění určitých molekul miRNA, jejichž hladiny pak nejsou přímo ve vztahu k procesu karcinogeneze, ale jsou ovlivněny i destrukcí tkáně ve vztahu k operačnímu výkonu.

Znalost uvedeného je důležitá pro klinické uplatnění molekul miRNA jako případných nádorových markerů, kdy jako rozhodující se ukazují předoperační náběry. Uvedené porovnání platí pro všechny stanovené miRNA.

## ZÁVĚR

Bakalářská práce se věnovala problematice stanovení expresních profilů cirkulujících miRNA jako potenciálních biomarkerů melanomu. V teoretické části byl popsán proces charakteristický pro vznik a průběh kancerogeneze. Dále bylo popsáno nádorové onemocnění - maligní melanom, metody jeho diagnostiky, terapie a možnosti prevence. Část teoretické bakalářské práce se také věnovala molekulám miRNA a jejich spojitosti s tekutou biopsií, která představuje nadějnou alternativní minimálně invazivní metodu diagnostiky melanomu. Poslední kapitola byla věnována metodám stanovení expresních hladin miRNA metodou RT real-time PCR.

V praktické části byla izolována plazma z plné krve pacientů léčených pro melanom, následována izolací RNA z plazmy. Izolované vzorky RNA byly v dostatečné koncentraci i čistotě a tudíž mohly být použity k další analýze metodou RT real-time PCR, kdy byly stanovovány expresní profily vybraných molekul miRNA.

Po statistickém vyhodnocení byl nalezen signifikantní vztah mezi předoperačními hladinami expresí 6 miRNA k celkové době přežití a signifikantní vztah 5 molekul miRNA k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění. U předoperačních hladin 4 miRNA byl nalezen signifikantní vztah jak k celkovému přežití, tak k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění.

Výsledky expresních profilů výše uvedených molekul miRNA ukazují, že jejich předoperační hladiny mohou pomoci předpovědět další průběh onemocnění a identifikovat pacienty s vyšším rizikem recidivy, kteří představují vhodné kandidáty pro adjuvantní léčbu maligního melanomu.

## SEZNAM LITERATURY

ADAM, Zdeněk, Jana KOPTÍKOVÁ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0677-6.

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie*. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-715-8.

ALIX-PANABIÈRES, Catherine a Klaus PANTEL. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discovery* [online]. 2021, 11(4), 858-873 [cit. 2023-03-26]. ISSN 2159-8274. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1311

AMBROS, VICTOR, BONNIE BARTEL, DAVID P. BARTEL, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* [online]. 2003, 9(3), 277-279 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1355-8382. Dostupné z: doi:10.1261/rna.2183803

BAEK, Daehyun, Judit VILLÉN, Chanseok SHIN, Fernando D. CAMARGO, Steven P. GYGI a David P. BARTEL. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* [online]. 2008, 455(7209), 64-71 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature07242

Baria: Celá pravda o Real-Time PCR – 1. část. *Baria* [online]. 2022 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/rsc3191081-cela-pravda-o-real-time-pcr-1-cast>

BÁRTOVÁ, Eva. PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie, VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat* [online]. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, 2011 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)

BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7v.

BERTRAM, John S. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2000, 21(6), 167-223 [cit. 2023-03-26]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/S0098-2997(00)00007-8

BIOGEN molekulární biologie a genetika: Polymerázová řetězová reakce. *BIOGEN PRAHA s.r.o* [online]. Praha 4, 2023 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://biogen.cz/polymerazova-retezova-reakce>

BRDIČKA, Radim a William DIDDEN. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-226-8.

BÜCHLER, Tomáš. *Obecná onkologie*. Praha: Maxdorf, [2019]. Jessenius. ISBN 978-80-7345-617-7.

Český statistický úřad: Úmrtí na novotvary, Druhou nejčastější příčinu smrti. *Český statistický úřad* [online]. 2014 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: [https://www.czso.cz/csu/czso/13-7222-03--umrti\\_na\\_novotvary](https://www.czso.cz/csu/czso/13-7222-03--umrti_na_novotvary)

CHEN, TAO. The Role of MicroRNA in Chemical Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* [online]. 2010, 28(2), 89-124 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1059-0501. Dostupné z: [doi:10.1080/10590501.2010.481477](https://doi.org/10.1080/10590501.2010.481477)

CHEN, Xi, Yi BA, Lijia MA, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* [online]. 2008, 18(10), 997-1006 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1001-0602. Dostupné z: [doi:10.1038/cr.2008.282](https://doi.org/10.1038/cr.2008.282)

CICHOREK, Mirosława, Małgorzata WACHULSKA, Aneta STASIEWICZ a Agata TYMIŃSKA. Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology* [online]. 2013, 1, 30-41 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1642-395X. Dostupné z: [doi:10.5114/pdia.2013.33376](https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376)

EIBL, Robert H. a Markus SCHNEEMANN. Liquid Biopsy and Primary Brain Tumors. *Cancers* [online]. 2021, 13(21) [cit. 2023-03-26]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: [doi:10.3390/cancers13215429](https://doi.org/10.3390/cancers13215429)

Evropský den melanomu: Zhoubný melanom kůže. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. 30. 5. 2021 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=aktuality&aid=8499>

FIKRLE, Tomáš a Karel PIZINGER. Maligní melanom. *Onkologie* [online]. 2010 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: <https://www.onkologics.cz/pdfs/xon/2010/04/03.pdf>

FORETOVÁ, Lenka, Marek SVOBODA a Ondřej SLABÝ. *Molekulární genetik v onkologii*. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3236-0.

GHAFOURI-FARD, Soudeh, Mahdi GHOLIPOUR a Mohammad TAHERI. MicroRNA Signature in Melanoma: Biomarkers and Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology* [online]. 2021, 11 [cit. 2023-03-26]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2021.608987

GOETZ, Petr a Věra KRUTÍLKOVÁ. Kancerogeneze. *Zdraví.euro.cz* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2. LF a FN Motol, Ústav biologie a lékařské genetiky, 2002 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanky/kancerogeneze/>

HANAHAN, Douglas a Robert A WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 2000, 100(1), 57-70 [cit. 2023-03-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9

HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, 144(5), 646-674 [cit. 2023-03-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

HOFMANOVÁ, Jiřina. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/index.html>

JIN, Eva a Julia V. BURNIER. Liquid Biopsy in Uveal Melanoma: Are We There Yet?. *Ocular Oncology and Pathology* [online]. 2021, 7(1), 1-16 [cit. 2023-03-26]. ISSN 2296-4681. Dostupné z: doi:10.1159/000508613

KAMIŃSKA, Paula, Karolina BUSZKA, Maciej ZABEL, Michał NOWICKI, Catherine ALIX-PANABIÈRES a Joanna BUDNA-TUKAN. Liquid Biopsy in Melanoma: Significance in Diagnostics, Prediction and Treatment Monitoring. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, 22(18) [cit. 2023-03-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22189714

KANAAN, Ziad, Shesh N. RAI, M. Robert EICHENBERGER, Henry ROBERTS, Bobby KESKEY, Jianmin PAN a Susan GALANDIUK. Plasma MiR-21. *Annals of Surgery* [online]. 2012, 256(3), 544-551 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0003-4932. Dostupné z: doi:10.1097/SLA.0b013e318265bd6f

KODET, Ondřej a Ivana KRAJSOVÁ. Malignant melanoma, incidence, risk factor and early diagnosis. *Onkologie* [online]. 2017, 11(3), 138-143 [cit. 2023-03-26]. ISSN 18024475. Dostupné z: doi:10.36290/xon.2017.027

KONTOMANOLIS, EMMANUEL N., ANTONIOS KOUTRAS, ATHANASIOS SYLLAIOS, et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research* [online]. 2020, 40(11), 6009-6015 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0250-7005. Dostupné z: doi:10.21873/anticanres.14622

KRAJSOVÁ, Ivana. Kožní melanom: diagnostika, léčba a pooperační sledování. *Pro Lékáře* [online]. 2012 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2012-5/kozni-melanom-diagnostika-lecba-a-pooperačni-sledování-40185/download?hl=cs>

KRALIK, Petr a Matteo RICCHI. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 8 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00108

KRUŽICOVÁ, Zuzana. Maligní melanom. *Zdraví.euro.cz* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Na Bulovce, Dermatovenerologická klinika, 2010 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanky/maligni-melanom/>

LEE, Rosalind C., Rhonda L. FEINBAUM a Victor AMBROS. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* [online]. 1993, 75(5), 843-854 [cit. 2023-03-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y

LEE, Yoontae, Kipyong JEON a et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* [online]. 2002, 21(17), 4663-4670 [cit. 2023-03-26]. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdf476

LIN, Danfeng, Lesang SHEN, Meng LUO, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2021, 6(1) [cit. 2023-03-26]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00817-8

LONE, Saife N., Sabah NISAR, Tariq MASOODI, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer* [online].

2022, 21(1) [cit. 2023-03-26]. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-022-01543-7

LU, Thomas X. a Marc E. ROTHENBERG. MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2018, 141(4), 1202-1207 [cit. 2023-03-26]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2017.08.034

MASOPUST, Jaroslav a Richard PRŮŠA. *Patobiochemie buňky*. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, 2003. ISBN 80-239-1011-0.

Mayoclinic: Cancer. *Mayoclinic* [online]. 2022, Dec. 07, 2022 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/symptoms-causes/syc-20370588>

MiRNeasy Serum/ Plasma Handbook: miRNeasy Serum/Plasma Kit For purification of total RNA, including miRNA, from animal and human plasma and serum. *Qiagen* [online]. Hilden, Německo, April 2022 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: [file:///C:/Users/u%C5%BEivatel/Downloads/HB-1002-004\\_HB\\_miRNeasy\\_SerumPlasma\\_0422\\_WW.pdf](file:///C:/Users/u%C5%BEivatel/Downloads/HB-1002-004_HB_miRNeasy_SerumPlasma_0422_WW.pdf)

NEUMANN, Martin H.D., Sebastian BENDER, Thomas KRAHN a Thomas SCHLANGE. CtDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. 2018, 16, 190-195 [cit. 2023-03-26]. ISSN 20010370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2018.05.002

RAMÓN-NÚÑEZ, Luis A., Laura MARTOS, Álvaro FERNÁNDEZ-PARDO, Julia OTO, Pilar MEDINA, Francisco ESPAÑA, Silvia NAVARRO a David Raul Francisco CARTER. Comparison of protocols and RNA carriers for plasma miRNA isolation. Unraveling RNA carrier influence on miRNA isolation. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(10) [cit. 2023-03-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0187005

RASTRELLI, Marco, Saveria TROPEA, Cardo Riccardo ROSSI a Mauro ALAIBAC. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In vivo* [online]. 2014 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://iv.iarjournals.org/content/in-vivo/28/6/1005.full.pdf>

ŠÍPEK, Antonín. Buněčná smrt. *Genetika-Biologie* [online]. 2010 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/bunecna-smrt>

SLABÝ, Ondřej a Marek SVOBODA. *MikroRNA v onkologii*. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-587-1.

ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Přeložil Jiří DOŠKAŘ, přeložil Jiří FAJKUS, přeložil Petr HOŘÍN, přeložil Aleš KNOLL, přeložil Petr KUGLÍK, přeložil Jan ŠMARDA, přeložil Jana ŠMARDOVÁ, přeložil Renata VESELSKÁ, přeložil Boris VYSKOT. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.

SOP080320 *Ústavu biologie LF UK v Plzni pro izolaci plazmy z plné krve*. Plzeň: Ústav biologie LF UK, 2020.

TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, 2009, 1-10 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398

TOMÁŠEK, Jiří a Jitka BERKOVCOVÁ. *Onkogeny RAS – prediktivní molekulární marker u kolorektálního karcinomu* [online]. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2013 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/180/4311.pdf>

TŘEŠKOVÁ, Inka, Ondřej TOPOLČAN, Jindra WINDRICHOVÁ, et al. *Biomarkery u maligního melanomu* [online]. Plzeň: Tribun, 2014 [cit. 2023-03-26]. ISBN 978-80-263-0815-7. Dostupné z: [https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery\\_u\\_maligniho\\_melanomu\\_0.pdf](https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery_u_maligniho_melanomu_0.pdf)

VARRONE, Francesca a Emilia CAPUTO. The miRNAs Role in Melanoma and in Its Resistance to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, 21(3) [cit. 2023-03-26]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21030878

WEBER, Jessica A, David H BAXTER, Shile ZHANG, David Y HUANG, Kuo HOW HUANG, Ming JEN LEE, David J GALAS a Kai WANG. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry* [online]. 2010, 56(11), 1733-1741 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2010.147405



WIGHTMAN, Bruce, Ilho HA a Gary RUVKUN. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* [online]. 1993, 75(5), 855-862 [cit. 2023-03-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4

YU, Dan, Yixin LI, Maoye WANG, Jianmei GU, Wenrong XU, Hui CAI, Xinjian FANG a Xu ZHANG. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Molecular Cancer* [online]. 2022, 21(1) [cit. 2023-03-26]. ISSN 1476-4598. Dostupné z: doi:10.1186/s12943-022-01509-9

## SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A - Tabulka s naměřenými koncentracemi a čistotou všech zpracovaných vzorků s náběrem před i po chirurgické resekci.
- Příloha B - Obrázky grafů intervalů bez příznaků recidivy onemocnění (DFI).
- Příloha C - Obrázky grafů celkového přežití (OS).

## PŘÍLOHY

### Příloha A - Tabulka s naměřenými koncentracemi a čistotou všech zpracovaných vzorků s náběrem před i po chirurgické resekci.

Tabulka 1: Tabulka s naměřenými koncentracemi a čistotou vzorků izolované RNA před a po operaci.

číslo vzorku	ID pacienta	náběr		RNA (ng/μl)	260/280
1	325308	před		28,8	1,62
4	325308	po		13,1	1,56
5	886013	před		19,2	1,52
8	886013	po		31,3	1,65
13	415104	před		39,2	1,52
16	415104	po		33,1	1,51
21	876030	před		22,4	1,67
24	876030	po		33,7	1,58
31	340103	před		17,9	1,7
34	481004	před		17,8	1,41
37	340103	po		19,5	1,4
38	481004	po		17,6	1,5
39	350428	před		24,4	1,43
42	350428	po		19,6	1,34
48	480521	před		19,9	1,34
50	480521	po		18,9	1,38
54	505329	před		25,7	1,45
57	505329	po		10,9	1,44
59	700919	před		23,2	1,57
62	700919	po		11,6	1,49
66	445123	před		12,7	1,49
67	615630	před		11,4	1,48
72	445123	po		17,2	1,56
73	615630	po		17,1	1,73
79	820811	před		26,5	1,69
80	480404	před		12,9	1,61
85	820811	po		21,9	1,37
86	480404	po		19,5	1,37
108	700506	před		33,9	1,64
112	700506	po		13,8	1,42
146	680930	před		13,1	1,48
150	420315	před		13,2	1,6
152	680930	po		12,4	1,6
156	420315	po		11,8	1,56

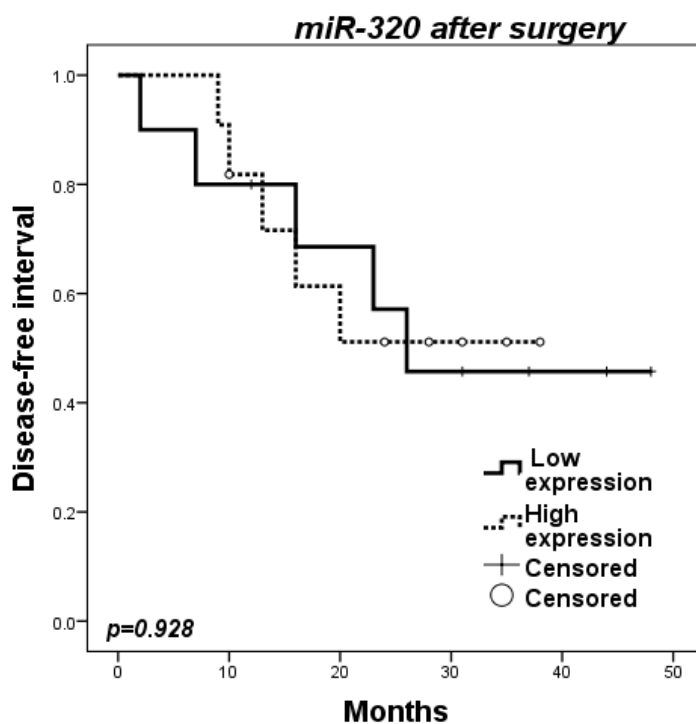
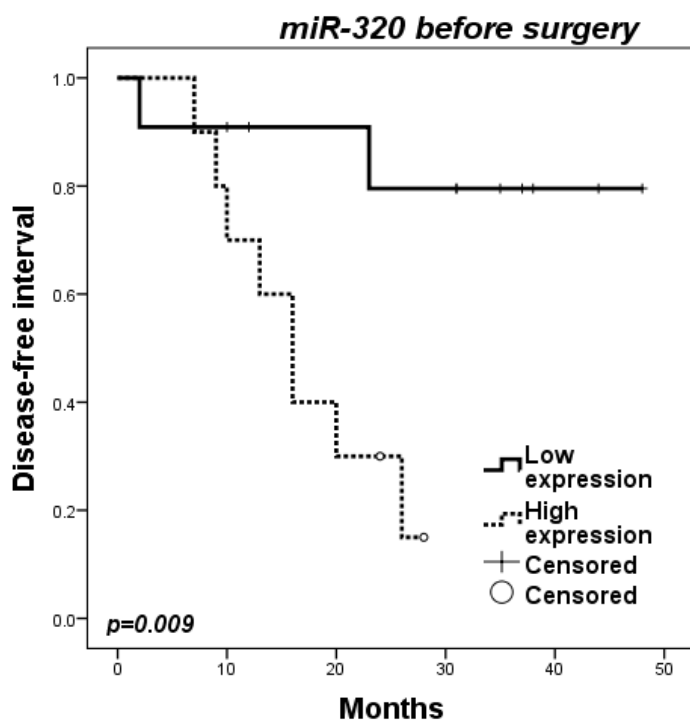
163	520424	před		34,66	1,63
168	520424	po		19,44	1,42
179	496105	před		12,5	1,37
183	496105	po		12,4	1,74
185	605924	před		12,4	1,56
191	605924	po		14,4	1,58
196	495711	před		18,3	1,46
199	495711	po		23,2	1,59
206	401109	před		21,3	1,41
209	401109	po		17,7	1,48
218	616130	před		11,9	1,52
222	616130	po		20,1	1,39
226	460121	před		22,4	1,45
227	650521	před		16,8	1,5
234	460121	po		19,3	1,54
235	650521	po		12,9	1,62
240	620310	před		13,4	1,49
243	620310	po		13,4	1,47
248	730603	před		17,37	1,48
251	730603	po		16,45	1,36
256	465725	před		16	1,45
261	785728	před		16,6	1,44
267	465725	po		12,2	1,69
269	785728	po		19	1,67
278	560927	před		10	1,34
281	560927	po		15	1,49
287	871008	před		22,6	1,57
290	871008	po		35,8	1,53
293	741217	před		14,2	1,49
299	741217	po		15,7	1,52
303	581231	před		32,9	1,37
311	581231	po		23,2	1,58
319	476204	před		18,14	1,61
321	580417	před		23,9	1,6
325	476204	po		20,92	1,47
326	580417	po		26,2	1,39
332	780803	před		12,1	2,37
334	720509	před		42,3	1,09
338	780803	po		30	1,43
339	720509	po		31,8	1,38
362	465720	před		12,5	1,48
366	465720	po		21,7	1,46
371	575215	před		14,41	1,46
374	575215	po		17,31	1,54
375	435819	před		18,48	1,36

379	435819	po		26,1	1,34
385	565717	před		40,8	1,35
388	565717	po		19,4	1,41
395	595211	před		9,9	1,35
399	595211	po		28,48	1,21
415	571005	před		23	1,6
418	571005	po		29,1	1,6
420	821202	před		10,9	1,41
424	821202	po		5,3	1,49
431	641103	před		21,61	1,4
434	641103	po		18,26	1,41
440	515630	před		24,44	1,65
443	515630	po		17,7	1,44
449	715713	před		20,8	1,48
452	530717	před		29,4	1,43
455	715713	po		25,8	1,42
456	530717	po		21,1	1,54
480	706214	před		13	1,37
483	706214	po		25,9	1,27
514	575126	před		23,7	1,55
517	575126	po		16,5	1,37

*Zdroj: Vlastní, podle poskytnutých dat Ústavem biologie LF UK v Plzni, 2023.*

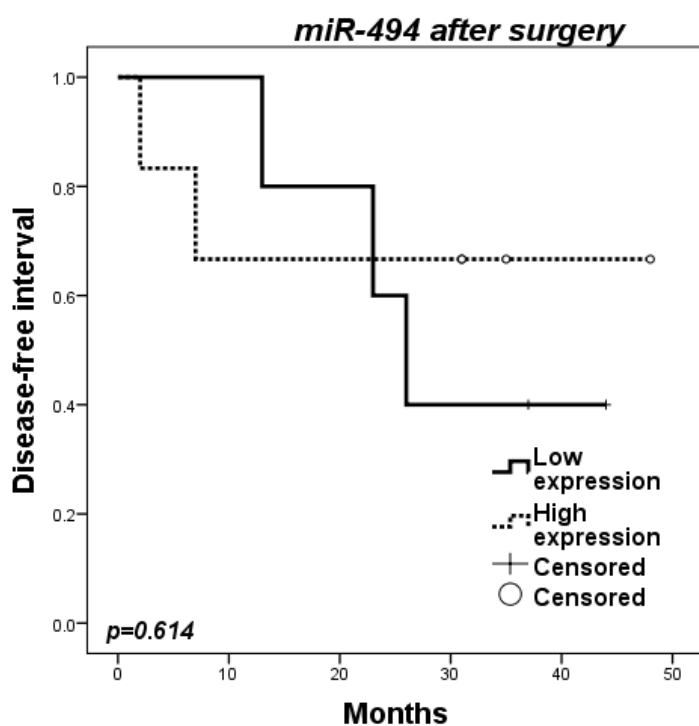
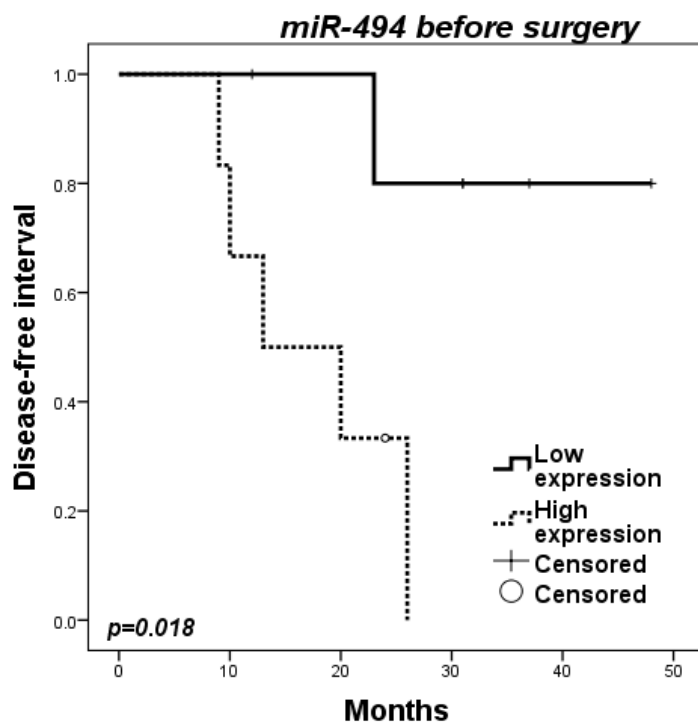
## Příloha D - Obrázky grafů intervalů bez příznaků recidivy onemocnění (DFI).

Obrázek 12: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-320 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom.



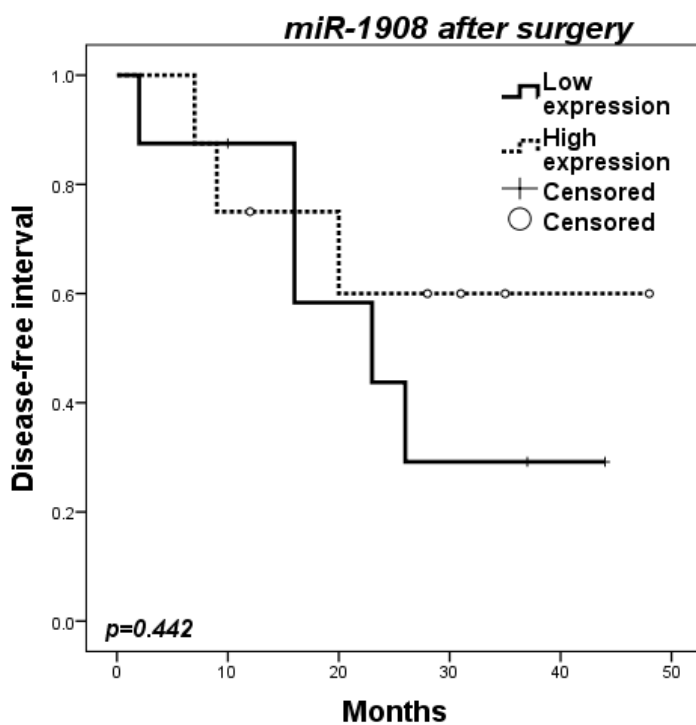
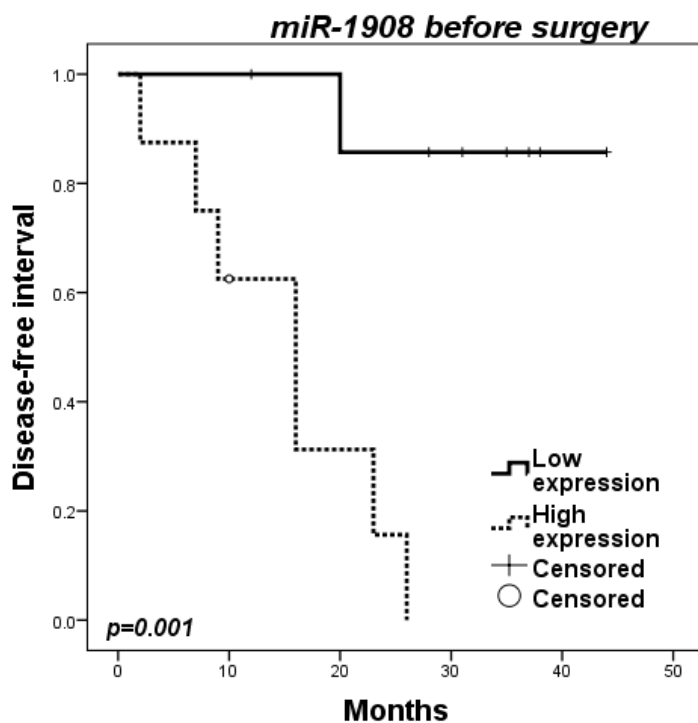
Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 13: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-494 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom.



Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

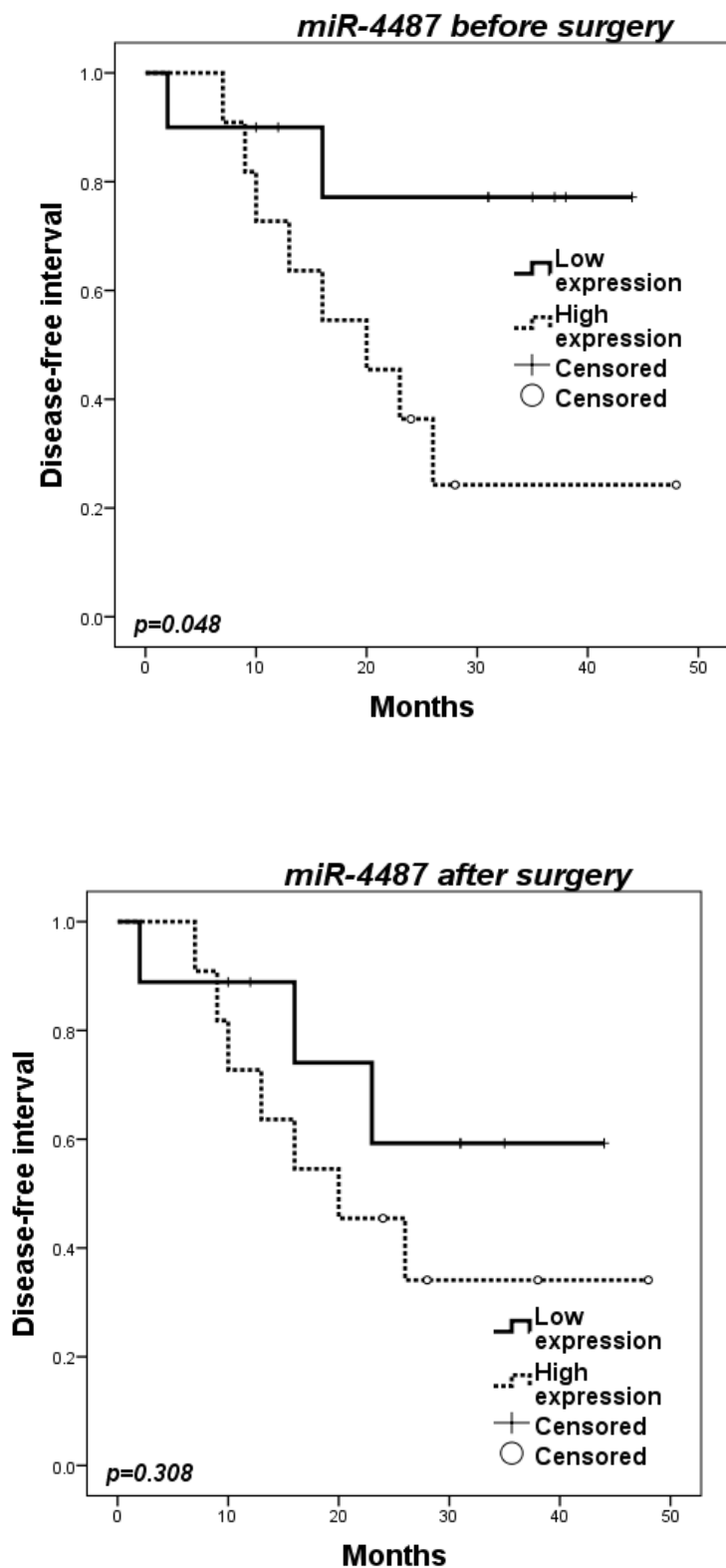
Obrázek 14: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-1908 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom.



Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

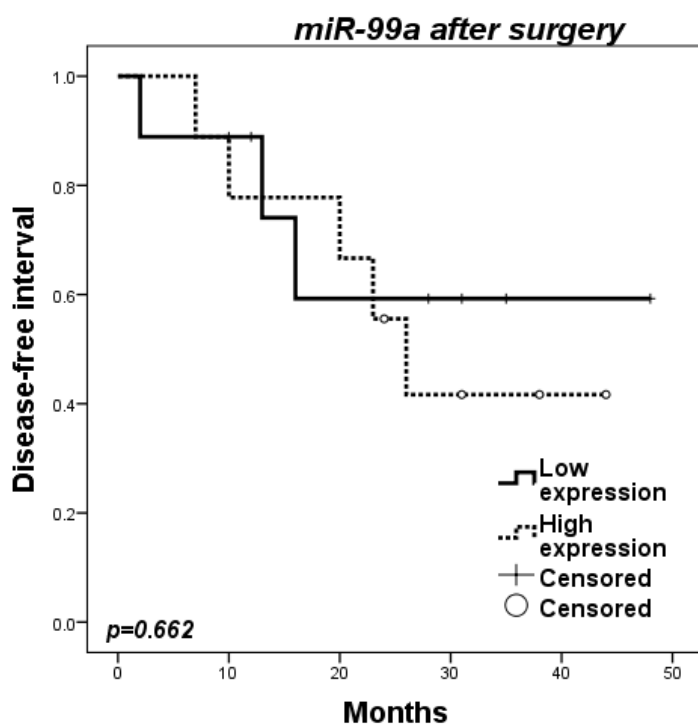
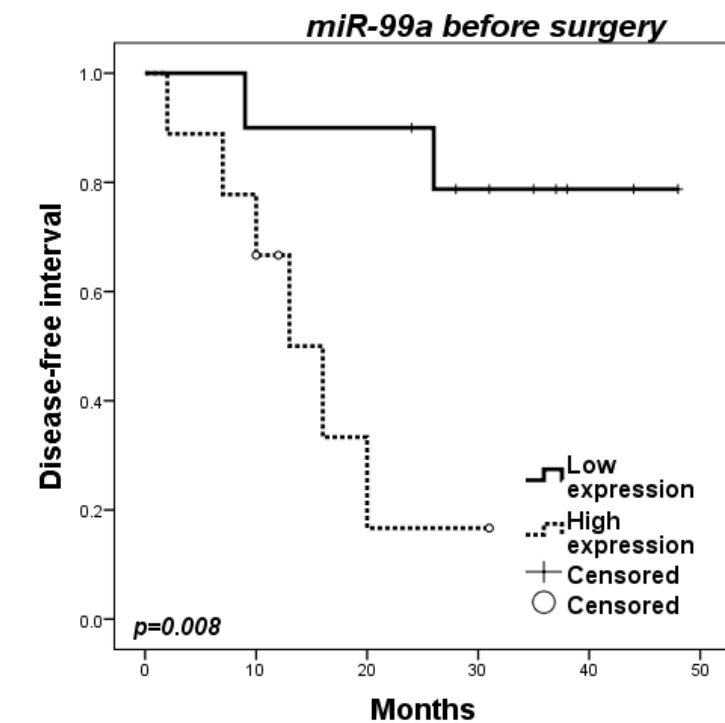


Obrázek 15: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-4487 ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom.



Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

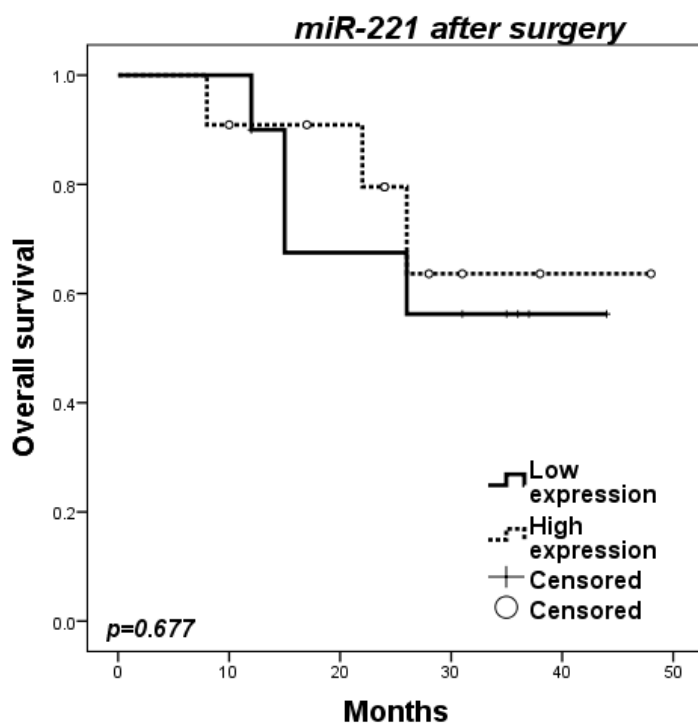
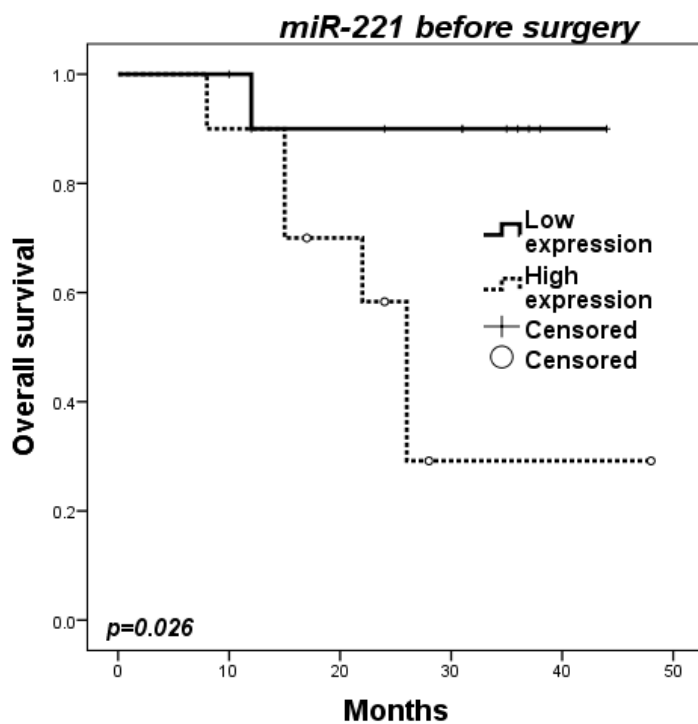
Obrázek 16: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-99a ve vztahu k intervalu bez příznaků recidivy onemocnění u pacientů léčených pro maligní melanom.



Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

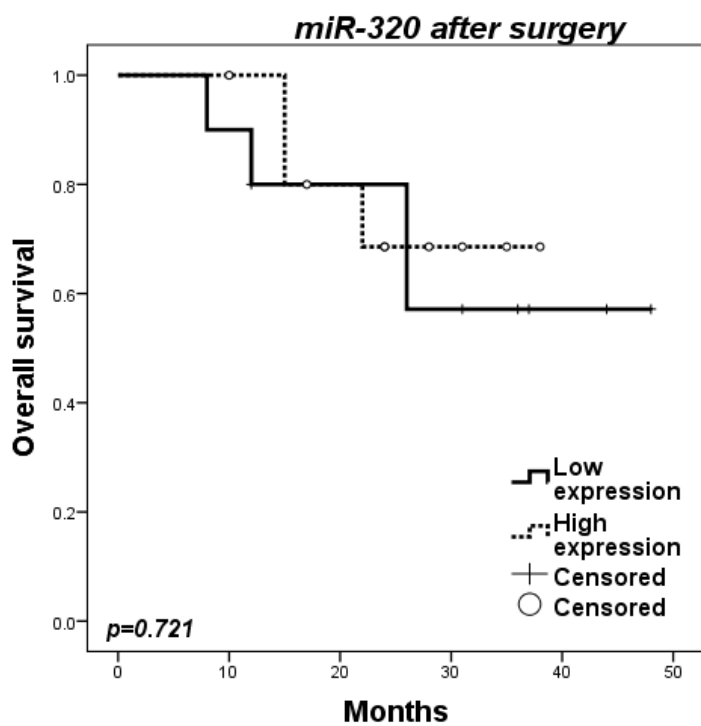
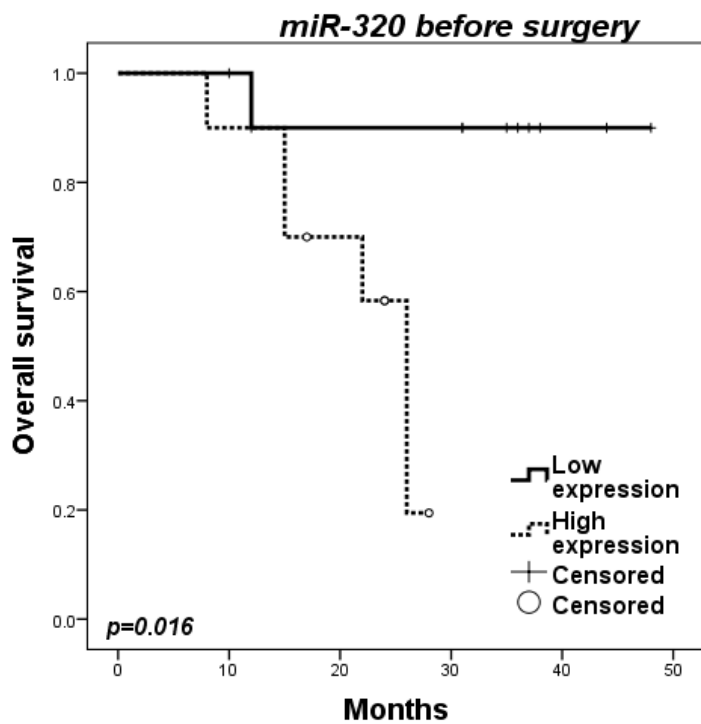
## Příloha E - Obrázky grafů celkového přežití (OS).

Obrázek 17: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-221 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom.



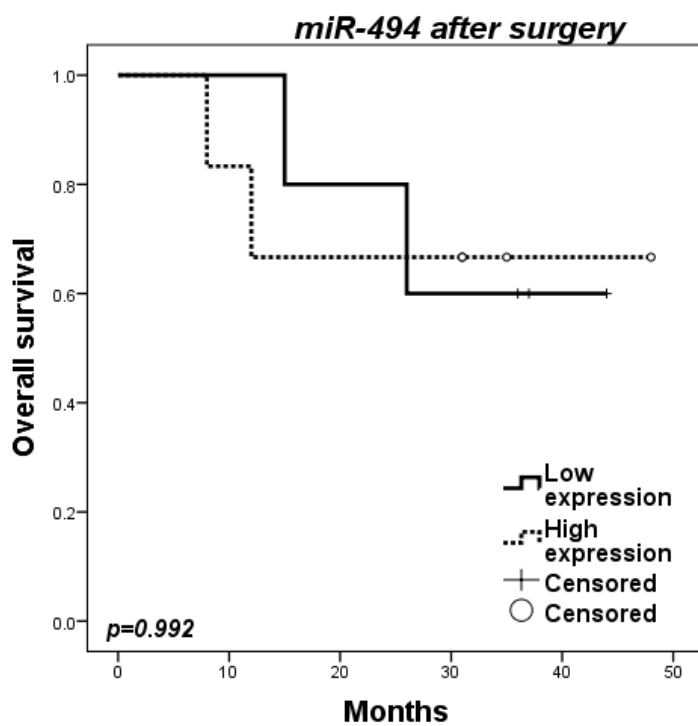
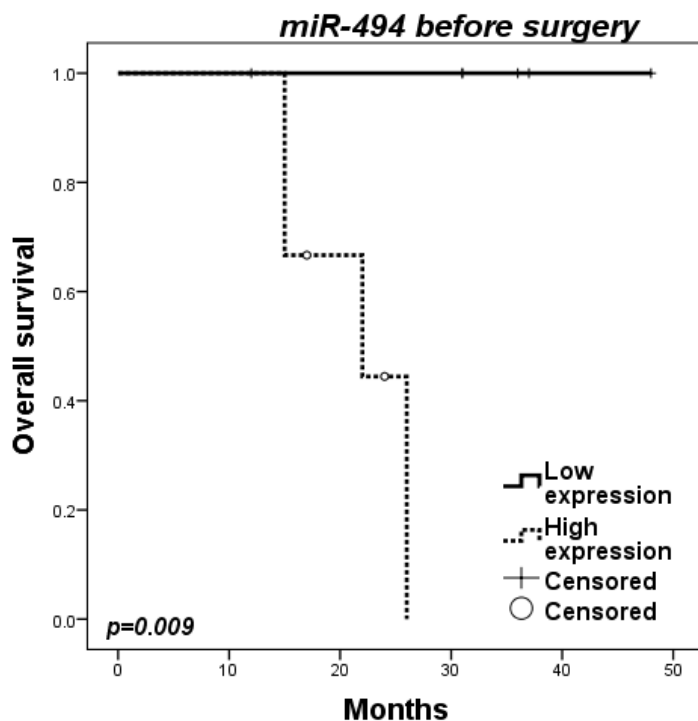
Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 18: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-320 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom.



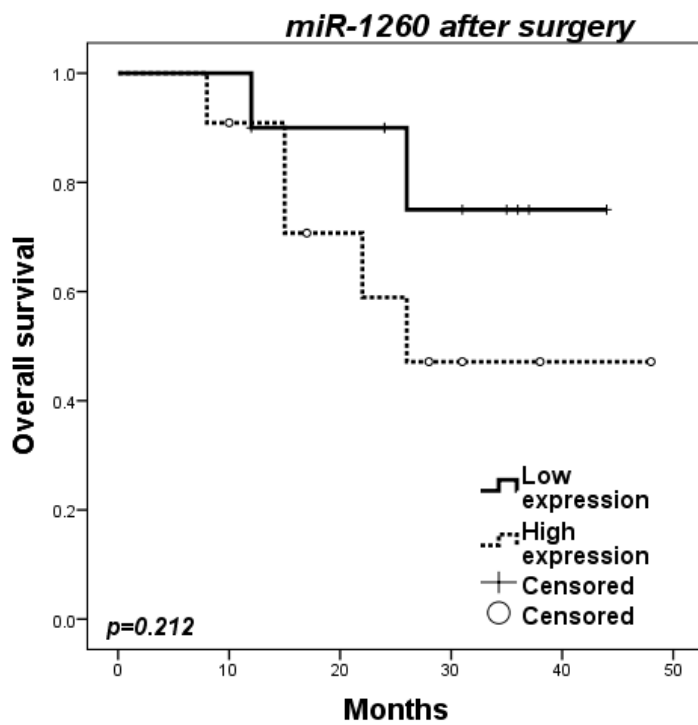
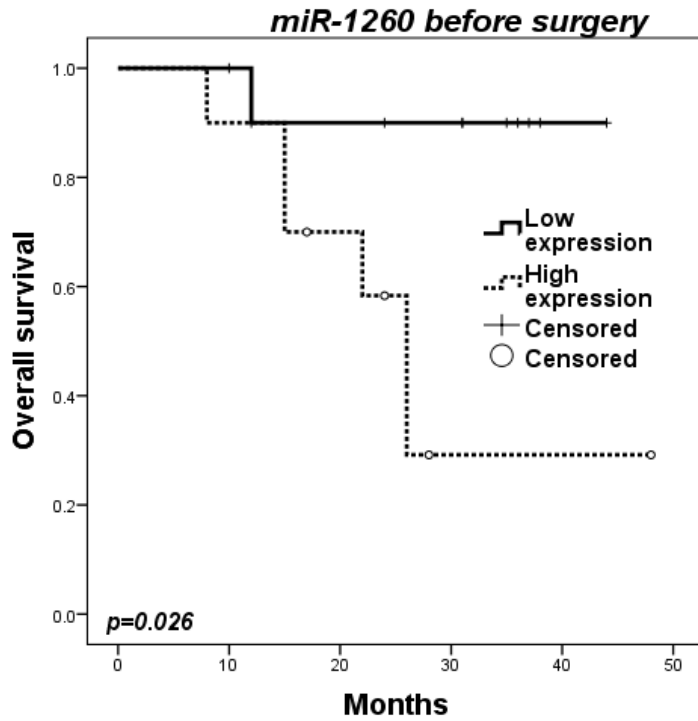
Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 19: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-494 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom.



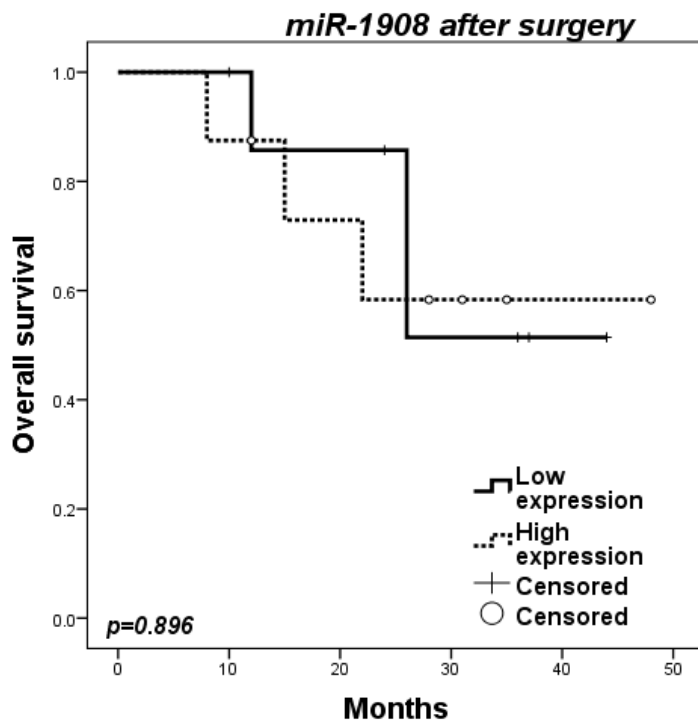
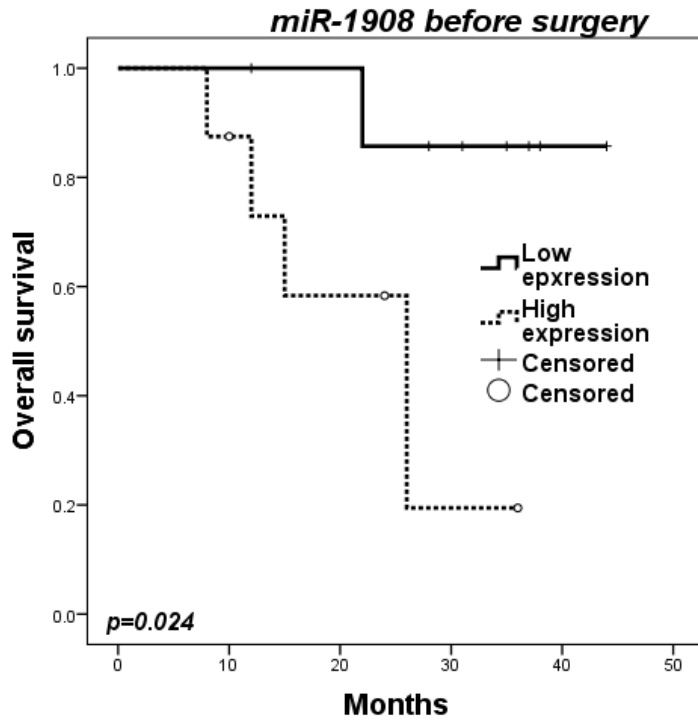
Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 20: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-1260 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom.



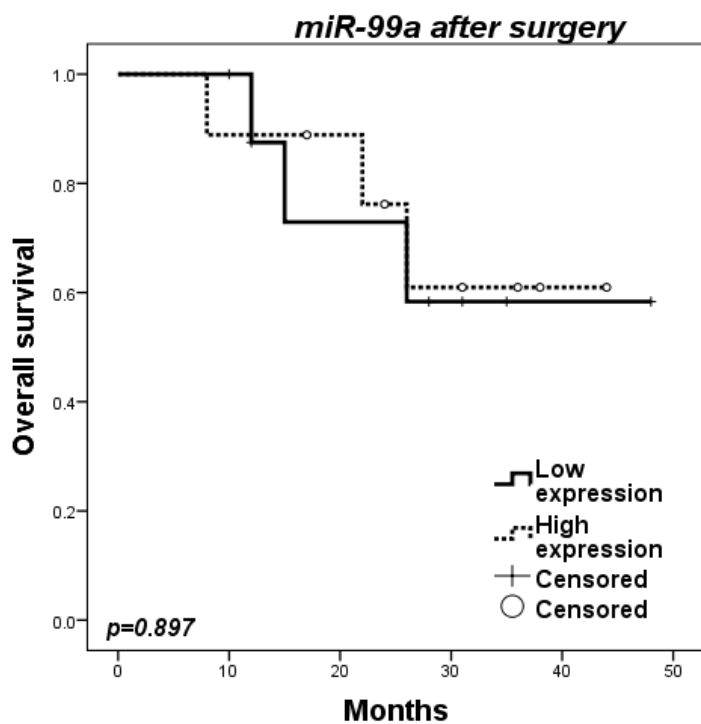
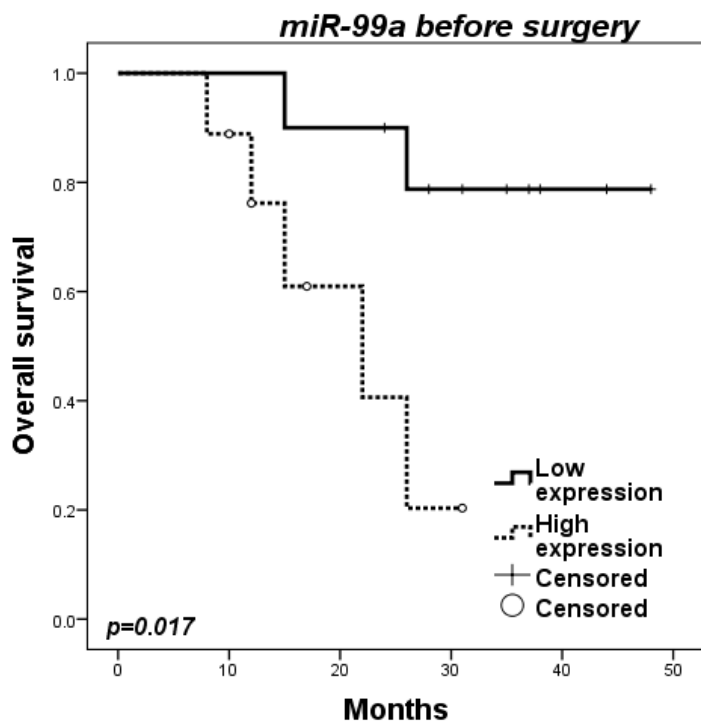
Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 21: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-1908 ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom.



Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.

Obrázek 22: Srovnání předoperačních a pooperačních expresních hladin miR-99a ve vztahu k intervalu celkového přežití u pacientů léčených pro maligní melanom.



Zdroj: Ústav biologie LF UK v Plzni, 2023.