

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
JESSENIOVA LEKÁRSKA FAKULTA V MARTINE
Ústav lekárskej biochémie

***VYBRANÉ KAPITOLY
Z PATOBIOCHÉMIE
A KLINICKEJ BIOCHÉMIE
V ONKOLÓGII***

(SKRIPTÁ)

Tatiana MATÁKOVÁ

Martin, 2016

Autor: RNDr. Tatiana Matáková, PhD.
Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Ústav lekárskej biochémie
Malá hora 11161/4D
030 01 Martin

Recenzenti: prof. Ing. Mária Mária Mareková, CSc.
doc. RNDr. Erika Halašová, PhD.

Obsah vzdelávacieho materiálu neprešiel špecializovanou terminologickou, jazykovou, gramatickou a štylistickou korektúrou. Za uvedený text zodpovedá autor.

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

ISBN: 978 – 80 – 8187 – 025 - 5

EAN: 97880818770255

1	Úvod	1
2	Metabolizmus nádorového tkaniva	2
2.1	Energetický Metabolizmus a metabolizmus sacharidov	2
2.2	Metabolizmus glutamínu	5
2.3	Zmeny pH v nádorovej bunke	6
2.4	Vplyv nádorového ochorenia na celkový metabolizmus sacharidov	6
2.5	Vplyv nádorového ochorenia na celkový metabolizmus lipidov	7
2.6	Vplyv nádorového ochorenia na celkový metabolizmus aminokyselín a proteínov	11
2.7	Regulácia bunkového metabolizmu	12
2.8	Metabolizmus periférnych tkanív pri nádorových ochoreniach	13
2.9	Rast nádoru a výživa	13
2.9.1	Nutričný stav pacienta s nádorovým ochorením a výživa	13
2.9.2	Prevenca nádorového ochorenia a výživa	14
2.10	Využitie špecifického metabolizmu nádorovej bunky v diagnostike a terapii	15
2.11	Použitá literatúra	17
3	Tumorové markery	19
3.1	Vlastnosti ideálneho tumorového markeru	19
3.2	Oblasti využitia nádorových markerov	20
3.3	Onkofetálne antigény	21
3.4	Komplexné glykokonjugáty	22
3.5	Ďalšie tumorové markery onkofetálneho charakteru	24
3.6	Onkoplacentárne antigény	25
3.7	Proliferačné tumorové markery	25
3.8	Enzýmy	26
3.9	Hormóny a ich metabolity	28
3.10	Sérové proteíny	29
3.11	Monoklonálne imunoglobulíny	30
3.12	Cirkulujúce imunokomplexy (CIK, CIC)	32
3.13	Proteíny akútnej zápalovej fázy	32
3.14	Ďalšie ukazovatele malígnych ochorení	33
3.15	Bunkové tumorové markery	34
3.16	Cirkulujúce nádorové bunky (CTC)	35
3.17	Tumorové markery z orgánového hľadiska	36
3.18	Použitá literatúra	38
4	Metódy molekulovej diagnostiky v onkológii	39
4.1	Izolácia a purifikácia nukleových kyselín	40
4.2	Meranie koncentrácie a čistoty DNA a RNA	41
4.3	Dĺžkový polymorfizmus restrikčných fragmentov (RFLP)	42
4.4	Hybridizačné metódy	43

4.5	Reverzná transkripčia	45
4.6	Amplifikačné metódy	46
4.6.1	Polymerázová reťazová reakcia.....	46
4.6.2	Ligázová reťazová reakcia.....	50
4.6.3	Q- β replikázová reakcia	51
4.6.4	3SR amplifikačná reakcia	51
4.7	Elektroforetické metódy.....	52
4.7.1	Polyakrylamidová elektroforéza.....	53
4.7.2	Metóda analýzy jednovláknového konformačného polymorfizmu	53
4.7.3	Denaturačná gradientová gélová elektroforéza.....	54
4.7.4	Kapilárna elektroforéza	54
4.8	Metódy detekcie	55
4.9	Sekvenovanie nukleových kyselín	56
4.10	Branched DNA	57
4.11	Nové metódy.....	57
4.11.1	Genotypizácia	58
4.11.2	Single nucleotid polymorphisms	58
4.12	DNA čipy	61
4.13	Hmotnostná spektrometria.....	62
4.14	Metódy na sledovanie metylácií DNA	63
4.15	Použitá literatúra.....	64
5	Typy štúdií využívaných v onkológii.....	66
5.1	Klinická štúdia.....	66
5.1.1	Štúdie s kontrolou	67
5.1.2	Štúdie bez kontroly.....	69
5.2	Štúdie bez intervencie	69
5.3	Chyby v štúdiách.....	71
5.4	Použitá literatúra.....	73
6	Základné štatistické ukazovatele používané pri interpretácii výsledkov	74
6.1	p-hodnota.....	74
6.2	Interval spoľahlivosti	74
6.3	Sila testu	75
6.4	Interval spoľahlivosti	75
6.5	Relatívne (pomerné) riziko (relative risk, risk ratio, RR).....	75
6.6	Odds ratio, OR	76
6.7	Štatistické operácie používané pri analýzach s rôznou dĺžkou sledovania pacientov.....	77
6.8	Použitá literatúra.....	81

Nádorové ochorenia patria po kardiovaskulárnych ochoreniach k najčastejším príčinám úmrtia vo všetkých civilizovaných krajinách. Mortalita vzrastá aj keď sa na tomto náraste určite podieľa predĺženie strednej dĺžky života. Rovnako je zmenená nielen lokalizácia výskytu nádorového ochorenia ale dochádza aj k posunu k mladším vekovým kategóriám. Najviac vzrástla incidencia nádorových ochorení hrubého čreva a konečníka, obličiek, pľúc (hlavne u žien), kože vrátane melanómu, prostaty u mužov a u žien rakovina prsníka. Cieľom dnešných opatrení je čo najvčasnejšia diagnóza, aby sa nádorové ochorenie zachytilo v počiatočnom štádiu a bez generalizácie, to znamená ešte kurabilné. Niektorí autori uvádzajú, že zobrazovacie metódy sú schopné registrovať nádor, ktorý obsahuje 10^9 nádorových buniek kým imunohistochemické metódy sú schopné identifikovať nádor tisíc krát menší. Napriek tomu laboratórny dôkaz prítomnosti malignity nepriniesol s nádejou očakávanú možnosť skorého a špecifického záchytu ochorenia.

Nádorové ochorenia patria súčasne aj ku najobávanejším civilizačným chorobám dnešnej doby. Žiadne iné ochorenie nevyvoláva v ľuďoch toľko emócií. Príčin transformácie normálnej bunky na nádorovú je popísaných veľmi veľa a jednotlivé typy nádorov sa líšia po genetickej stránke; jedno však majú spoločné: nádorové bunky úplne zmenia úroveň svojho metabolizmu, aby uspokojili nároky na rýchly bunkový rast a delenie (proliferáciu).

Vznik a rast zhubných nádorov je v centre pozornosti a záujmu lekárov a vedcov mnohých odborov už niekoľko desaťročí. Z hľadiska terapie ide predovšetkým o rozpoznanie znakov, ktoré sú pre nádorovú bunku jedinečné a ktoré je možné využiť na jej cielené zničenie bez poškodenia zdravých buniek. A práve jedným z týchto univerzálnych znakov nádorových buniek je ich špecifický metabolizmus.

Intenzívny výskum sa venuje aj faktorom, ktoré prispievajú ku vzniku rôznych typov zhubného bujnenia. Okrem vrodených genetických faktorov a účasti onkogénnych vírusov zohráva pri vzniku rakoviny zásadnú úlohu aj vplyv prostredia a životný štýl. Všetky tieto na sebe nezávislé faktory môžu ale spôsobiť rovnakú zmenu: zo zdravej bunky, ktorá má iba obmedzenú schopnosť delenia, sa stane bunka v podstate nesmrteľná, deliaca sa rýchlo a neobmedzene. A na to musí bunka okrem iného urobiť zásadnú vec, a to úplne zmeniť svoj metabolizmus.

Okrem toho však nádorové bunky exprimujú aj celú škálu špecifických antigénov a látok, ktoré indukujú komplex neurohumorálnych zmien, čím ovplyvňujú metabolizmus celého organizmu. Priamy vplyv na metabolizmus živín majú cytokíny, hormonálne zmeny a špecifické látky produkované priamo niektorými nádormi (napr. lipidy mobilizujúci faktor – LMF; proteíny mobilizujúci faktor – PMF). Zmeny ku ktorým v organizme dochádza sú závislé od typu nádoru, jeho lokalizácie a od štádia ochorenia

3 METABOLIZMUS NÁDOROVÉHO TKANIVA

Jedným z univerzálnych znakov nádorových buniek je ich špecifický metabolizmus a jednou z podmienok rýchleho delenia buniek je dostatočná a rýchla syntéza prekursorov nevyhnutných na stavbu nových buniek. Nádorové bunky upravia svoj metabolizmus práve takým spôsobom, aby sa takýmto zvýšeným nárokom vyhovel. Nádorové bunky začnú spotrebovávať veľké množstvo glukózy a glutamínu čím sa do značnej miery stanú závislé hlavne na rýchlej glykolýze. Respiračný reťazec, ktorý je v normálnych bunkách hlavným zdrojom adenosíntrifosfátu (ATP) sa takmer zastaví. A to všetko hlavne preto, aby bunka posilnila syntézu nukleových kyselín, aminokyselín a lipidov nevyhnutných pre rast a následné delenie. Tejto špecifickej zmeny si všimol už v roku 1922 nemecký lekár Otto Warburg a jav bol neskôr pomenovaný ako Warburgov efekt. Kvôli nemu si musí bunka poradiť aj s výraznými zmenami vnútorného pH prostredia a mobilizovať systémy, ktoré ho udržiavajú na fyziologickej úrovni. Čo však dáva nádorovým bunkám silu je možné použiť aj proti nim. V ostatných rokoch prebiehajú klinické štúdie niekoľkých chemických látok, ktoré majú za cieľ obmedziť Warburgov efekt alebo reguláciu bunkového pH, a tým výrazne spomaliť rast nádorových buniek, kým ostatné bunky v tele sú ovplyvnené iba minimálne.

3.1 ENERGETICKÝ METABOLIZMUS A METABOLIZMUS SACHARIDOV

Nádorové bunky prijímajú niekoľkonásobne viac glukózy a glutamínu ako ostatné bunky a prostredníctvom glykolýzy vyrábajú až 60% celkového ATP; tvorba ATP v mitochondrii je naopak potlačená. Zapnú teda mechanizmus anaeróbnej glykolýzy, a to aj v prítomnosti kyslíka (Warburgov efekt). Pôvodne sa predpokladalo, že zvýšený tok glykolytickou dráhou je iba odpoveďou na zastavenie Krebsovho cyklu a respirácie, spôsobené nevratným poškodením mitochondrií pozorovaným u nádorových buniek. Nádorové bunky majú vyšší podiel mitochondriových mutácií, čo môže viesť ku zníženiu ich funkčnosti. Nevratné poškodenia mitochondrií sú však u nádorových buniek vzácne. Rôzne experimenty ukázali, že pokiaľ je glykolýza v nádorovej bunke potlačená, funkcie mitochondriového metabolizmu sa obnovia. U rýchlo rastúcich tumorov je naviac ATP syntetizovaného z veľkej časti aj v dýchacom reťazci a niektoré nádorové bunky prijímajú rovnaké množstvo kyslíka ako bunky zdravé. Z toho je možné usudzovať, že potlačenie funkcie mitochondrie nie je vo väčšine nádorov spôsobené jej poškodením, ale reguláciou aktivity na úrovni expresie, alebo aktivity proteínov zapojených do Krebsovho cyklu a dýchacieho reťazca. Napríklad za spomalenie Krebsovho cyklu v ľudských melanómových bunkách je zodpovedná inhibícia enzýmu akonitázy (alebo tiež akonitáthydrolázy, ktorá reverzibilne premieňa citrát na cis-akonitát a ten na izocitrát)

voľnými radikálmi. Teóriu aktívnej regulácie mitochondriových funkcií podporuje aj fakt, že Warburgov efekt nie je typický len pre nádorové bunky, ale podobne sa správajú aj bunky endotelu (lemujúce vnútornú stranu ciev) ako aj všetky rýchlo rastúce bunky vrátane buniek embryonálnych.

Prečo teda nádorové, ale aj embryonálne bunky používajú na tvorbu ATP tak neefektívny spôsob, akým je odpriahnutá (prebieha oddelene od Krebsovho cyklu) glykolýza? Respiračný reťazec je schopný z jednej molekuly glukózy vyprodukovať 18 krát viac molekúl ATP, v porovnaní iba zo samotnou glykolýzou. Na prvý pohľad ide možno o paradox. Situácia však dáva väčší zmysel ak si uvedomíme, že glykolýza je až 100 krát rýchlejšia, pokiaľ sa oddelí od mitochondriového metabolizmu. Ak má teda bunka zabezpečený vysoký prísun glukózy, môže za daný čas vyprodukovať väčšie množstvo ATP glykolýzou ako pri zapojení respirácie. A to zo sebou prináša ďalšie výhody.

Deliace sa bunky okrem nárokov na energiu musia tiež zdvojnásobiť svoju biomasu. Je potrebné zreplikovať celý genóm, ale aj vytvoriť množstvo mastných kyselín na tvorbu membrán, nehovoriac o aminokyselinách potrebných na syntézu proteínov. Prekurzorom na tvorbu nukleotidov je ribóza-5-fosfát, jeden z medziproduktov pentózofosfátového cyklu. Táto metabolická dráha je priamo napojená na glykolýzu a produkuje aj NADPH, ktorý je nevyhnutný aj na syntézu mastných kyselín a lipidov a na ochranu bunky pred voľnými radikálmi. Zvýšený tok glykolytickou dráhou so sebou prináša aj rýchlejší pentózofosfátový cyklus a Warburgov efekt teda dokáže pokryť tak vysoké energetické nároky nádorovej bunky ako aj jej požiadavky na stavebný materiál potrebný na bunkové delenie.

Zvýšená potreba biomolekúl však nie je jedinou požiadavkou nádorových buniek. Rovnako ako ostatné bunky tak aj nádorové sú ohrozené voľnými radikálmi a s nimi spojený oxidačný stres. Voľné radikály vznikajú aj v zdravej bunke a ak nie sú včas odstránené, poškodzujú DNA mitochondrií aj jadro buniek a oxidujú proteíny a lipidy, ktoré tým strácajú svoju funkciu. Nádor produkuje v dôsledku zrýchleného metabolizmu oveľa viac voľných radikálov, v porovnaní so zdravou bunkou a navyše nádorové bunky sú voči oxidačnému stresu citlivejšie. Jedným z ochrancov buniek pred oxidačným stresom je glutatión, ktorý ku svojej funkcii potrebuje NADPH. Nádorovej bunke teda opäť efektívnejšie pomôže pentózofosfátový cyklus, ktorý NADPH produkuje a tým ju chráni pred poškodením voľnými radikálmi. Pentózový cyklus je teda pre nádorovú bunku veľmi dôležitý. Pokiaľ ale reakcie glykolýzy prebiehajú veľmi rýchlo, glukóza-6-fosfát je premenený na pyruvát skôr, než sa odkloní do pentózofosfátového cyklu. Preto nádorové bunky produkujú dimér izoformy pyruvátkinázy M2, ktorý (na rozdiel od izoformy M1) vykazuje nižšiu rýchlosť. Spomalením posledného kroku glykolýzy – zmenou pyruvátkinázy, ktorá konvertuje fosfoenolpyruvát na pyruvát, dosiahne bunka presmerovanie časti glukózy z hlavnej glykolytickej dráhy do pentózového cyklu. Izoforma M2 pyruvátkinázy je navyše citlivá na pôsobenie voľných radikálov, čo má za následok

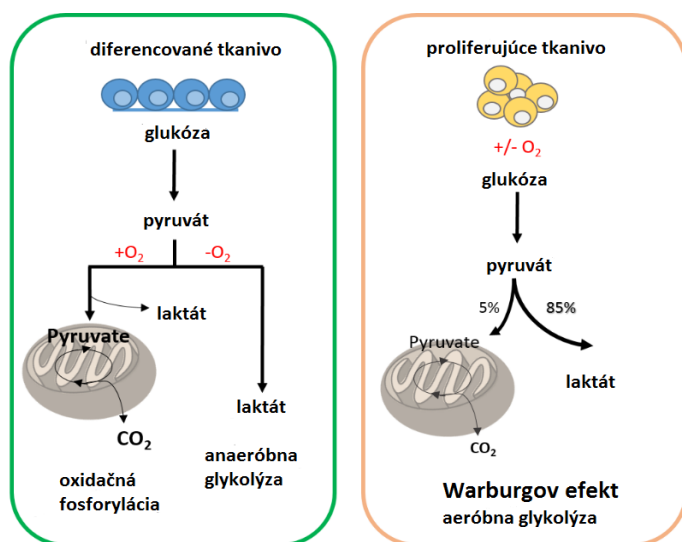
ďalšie zníženie jej aktivity. Ešte viac metabolitov glykolýzy je tlačných do pentózového cyklu a tvorby NADPH, čím sa vytvára regulačná slučka.

Na hladký priebeh Warburgovho efektu je potrebné vyriešiť ešte ďalší problém. Rýchlosť glykolýzy limituje dostupné množstvo cytosolického NAD^+ (oxidovaná forma NADH), ktorý je v jednom z krokov redukovaný na NADH, ktorý sa za normálnych okolností oxiduje späť na NAD^+ počas mitochondriovej respirácie. Táto možnosť však vzhľadom ku potlačenej respirácii u nádorových buniek odpadá. Problém je možno obísť zvýšenou produkciou enzýmu laktátdehydrogenázy, ktorý premieňa pyruvát v cytosóle na laktát a počas tohto procesu regeneruje NADPH späť na NAD^+ . Vzniká však obrovské množstvo laktátu, ktorý za daných okolností nie je možné ďalej metabolizovať a pokiaľ by sa v bunke akumuloval, glykolýza by sa nakoniec zastavila a rovnako by nebezpečne začalo klesať pH. Bunka preto radšej laktát uvoľňuje do vonkajšieho prostredia, čím sa síce zbaví potenciálne využiteľnej energie z trojuhlíkovej molekuly, ale zamedzí spomaleniu glykolýzy.

Tvorba laktátu poskytuje nádorovým bunkám ďalšie selekčné výhody. Laktát okysľuje vonkajšie prostredie bunky, čím môže napríklad inhibovať cytotoxické T lymfocyty a tým chrániť nádorové bunky pred imunitným systémom. Oslabuje tiež bunkovú adhéziu, čo môže prispievať ku ľahšiemu sa odpútaniu nádorových buniek od hlavného nádoru, čo vedie ku vzniku metastáz, najobávanejšieho štádia nádorového ochorenia. Solídne tumory nie sú homogénne a niekedy môže dôjsť ku metabolickej symbióze, kedy je laktát z hypoxickej, glykolytickej populácie buniek z vnútornej časti nádoru zdrojom uhlíka pre bunky v okysličenej časti na jeho povrchu. Nádorové bunky, teda aj

v tomto prípade našli spôsob, ako využiť metabolizmus vo svoj prospech.

V niektorých tumoroch sa môžu nachádzať rozdielne subpopulácie buniek s rozdielnymi spôsobmi získavania energie – jedna skupina je glukózodependentná s produkciou laktátu ako odpadom, a druhá skupina laktát zo susedných buniek využíva. Obe podskupiny buniek – laktátproduktujúce aj laktátutilizujúce žijú v symbióze a napomáhajú rastu nádorov.



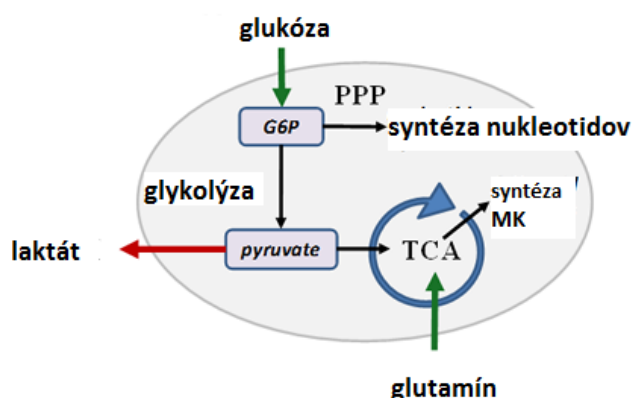
Obrázok 1 Warburgov efekt

3.2 METABOLIZMUS GLUTAMÍNU

V neposlednom rade sa ku slovu dostáva glutamín, ktorý nádorové bunky prijímajú v enormnom množstve, rovnako ako glukózu. Táto neesenciálna aminokyselina je nevyhnutná pre všetky bunky, pretože poskytuje dusík na syntézu aminokyselín a nukleotidov. U nádorovej bunky však plní ešte dôležitejšiu funkciu a hrá v metabolizme proliferujúcich buniek jedinečnú úlohu. Je tu síce zvýšený dopyt po nukleotidoch a aminokyselinách, ale príjem glutamínu výrazne presahuje potrebu dusíka pre tieto syntetické dráhy. Čo sa teda deje s prijatým a nevyužitým glutamínom?

Ako už bolo uvedené, dýchací reťazec je u niektorých typov nádorových buniek potlačený, nikdy však nie úplne zastavený. Úplná inhibícia dýchacieho reťazca nie je možná, nakoľko vytvára membránový potenciál nevyhnutný na delenie mitochondrií a tým aj celej bunky. Vstupom glutamínu do mitochondrie, kde je premenený na glutamát a ďalej na α -ketoglutarát, nádorová bunka rozbehne aspoň časť Krebsovho cyklu aj bez pyruvátu z glykolýzy. Glutamín môže byť tiež cez α -ketoglutarát premenený na citrát a ďalej na cytosolický acetyl-CoA, ktorý je nevyhnutný na syntézu lipidov, alebo až na laktát uvoľňovaný von z bunky. Počas tejto reakcie vzniká NADPH potrebné na syntézu lipidov a ďalších stavebných jednotiek. Prebytočný dusík, ktorý nie je zabudovaný do aminokyselín nevyhnutných na syntézu proteínov, sa premieňa na alanín a amoniak a následne uvoľňuje von z bunky. Počas spracovania glutamínu vzniká tiež oxid uhličitý (CO_2), ktorý voľne difunduje do okolia bunky. Glutaminolýzou tak bunka elegantne vyrieši nielen syntézu aminokyselín a lipidov, ale aj nedostatok medziproduktov Krebsovho cyklu ktorým je sprevádzaný Warburgov efekt, a tým sa zabezpečí produkcia redukovaných ekvivalentov NADH a FADH_2 nevyhnutných na udržanie mitochondriového membránového potenciálu.

Glutamín slúži aj ako zdroj acetyl-CoA pre lipogenézu. Po konverzii glutamínu na malát



a následne pyruvát sa z pyruvátu tvorí acetyl-CoA. Táto úloha na syntézu lipidov *de novo* je obzvlášť významná za hypoxických podmienok alebo disfunkcii mitochondrií. V týchto podmienkach až 80% acetyl-CoA pre lipogenézu pochádza práve z glutamínu, v porovnaní s 10-20% pri normoxických podmienkach.

Obrázok 2 Metabolizmus glukózy a glutamínu v nádorovej bunke

V neposlednom rade glutamín slúži aj ako molekula schopná modulovať signálne dráhy, ktoré tiež urýchľujú rast. Aminokyselinový transportér ASCT2 je transportér s vysokou afinitou ku L-

glutamínu, ktorý je v nádorových bunkách niekoľkonásobne viac up-regulovaný v porovnaní s bunkami normálnymi. Vstup glutamínu do bunky prostredníctvom tohto transportéru aktivuje rapamycínový komplex, ktorého úlohou je regulácia a kontrola syntézy proteínov.

3.3 ZMENY PH V NÁDOROVEJ BUNKE

Zvýšená produkcia laktátu glykolýzou, rovnako ako zvýšená produkcia CO₂ glutaminolýzou a jeho následná premena na uhličitanový anión (HCO₃⁻) však vedie ku zásadnému problému: okysľovaniu vnútorného prostredia bunky. Pokiaľ by pH kleslo pod 7,1-7,2, bunka by nebola schopná delenia. Je preto nevyhnutné mobilizovať systémy, ktoré nadbytočné vodíkové ióny odčerpajú. Tie sú tak výkonné, že vnútorné pH nádorovej bunky býva vo výsledku ešte vyššie ako u buniek normálnych. Jej vonkajšie pH je však výrazne kyslejšie čo prispieva ku zmenám medzibunkovej hmoty a metastázovaniu nádorov.

3.4 VPLYV NÁDOROVÉHO OCHORENIA NA CELKOVÝ METABOLIZMUS SACHARIDOV

Intenzita glykolýzy sa často u veľkých nádorov prejavuje poklesom glykémie. Zvýšená schopnosť nádorových buniek vychytávať glukózu z extracelulárneho priestoru vzniká v dôsledku zvýšenej expresie hexokinázy, transportérov glukózy GLUT1 a GLUT3 ako aj ďalších transportérov glukózy, ktoré sa za fyziologických podmienok nevyskytujú. Anaeróbna glykolýza je typická nielen u nádorov s nedostatočne vyvinutou mikrocirkuláciou, ale aj u dobre perfundovaných nádorov. Príčinou je pravdepodobne adaptácia na intermitentnú hypoxiu už v počiatočných štádiách rastu nádoru. Často je prítomná rezistencia na inzulín a zvýšená glukoneogenéza v pečeni. Hlavnou príčinou rezistencie na inzulín sú pravdepodobne cytokíny. Najvýznamnejšími substrátmi pre glukoneogézu sú aminokyseliny uvoľnené z kostrového svalstva, glycerol uvoľnený pri lipolýze z tukového tkaniva a laktát, ktorého nezanedbateľná časť je produkovaná priamo nádorom. Syntéza glukózy z laktátu predstavuje pomerne vysokú spotrebu ATP. Predpokladá sa, že táto aktivovaná recyklácia glukózy z laktátu (Coriho cyklus) medzi nádorom a pečeňou sa podieľa významnou mierou na zvýšenom energetickom výdaji. Pokles pH v okolí nádorového tkaniva spôsobený produkciou laktátu je stimulom pre vaskularizáciu nádorového tkaniva, čo uľahčuje inváziu nádorového tkaniva do okolia. Tým sa vo fenotype nádorových buniek indukujú zmeny, ktoré zvyšujú ich rezistenciu voči účinku cytostatických liečiv. Zvýšená hladina laktátu je sprevádzaná nevoľnosťou a nechutenstvom a je jednou z príčin zníženého príjmu potravy u pacientov s nádorovým ochorením. Hypoxické nádory s vyššou intenzitou anaeróbnej glykolýzy sú agresívnejšie a rezistentnejšie tak na účinok rádioterapeutickej ako aj cytostatickej liečby.

3.5 VPLYV NÁDOROVÉHO OCHORENIA NA CELKOVÝ METABOLIZMUS LIPIDOV

Lipidové zložky potravy ovplyvňujú začiatok a rozvoj mnohých ochorení vrátane onkologických. S ohľadom na nádorové ochorenia sa uvádza zvýšený príjem tukov ako rizikový faktor hlavne u kolorektálneho karcinómu, karcinómu prsníka alebo prostaty. Dôležité je však nie len množstvo, ale hlavne zloženie tukov, pretože tuky nie sú iba zdrojom energie, ale hrajú tiež dôležitú štruktúrnu a regulačnú úlohu s významným dopadom na fyziologické funkcie organizmu. Vysoko nenasýtené mastné kyseliny (VNMK - „polyunsaturated fatty acids –PUFAs“ - kyseliny s 2 a viacerými dvojitémi väzbami) zohrávajú dôležitú úlohu v štruktúre membrán a v syntéze dôležitých metabolitov. Živočíchy nedokážu syntetizovať ω -3 a ω -6 VNMK *de novo* a nevedia ani premeniť jednu skupinu na druhú, preto tieto esenciálne kyseliny musia byť zložkou potravy. Sú životne dôležité ako zložka všetkých membrán a permeabilnej bariéry pokožky a ako prekurzory metabolitov – eikozanoidov a s nimi súvisiacich látok, ktoré hrajú dôležitú regulačnú úlohu v tkanivách. Pre životné procesy je dôležité udržiavanie príslušných fyzikálno-chemických vlastností membrány. Modifikácia MK v potrave mení zloženie fosfolipidových MK a ovplyvňuje funkcie sprostredkované membránovými proteínmi (receptormi, transportnými proteínmi, enzýmami) ako aj funkciu na membránu viazaných signálnych molekúl (G proteínov, fosfolipáz atď.). VNMK sú tiež prekurzormi lipidových mediátorov, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu aj v procese karcinogenézy. VNMK a ich metabolity fungujú spolu s cytokínmi a hormónmi ako intra- i intercelulárne mediátory a modulátory bunkovej signalizačnej siete.

Kyselina linolová (LA) a od nej odvodená kyselina arachidonová (AA, 20:4, ω -6) je dôležitým zdrojom biologicky aktívnych mediátorov – eikozanoidov (prostaglandíny, leukotriény) a v experimentálnych systémoch je často dokazovaný podporný účinok pre vznik a rozvoj nádorov. Naopak u kyseliny alfa-linolovej (ALA) a od nej odvodených ekozapentaénovej (EPA) a dokozahexaénovej (DHA) kyseliny boli preukázané v experimentálnych systémoch inhibičné protinádorové účinky. DHA (22:6, ω -3) je najviac nenasýtenou MK so šiestimi dvojitémi väzbami a špeciálnymi štruktúrnymi vlastnosťami.

V priebehu vývoja ľudskej spoločnosti sa zásadne zmenila spotreba aj spektrum lipidov vo výžive. Došlo k prudkému nárastu spotreby celkového tuku a nasýtených MK so súčasným poklesom príjmu antioxidantov vo forme vitamínov C a E a rovnako sa zmenil pomer medzi spotrebou ω -6 a ω -3 VNMK v neprospech ω -3. Pomer ω -6 : ω -3 VNMK v diéte sa drasticky zmenil a uvádza sa, že v tzv. západnej diéte (Western diet) je dnes namiesto 1:1 pomer zmenený na 10 – 25:1. V potravinách sa tiež objavili *trans* mastné kyseliny vznikajúce priemyselným spracovaním tukov, ktoré môžu mať negatívne dopady na ľudské zdravie. Kým proteíny sú geneticky determinované, zloženie bunkovej membrány s ohľadom na VNMK je z veľkej časti závislé na príjme z potravy.

VNMK typu ω -3 a ω -6 sú metabolicky aj funkčne odlišné, ale súťažia o rovnaké desaturačné a elongačné enzýmy. Dôsledkom dodania ω -3 VNMK dochádza k inhibícii syntézy AA z LA a k zníženiu produkcie aktívnych eikozanoidov. Ich rovnováha je dôležitá pre homeostázu a normálny vývoj. Nepomer ω -3 a ω -6 VNMK potom prispieva okrem iného aj k rozvoju zápalových a nádorových ochorení.

Epidemiologické, klinické a laboratórne štúdie poukazujú na dôležitosť množstva a druhov konzumovaných tukov v etiológii a prežívaní niektorých typov nádorov (hlavne prsníka a kolorektálneho karcinómu). Kým nasýtené mastné kyseliny môžu stimulovať iniciáciu karcinogenézy, nenasýtené mastné kyseliny môžu pôsobiť v promočnej a progresívnej fáze v dávkovej závislosti. Epidemiologické štúdie predpokladajú, že nízkotuková diéta v kombinácii s nenasýtenými MK, kde je vyvážený pomer ω -3 : ω -6 súvisí s nižšou mortalitou u nádorov prsníka a kolorektálneho karcinómu. Úloha týchto VNMK je sledovaná rovnako u ďalších typov nádorov gastrointestinálneho traktu (napr. pankreasu) aj u nádorov prostaty. Niektoré tuky, hlavne s obsahom mononenasýtených alebo ω -3 VNMK nemajú promočné účinky, i keď ich obsah v potrave je vysoký.

Vďaka objavu génu *Fat-1*, kódujúceho ω -3 desaturázu, ktorú cicavce nemajú a bola dokázaná celú škálu prospešných účinkov ω -3 VNMK na modeloch transgenných buniek, myší, prasiat a pod. Boli dokázané antiarytmické, protizápalové, antialergické, neuroregeneratívne a protinádorové účinky. Presné mechanizmy účinku rôznych lipidov a VNMK nie sú však stále objasnené.

Uvažuje sa o nasledovných mechanizmoch pôsobenia VNMK, ktoré sa uplatňujú v procese karcinogenézy:

- štrukturálne a funkčné zmeny membrán, ktorých neoddeliteľnou súčasťou sú VNMK. Ovplyvnenie biofyzikálnych a biochemických vlastností membrán má dopad hlavne na funkciu proteínov viazaných na membránu, prenášačov a receptorov;
- produkcia špecifických metabolitov ovplyvňujúcich bunkovú signalizáciu a génovú expresiu, napr. eikozanoidy, ceramid, DAG atď. a imunitný systém uplatňujúcich sa v zápale;
- produkcia množstva ROS, NOS a lipidových peroxidov vznikajúcich v metabolizme VNMK a ovplyvňujúcich celý rad dejov v bunkách a tkanivách. VNMK ovplyvňujú aj antioxidačné systémy a dochádza ku zmenám redoxnej rovnováhy;
- priame pôsobenie na vnútrobunkové signálne zložky ako špecifické signálne molekuly (kinázy, fosfatázy) a transkripčné faktory. V dôsledku toho dochádza potom ku zmenám prenosu signálov a expresii génov s dopadom na chovanie buniek.

Účinky tukov môžu byť priame (zahŕňajú zmeny v štruktúre a funkcii bunkových membrán) alebo nepriame (zahŕňajú zmeny v endokrinnom systéme a metabolizme VNMK, tj. syntéza PG a LT a ďalej

supresia imunitnej odpovede). Niektoré VNMK môžu účinne a priamo riadiť transkripciu špecifických génov (napr. gény kódujúce lipogénne proteíny, delta desaturázy).

Nádorové podporné pôsobenie niektorých tukov môže tiež súvisieť s ich schopnosťou znižovať alebo inhibovať medzibunkovú komunikáciu a blokovať tak metabolickú kooperáciu. Strata spätnoväzobnej kontroly následne prispieva k nádorovému bujneniu.

Súčasný údaje ukazujú vedúcu úlohu lipidov v kontrole peroxidačného poškodenia membrán. Dvojité nenasýtené väzby podliehajú autokatalytickému procesu, ktorý produkuje celý rad produktov. Peroxidácia lipidov zohráva dôležitú regulačnú úlohu v mitotickej aktivite bunky protredníctvom produktov degradácie membránových lipidov. Tento mechanizmus je v nádorových bunkách defektný, stupeň peroxidácie je nízky a metabolizmus reaktívnych druhov kyslíka je aberantný.

Pri malígnej transformácii dochádza okrem iných zmien tiež k restrikcii exprese antioxidantnej enzymatickej ochrany bunky. Oxidačný stres následne poškodzuje lipidové štruktúry membrány a znižuje obsah VNMK.

V rastovej fáze nádoru je výrazne znížený jeden z kontrolných mechanizmov bunkového delenia a to inhibičné pôsobenie produktov peroxidácie lipidov na syntézu DNA. Membrány nádorových buniek sú zmenené čo do zloženia a štrukturálnej organizácie lipidov v ranom štádiu neoplastickej transformácie okrem iného v dôsledku zníženia antioxidantnej ochrany.

Nádorové bunky sú potom rezistentné na peroxidáciu lipidov vďaka:

1. nízkemu obsahu VNMK;
2. zníženiu koncentrácie cytochrómu P-450;
3. zníženému obsahu NADPH;
4. zvýšenej antioxidantnej aktivite (opak ako pri transformácii).

Metabolizmus a obrat fosfolipidov v membránach a oxidačný metabolizmus nádorových buniek sa zásadne líši od buniek nenádorových.

Niektoré zdroje uvádzajú, že stupeň tumorigenicity nepriamo úmerne koreluje s obsahom VNMK v membránach buniek. VNMK zabíjajúce nádorové bunky v kultúre môžu iniciovať vlastnú peroxidáciu zvýšeným počtom superoxidových radikálov. Normálne bunky tak nereagujú, čo ponúka možnosť selektívneho ovplyvňovania nádorových buniek.

V plazme pacientov s nádorovým ochorením a v bunkách nádorového tkaniva boli v porovnaní s nenádorovými bunkami dokázané zmeny v zložení a metabolizme lipidov. Ide hlavne o zníženie obsahu ω -3 VNMK (DHA) v porovnaní s ω -6 (LA a AA). Ukázalo sa, že dlhodobšie podávanie vysokých dávok EPA a DHA zvyšuje ich obsah v plazme, v membránach erytrocytov, ale aj v membránach buniek iných tkanív vrátane nádorových.

Integrovaný pohľad na komplexné lipidové interakcie, ktoré určujú výsledný tzv. lipidóm tvorí lipidový profil jednotlivca, ktorý môže byť dôležitý s ohľadom na riziko vzniku niektorých typov nádorových ochorení ovplyvňovaných diétou.

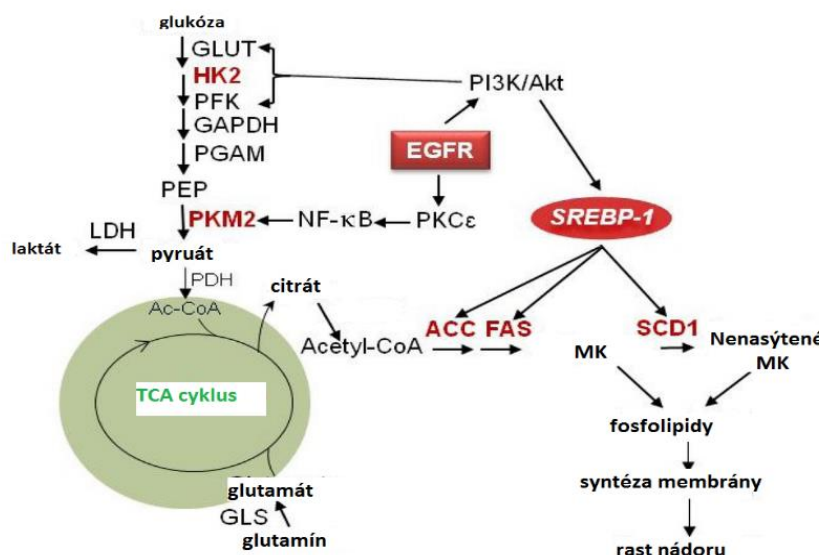
Počas karcinogenézy sa vyvíja tzv. lipogénny charakter buniek. Znamená to zvýšenú endogénnu syntézu mastných kyselín a zníženú citlivosť k nutričným zásahom. Syntáza mastných kyselín (FASN – fatty acid synthase) funguje pod transkripčnou kontrolou tzv. SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein), ktorého aktivita môže byť ovplyvňovaná hormonálne a nutrične a je napojená čiastočne na signálnu transdukciu cez fosfoinozitol-3-kinázu (PI3K)/Akt a ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) regulujúcu expresiu a maturáciu SREBP.

Deje na mitochondriách a oxidačný metabolizmus. Zvýšené množstvo VNMK má za následok zvýšenú produkciu ROS a lipidové peroxidácie, čo vyvoláva oxidačný stres. Okrem ROS zohrávajú v rozvoji nádorov úlohu aj reaktívne metabolity dusíka (RNS), ktorých produkcia je stimulovaná aktiváciou indukibilnej syntázy oxidov dusíka aj NOS. Oxidačné produkty (aldehydy, hydroxynonenal) môžu priamo oxidačne poškodzovať DNA a spôsobovať mutácie a genetickú nestabilitu, a môžu tiež aktivovať špecifické transkripčné faktory a meniť expresiu génov (aktivovať onkogény), ovplyvňovať mitochondrie a aktivitu s nimi spojených apoptických proteínov. Môžu tiež poškodzovať lipidy (lipidová peroxidácia) alebo proteíny, ktoré sa následne zúčastňovať rôznymi mechanizmami angiogenézy a tvorby metastáz. Zmenená redoxná rovnováha môže tiež podporovať rezistenciu k chemoterapii. Na druhej strane oxidačné poškodenie môže selektívne likvidovať nádorové bunky na základe ich odlišného oxidačného metabolizmu a zníženej antioxidačnej ochrany.

Štúdie ukazujú, že MK pôsobia v závislosti od koncentrácie. Nízke koncentrácie môžu podporovať bunkový rast, kým vysoké koncentrácie, hlavne vďaka indukcii oxidačného metabolizmu, môžu rast tlmieť a indukovať bunkovú smrť. Zvýšená produkcia PG, ale podporuje proliferáciu rôznymi parakrinnými i autokrinnými mechanizmami (podpora produkcie cytokínov, ovplyvnenie vnútrobunkových signálnych dráh, imunosupresia).

U pacientov s nádorovými ochoreniami je charakteristická deplécia tukového tkaniva. Jedným z dôvodov je aktivačný účinok LMF (lipidy mobilizujúci faktor) na hormón senzitívnu lipázu prostredníctvom β_3 receptorov a cAMP, čím sa aktivuje lipolýza v tukovom tkanive. Menej významný je pravdepodobne inhibičný vplyv cytokínov na lipoproteínovú lipázu - LPL. Lipidy mobilizujúci faktor je rovnako zodpovedný za expresiu uncoupling proteínov 1, 2 a 3 v tukovom tkanive, pečeni a kostrovom svalu. Údaje o zmenách β -oxidácie mastných kyselín nie sú jednotné.

Z vyššie uvedených poznatkov vyplýva, že existujú vzájomné vzťahy medzi výživou a rozvojom niektorých nádorových ochorení. U pacientov s nádorovým ochorením sa vyvíjajú špecifické klinické symptómy, ktoré môžu byť ovplyvňované výživou.



Obrázok 3 Prepojenie metabolizmu sacharidov a lipidov v nádorovej bunke

Z poznatkov získaných z epidemiologických, experimentálnych a cielených klinických štúdií o úlohe a mechanizmoch pôsobenia VNMK pri vzniku a rozvoji rôznych ochorení vrátane nádorových vychádzajú potom dietetické odporúčenia smerujúce hlavne k uchovaniu zdravia a prevencii ochorení, ale tiež k využitiu týchto látok v terapii.

3.6 VPLYV NÁDOROVÉHO OCHORENIA NA CELKOVÝ METABOLIZMUS AMINOKYSELÍN A PROTEÍNOV

Proteosyntéza v nádorovom tkanive vzrastá až na 4-násobok proteosyntézy okolitých tkanív. V kostrovom svalu je inhibovaná proteosyntéza a aktivovaná proteolýza, v pečeni je stimulovaná proteosyntéza a glukoneogenéza z aminokyselín. Deplécia proteínov kostrového svalstva je však často maskovaná zvýšeným množstvom mimobunkovej tekutiny. Aktivácia proteolýzy vo svaloch indukovaná aktiváciou ubiquitín-proteazómového systému, cytokínmi a PMF je sprevádzaná oxidáciou rozvetvených aminokyselín (BCAA) a produkciou glutamínu. Aminokyseliny sú intenzívne vychytávané nádorovou bunkou, ktoré bunka využíva nielen na proteosyntézu ale aj ako zdroj energie na syntézu nukleotidov, polyamínov a ďalších látok. V nádorovej bunke je vysoká aktivita glutaminázy, pretože glutamín je pre ňu hlavným zdrojom dusíka. Vysokú utilizáciu má aj metionín (nevyhnutný pre metyláciu pri syntéze nukleových kyselín) a arginín (nevyhnutný na syntézu polyamínov a oxidu dusnatého). Zmeny v spektre aminokyselín v krvnej plazme nie sú jednoznačné a sú ovplyvnené typom nádoru a tkaniva v ktorom sa nádor nachádza. Za hlavnú zmenu je považovaný pokles koncentrácie glukoplastických aminokyselín v dôsledku ich zvýšenej utilizácie

v pečeni. Častý je aj vzostup koncentrácie tryptofánu v dôsledku hypoalbuminémie a vytesnenia jeho väzby na albumín masnými kyselinami (fyziologicky je okolo 90% tryptofánu viazaného na albumíny). Vzostup koncentrácie voľného tryptofánu je dávaný do súvislosti so zvýšenou syntézou serotonínu v mozgu a jeho vplyvom na centrá sýtosti a hladu v hypotalame a s anorexiou.

3.7 REGULÁCIA BUNKOVÉHO METABOLIZMU

Na rozdiel od jednobunkových organizmov sú bunky mnohobunkového organizmu vystavené neustálemu a v zásade konštantnému prívodu živín. Nemôžu prijímať živiny neobmedzene, rovnako ako sa nemôžu začať deliť bez vonkajšieho podnetu. Príjem živín a pokyn k bunkovému deleniu prísne reguluje sieť signálnych dráh, ktoré monitorujú zmeny v podmienkach prostredia a fyziologického stavu bunky, a adekvátne na ne odpovedajú.

Nádorová bunka má ale tak vysoké nároky, že obvyklý prísun živín by jej nestačil. Vytvorili sa teda opäť mechanizmy ako je ho možné zvýšiť. Počas svojej transformácie musia nahromadiť mutácie v proteínoch signálnych dráh alebo ich regulátorov, ktoré im umožnia nezávislosť na signáloch s prostredia. V mnohých prípadoch aj mutované onkogény priamo zvyšujú expresiu alebo aktivitu metabolických enzýmov alebo glukózových prenášačov. Bunka potom môže sama riadiť príjem živín a spôsob ich spracovania, rovnako ako rozhoduje aj o svojom bunkovom delení. Vďaka Warburgovmu efektu je nádorová bunka oslobodená aj od závislosti na kyslíku. V podstate sa tak stáva samostatným organizmom, akýmsi parazitom s vlastným genómom, v mnohom odlišným od genómu „hostiteľa“, riadiacim sa vlastnými pravidlami.

V niektorých prípadoch ide práve o zmenu metabolizmu, ktorá nie iba sprevádza, ale je aj priamou príčinou nádorovej transformácie. Je popísaných niekoľko prípadov, kedy bunka získala mutácie v konkrétnych enzýmoch Krebsovho cyklu. Inaktivácia týchto enzýmov veľmi účinne blokuje chod Krebsovho cyklu a núti bunku do glykolýzy, čím sa spúšťa Warburgov efekt. Napríklad mutácia v géne pre sukcinátdehydrogenázu je typická pre paraganglióm (neuroendokrinný nádor hlavy, krku alebo brucha), mutácia v géne pre fumaráthydratázu sa objavuje v hypernefróme (nádor obličkových kanálikov) a mutácie v géne pre izocitrátdehydrogenázu je prítomná vo veľkom počte prípadov glioblastómu (nádor gliových buniek mozgu).

3.8 METABOLIZMUS PERIFÉRYNYCH TKANÍV PRI NÁDOROVÝCH OCHORENIACH

Nádorové ochorenia sa často prejavujú zvýšeným metabolickým obratom a zvýšeným energetickým výdajom čo vedie k rozvoju kachexie s výrazným úbytkom tukového tkaniva ako aj kostrového svalstva. Kachexia je príčinou úmrtia u viac ako 30% pacientov. Nakoľko kachexia je prítomná aj u veľmi malých nádorov nemožno za jej príčinu považovať len intenzívny metabolizmus a energetické nároky nádorových buniek. Príčinou sú teda komplexné neurohumorálne zmeny:

- zvýšená produkcia protizápalových cytokínov (TNF-alfa, IL-1, IL-6 a interferón-gama)
- zmeny v hladine hormónov (hlavne kortizónu a glukagónu)
- účinok látok, ktoré sú produkované a uvoľňované priamo nádorovými bunkami (LMF a PMF)
- zvýšená produkcia PGE₂ v hypotalame (indukovaná TNF-alfa a IL-1 v súvislosti so zvýšenou telesnou teplotou a zvýšeným metabolickým obratom).

3.9 RAST NÁDORU A VÝŽIVA

Vhodná výživa má u nádorových ochorení preventívny aj terapeutický účinok. Odhaduje sa, že správnou výživou je možné znížiť výskyt nádorových ochorení o 30 - 40%, spomaliť rast nádorového tkaniva a priaznivo ovplyvniť nutričný stav a reakcie organizmu na chirurgický zákrok, chemoterapiu či rádioterapiu.

Niektoré metabolické abnormality rýchlo proliferujúcich nádorových buniek iniciovali experimenty ovplyvniť ich rast rôznymi diétami s deficienciou látok esenciálnych pre nádorové bunky. Náhrada glukózy, ktorá je hlavným energetickým substrátom pre nádorovú bunku nie je možná. Zvýšený prísun sorbitolu alebo fruktózy môže ohroziť pacienta vznikom laktátovej acidózy. Perspektívna sa javí kombinácia zvýšeného príjmu PUFA radu ω -6. Zistilo sa, že niektoré typy nádorových buniek nie sú schopné prežívať v médiu, ktorý je ochudobnený o metionín (je nevyhnutný na syntézu nukleových kyselín, proteínov, glutatiónu ako aj iných látok). Tento poznatok inicioval uskutočniť štúdie s diétami, ktoré boli ochudobnené o metionín a boli podávané pacientom súbežne s chemoterapiou. Ich výsledky sú však nejednoznačné.

3.9.1 NUTRIČNÝ STAV PACIENTA S NÁDOROVÝM OCHORENÍM A VÝŽIVA

Zabránenie rozvoju kachexie predstavuje jednu zo základných úloh výskumu v oblasti výživovej terapie u pacientov s nádorovým ochorením. Jeden z hlavných problémov je intenzívny metabolizmus a schopnosť nádorového tkaniva odčerpávať živiny a dôležité látky z krvného obehu

účinnnejšie ako iné tkanivá. To znamená že exogénne živiny sú dominantne utilizované nádorovým tkanivom a namiesto úpravy nutričného stavu podporíme rast nádoru. Významným problémom je aj zvýšený metabolický obrat, anorexia, nauzea, zvracanie a negatívne vplyvy chemoterapie, rádioterapie prípadne chirurgického zákroku.

Pacientom s nádorovou malnutríciou sa odporúča podávať okolo 140 kJ/kg/deň s vyšším zastúpením lipidov, proteínov a vlákniny. Potrava by mala byť rozdelená na väčší počet porcií. Umelá výživa (enterálna alebo parenterálna) je indikovaná len u závažných malnutrícií. Odporúča sa obohatiť stravu o suplementy, u ktorých sa predpokladá imunomodulačný účinok, priaznivý vplyv na proteínovú bilanciu a inhibičný vplyv na rast nádoru. K týmto suplementom môžeme zaradiť hlavne arginín, glutamín, PUFA radu ω -3 (hlavne kyselina eikozapentaénová – ktorá tvorí cca 20% rybieho oleja). Experimentálne bol zistený ich inhibičný vplyv na biologické účinky LMF a PMF a výsledky klinických štúdií ukázali znížený pokles telesnej hmotnosti a straty tuku u niektorých nádorových ochorení. Nevýriešeným problémom je stále otázka príjmu glutamínu, ktorý je pre nádorové tkanivo hlavným zdrojom dusíka (z tohto pohľadu by bol teda jeho zvýšený príjem nežiaduci) a je veľmi dôležitou aminokyselinou pre funkčnosť imunitného systému (a z tohto dôvodu je naopak jeho príjem žiaduci).

3.9.2 PREVENCIA NÁDOROVÉHO OCHORENIA A VÝŽIVA

Dlhodobý nadmerný príjem jednoduchých sacharidov, živočíšneho tuku, červeného mäsa, nízky príjem vlákniny a nevhodný pomer mastných kyselín radu ω -3 a ω -6 zvyšujú riziko vzniku nádorových ochorení. V rámci prevencie sa odporúča zvýšiť príjem ovocia, zeleniny a iných druhov vlákniny a mastných kyselín ω -3. Protektívny vplyv bol dokázaný u selénu, kyseliny listovej, vitamínu B₁₂, vitamínu D, chlorofylu a antioxidantov (flavonoidy, karotény, vitamín C). Experimenty poukazujú aj na preventívny vplyv probiotík (hlavné probiotické kultúry sú: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium bifidum*), hlavne na vznik kolorektálneho karcinómu. Predpokladá sa, že okrem priaznivého vplyvu na skladbu bakteriálnej flóry má zásadný význam aj pokles pH navodený produkciou mastných kyselín s krátkym reťazcom v hrubom čreve. Probiotiká znižujú aktivitu prokarcinogénnych enzýmov beta-glukuronidázy, nitroreduktázy a azoreduktázy. Za veľmi účinné antikarcinogény sa považujú izoflavonoidy genisteín a daidzeín (nachádzajú sa v sóji) a kurkumín (látka izolovaná zo žltého zázvoru – *Curcuma longa*, ktorý sa napríklad nachádza v kari korení).

3.10 VYUŽITIE ŠPECIFICKÉHO METABOLIZMU NÁDOROVEJ BUNKY V DIAGNOSTIKE A TERAPII

Obranný mechanizmus nádorovej bunky (Warburgov efekt) sa môže stať mocným nástrojom v rukách lekárov aj vedcov. Ide o natoľko špecifický jav, že je ho možné využiť nielen v diagnostike (a to aj vo včasnom štádiu) ale aj v terapii.

Bunky rôznych tkanív majú rôznu schopnosť prijímať a spracovávať glukózu. Všeobecne ako už bolo uvedené platí, že nádorové bunky (až na niekoľko výnimiek) vykazujú oveľa vyšší príjem glukózy ako bunky v ich okolí. Toho využíva jedna z metód pre lokalizáciu nádoru v tele. Pacientovi je podaný roztok rádionuklidom značeného derivátu glukózy (2- ^{18}F fluro-2-deoxy-D-glukóza; FDG), ktorý je prijímaný bunkami rovnakými prenášačmi ako neznačená glukóza. Pri teste pomocou pozitronovej emisnej tomografie (PET) je následne zachytené žiarenie vychádzajúce z FDG. Nádorové bunky, ktoré prijímajú niekoľkonásobne viac glukózy (a teda aj FDG), sa na výsledných tomografických rezoch zobrazujú s vyššou intenzitou.

Zvýšený príjem glukózy je rovnako vhodným farmakologickým cieľom aj v terapii. Jednou z látok, ktorá využíva glukózový prenášač na vstup do bunky je glufosfamid. Tento konjugát D-glukózy a aktívnej časti cytotoxínu ifosfamidu patrí do rodiny chemoterapeutík nazývaných alkylátory. Do bunky vstupuje rovnako ľahko ako normálna glukóza, ale vďaka Warburgovmu efektu ho nádorová bunka prijme niekoľko násobne viac. Vo vnútri bunky sa následne enzymaticky štiepi na glukózu a aktívny ifosfamid, ktorý je schopný kovalentne spojiť reťazce DNA v bunkovom jadre a tým účinne zabrániť replikácii, a teda rastu nádoru. Glufosfamid sa v súčasnej dobe nachádza v tretej fáze klinických štúdií a je teda nádej, že sa skoro začne rozsiahlejšie využívať v terapii.

Úspešná liečba môže byť založená aj na efektívnych inhibítoroch glykolýzy. Jednou z možností je priamo zablockovať príjem glukózy do bunky pomocou inhibítorov glukózových prenášačov, alebo zastaviť glykolýzu využitím niektorých analógov glukózy (napr. 2-deoxyglukóza). Analógy bunka prijíma rovnako ako glukózu, nemôžu však byť úplne metabolizované glykolýzou a nakoniec spôsobia jej zastavenie. Nanešťastie nefungujú stopercentne. Pretože iba súťažia s normálnou glukózou, ktorá sa spolu s nimi vyskytuje v krvnom obeh. Pri daných koncentráciách, ktoré sú pacientom ešte tolerované dochádza iba ku čiastočnej inhibícii glykolýzy a samotná liečba iba týmito analógmi nevyvoláva zásadnú odozvu nádoru. Vývoj takýchto látok však nie je zbytočný. Zo štúdií vyplýva, že analógy glukózy alebo inhibítory glukózových prenášačov podávané súčasne s bežne používanými liečivami výrazne zvyšujú ich protinádorovú aktivitu.

O zastavenie nádorového rastu spomalením glykolýzy sa vedci pokúšajú tiež vývojom inhibítorov glykolytických enzýmov. V súčasnej dobe sú dostupné inhibítory hexokinázy (lonidamín, 3-brómpyruvát), pyruvát kinázy (shikonín) alebo laktátdehydrogenázy (oxamát). Rovnako aj

dichlóracetát, inhibítor pyruvát dehydrogenázy kinázy, zvyšuje tok pyruvátu do mitochondrie, čím znižuje rýchlosť glykolýzy a spomaľuje Warburgov efekt. Všetky tieto látky prechádzajú momentálne rôznymi fázami preklinických alebo klinických skúšok, či už ako samostatné liečivá alebo ako podporná liečba v kombinácii s liečbou konvenčnou.

Rovnako aj inhibítory pentózofosfátového cyklu sú v strede záujmu z hľadiska farmakologického využitia. Ako už vieme tento cyklus je hlavným zdrojom NADPH, ktorý je nevyhnutný na ochranu bunky pred oxidačným stresom. Rovnako oxidačný stres zabíja nádorové bunky s vyššou účinnosťou v porovnaní s normálnymi, a nádorová bunka produkuje vďaka svojmu zrýchlenému metabolizmu oveľa viac voľných radikálov. Pre nádorovú bunku zvládnutie oxidačného stresu predstavuje jednu z dôležitých podmienok prežitia, a z tohto dôvodu inhibítory pentózofosfátového cyklu sú významnými kandidátmi pre využitie vo farmakológii. Príkladom môže byť 6-aminonikotínamid, inhibítor glukózy-6-fosfát dehydrogenázy. Sám o sebe síce žiadny významný efekt voči nádorovým bunkám nevykazuje, ale ak je podávaný v kombinácii s chemoterapiou alebo rádioterapiou zvyšuje citlivosť buniek voči prítínádorovej terapii.

Cieľom pre boj s nádorovým ochorením je rovnako aj mitochondria. Aj keď respirácia prebieha u nádorových buniek s veľmi nízkou intenzitou, je nevyhnutná na udržanie mitochondriového membránového potenciálu a tým aj pre prežitie a delenie bunky. Inhibítory respirácie tak môžu nádorovú bunku ľahko usmrtiť (kým zdravú bunku mierne zníženie respirácie zásadne neovplyvní). Rovnaký efekt je možné dosiahnuť aj pomocou inhibítorov glutaminázy (napríklad BPTES – bis-2-[5-fenylacetamido-1,2,4-tiodiayol-2-yl]etyl sulfid, momentálne sa nachádza v predklinickej fáze výskumu).

Možnosti terapie, ktoré sa v ostatnej dobe tiež dostávajú do popredia, je inhibícia aparátu syntetizujúceho mastné kyseliny. Táto aktivita je v normálnych bunkách a tkanivách veľmi nízka alebo dokonca nezistiteľná. V nádorových bunkách však prebieha zvýšená syntéza mastných kyselín a jej rýchlosť koreluje s prognózou u pacientov s nádorovým ochorením prsníka alebo pankreasu. Dva inhibítory syntézy mastných kyselín, cerulenín a C75, sú testované v klinických skúškach.

Ako vhodný terapeutický cieľ sa tiež ukazujú aj pH regulačné systémy špecifické pre nádorové bunky. Je dokázané, že rýchle zníženie pH vnútorného prostredia bunky vedie k jej smrti. U nádorových buniek by bolo teda možné blokovať špecifické transportéry pre laktát, čo povedie ku zníženiu bunkového pH, ale rovnako aj ku zastaveniu glykolýzy (inhibícia produktom). Rovnako inhibícia transportérov pre hydrogénuhličitanové anióny by mala za následok nerovnováhu pH. Ukazuje sa, že aplikácia týchto dvoch typov inhibítorov síce vedie ku zastaveniu nádorového rastu, ale bohužiaľ nie priamo ku smrti buniek. Použitie ich kombinácie práve s blokátormi glykolýzy a respirácie však bunka prekonáva oveľa ťažšie a myšlienka navodenia tzv. metabolického kolapsu sa dostáva do popredia klinického záujmu.

3.11 POUŽITÁ LITERATÚRA

- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff M., Wehrli S., Thompson, C.B. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Cell*, 2007;104,(49), 19345–19350
- DeBerardinis R.J., Thompson C.B. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell*, 2012;148, (6), 1132–1144
- Budihardjo I. I., D. L. Walker, Svingen P., Buckwalter C., Desnoyers S., Eckdahl S., Shah G.M., Poirier, G.G., Reid, J.M., Ames, M.M, Kaufmann, S.H.. 6-Aminonicotinamide sensitizes human tumor cell lines to cisplatin. *Clinical cancer research* 1998: 4, (1), 117–130
- Chen Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., Huang, P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2007;39, (3), 267–274
- Ferreira, L.M.R. Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology*, 2010;89, (3), 372–380
- Flavin. R. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future oncol.*, 2010: 40, (2), 323–332
- Ganapathy-Kanniappan, S. Vali, M., Kunjithapatham, R., Buijs, M., Syed, L.H., P. P. Rao, S. Ota, B. K. Kwak, R. Loffroy, J. F. Geschwind. 3-bromopyruvate: a new targeted antiglycolytic agent and a promise for cancer therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2010;11, (5), 510–517
- Hamanaka, R.B., Chandel, N.S. Warburg effect and redox balance. *Cell biology*. 2011: 334, (6060), 1219–1220
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009;324, (5930), 1029–1033
- Ho, T.S., Ho, Y.P., Wong W.Y., Chi-Ming Chiu, L. Fatty acid synthase inhibitors cerulenin and C75 retard growth and induce caspase-dependent apoptosis in human melanoma A-375 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2007;61,(9), 578–587
- Hsu, P.P., Sabatini D.M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 2008;134, (5), 703–707
- Key, T.J. Fruit and vegetables and cancer risk. *British journal of cancer*, 2011;104, (1), 6–11
- Kim, J., Dang C.V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer research*, 2006: 66, (18), 8927–8930
- Kim, H.H., Kim, T., Kim, E., Park, J.K. The Mitochondrial Warburg Effect: A Cancer Enigma. *Interdisciplinary Bio Central*, 2009: 1, (2), 1–7
- Kim, K.H., Rodriguez, A.M., Carrico, P.M., Melendez, J.A. Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Antioxidants & redox signaling*, 2001;3, (3), 361–373
- Krebs, H., Dang, C. Energy Boost: The Warburg Effect Returns in a New Theory of Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2004;96, (24), 1805–1806
- Krisner, R.L., Prather, R.S. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Molecular reproduction and development*, 2012;79, (5), 311–320
- Kuhajda, F.P., Pizer, E.S., Li, J.N., Mani, N.S., Frehywot, G.L. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000;97,(7), 3450–3454
- Levine, A.J., Puzio-Kuter, A.M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, 2010: 330, (6009), 1340–1344
- Li, W., Liu, J., Zhao, Y.. PKM2 inhibitor shikonin suppresses TPA-induced mitochondrial malfunction and proliferation of skin epidermal JB6 cells. *Molecular carcinogenesis*, 2012: 11, 1–10
- López-Lázaro, M. The Warburg Effect: Why and How do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen? *Science*, 2008: 8, 305–312
- Markowitz, S.B., Levin, S.M., Miller, A., Morabia, A. Asbestos, Asbestosis, Smoking and Lung Cancer: New Findings from the North American Insulator Cohort. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2013
- Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang P.M. P53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science*, 2006;312, (5780), 1650–1653
- S. Murata, K. Yanagisawa, K. Fukunaga, T. Oda, A. Kobayashi, R. Sasaki, N. Ohkohchi, “Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice,” *Cancer science*, vol. 101, no. 8, pp. 1861–5, Aug. 2010.
- R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 26th ed. 2003, p. 700.

A. Najafov, D. R. Alessi. Uncoupling the Warburg effect from cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 45, pp. 19135–6, Nov. 2010.

E. C. Nakajima, B. Van Houten. Metabolic symbiosis in cancer: Refocusing the Warburg lens. *Molecular carcinogenesis*, no. November, pp. 1–9, Jan. 2012.

H. Pelicano, D. S. Martin, R.-H. Xu, P. Huang. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, vol. 25, no. 34, pp. 4633–46, Aug. 2006.

V. Rottiers and A. M. Näär. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 13, no. 4, pp. 239–50, Apr. 2012.

J. M. Thornburg, K. K. Nelson, B. F. Clem, A. N. Lane, S. Arumugam, A. Simmons, J. W. Eaton, S. Telang, J. Chesney. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, vol. 10, no. 5, p. R84, Jan. 2008.

F. Weinberg, N. S. Chandel. Mitochondrial metabolism and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1177, pp. 66–73, Oct. 2009.

D. R. Wise, C. B. Thompson. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in biochemical sciences*, vol. 35, no. 8, pp. 427–33, Aug. 2010.

N. Wong, J. De Melo, D. Tang. PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *International journal of cell biology*, vol. 2013, no. Figure 1, p. 242513, Jan. 2013.

Y. Zhao, E. B. Butler, M. Tan. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell death & disease*, vol. 4, no. 3, p. e532, Jan. 2013

4 TUMOROVÉ MARKERY

Laboratórne ukazovatele prítomnosti nádorového ochorenia označujeme ako tumorové markery. Ide o molekuly najčastejšie proteínového charakteru, ktoré sú prítomné v organizme v dôsledku vzniku a vývoja malígneho ochorenia. Ak sú prítomné priamo v nádorových bunkách, alebo na ich povrchu hovoríme o bunkových tumorových markeroch. Avšak častejšie sú identifikované v sére alebo v iných telesných tekutinách a vtedy hovoríme o humorálnych tumorových markeroch.

Tumorové markery môžu byť produkované priamo nádorovými bunkami (s nádorom asociované antigény), alebo inými tkanivami ako odpoveď organizmu na rozvoj nádorového ochorenia (indukované nádorové markery).

Monitorovanie – sledovanie priebehu ochorenia – je hlavnou doménou indikácie vyšetrenia nádorových markerov. Analýza ich hladín v krvi je prínosná pre hodnotenie remisie, alebo pri podozrení na reziduálny nádor. Zostup hladín nádorových markerov predstavuje včasné upozornenie na návrat ochorenia. Je vhodné sledovanie kinetiky nádorových markerov a hodnotenie výrazných zmien ešte v rámci referenčného rozsahu.

Vzhľadom k rôznym biologickým polčasom jednotlivých markerov je dôležité správne zvolenie intervalov odberu krvi, aby sa reálne monitoroval efekt terapie a nie cytolytický fenomén. Pri hodnotení dynamiky zmien nádorových markerov vo vzťahu ku klinickému priebehu ochorenia je vhodné dodržiavanie doporučených frekvencií vyšetrení.

4.1 VLASTNOSTI IDEÁLNEHO TUMOROVÉHO MARKERU

Tumorový marker by mal spĺňať niekoľko kritérií, aby mohol byť klinicky čo najlepšie využiteľný:

- **vysoká orgánová špecifickosť** – pozitívna hodnota tumorového markera by mala cielene vypovedať o postihnutí konkrétneho orgánu. Tento predpoklad často nie je splnený;
- **vysoká špecifickosť vzhľadom k malígnemu ochoreniu** – pacienti bez nádorového ochorenia by mali poskytovať negatívny výsledok testu. Tento predpoklad zďaleka neplatí pre väčšinu tumorových markerov. Laboratórny ukazovateľ dáva pozitívny (patologický) výsledok aj u nenádorových ochorení (hlavne zápalových). Na druhej strane väčšina nezhubných príčin vyvoláva len mierne alebo stredné zvýšenie koncentrácie tumorových markerov. Existujú samozrejme aj laboratórne testy, ktoré sú pozitívne u malígnych nádorov, avšak úplne nešpecifické ako následok zápalovej reakcie organizmu;
- **vysoká citlivosť** – ide o schopnosť laboratórneho ukazovateľa preukázať prítomnosť zhubného nádoru v počiatočnom štádiu (T1, event. T2). Veľký počet tumorových markerov

nesplňa ani tento predpoklad a vo vysokom percente sú pozitívne až u veľkých a generalizovaných nádorov. Z tohto dôvodu sa len výnimočne hodia na včasný záchyt nádorového ochorenia. Citlivosť a špecifickosť každého testu neoddeliteľne súvisia; ich pomer závisí aj na hodnote považovanej za hraničnú pre hodnotenie výsledku testu, tzv. „*cut-off value*“, diskriminačná hodnota. Citlivosť je možné zvýšiť kombináciou viacerých tumorových markerov, avšak zvyčajne za cenu nižšej špecifickosti (vyššieho počtu falošne pozitívnych výsledkov);

- **korelácia medzi hodnotou laboratórneho parametra a veľkosťou nádoru** (množstvom nádorových buniek) – koncentrácia tumorového markeru závisí nielen na rozsahu nádoru (*staging*) ale aj na stupni zrelosti jeho buniek (*grading*), ďalej na schopnosti nádoru produkovať tumorový marker a vyplavovať ho do krvi. To je dané stupňom prekrvenia nádoru. Výsledok testu závisí aj od faktorov, ktoré nemajú s nádorom nič spoločné (napr. pokles glomerulárnej filtrácie spôsobuje retenciu nízkomolekulových markerov, ktoré za normálnych podmienok prechádzajú glomerulami napr. β 2-mikroglobulín). V prípade že nastane takáto situácia v priebehu cytostatickej liečby môže nárast ukazovateľa mylne stimulovať progresiu nádoru. Typickým testom ktorý dobre odráža počet nádorových buniek je koncentrácia monoklonálneho imunoglobulínu u pacientov s mnohopočetným myelómom.

4.2 OBLASTI VYUŽITIA NÁDOROVÝCH MARKEROV

- **Screening malígnych nádorov** – na vyhľadávanie nádorového ochorenia u asymptomatických jedincov sa nádorové markery nehodia z dôvodu relatívne nízkej citlivosti a nedostatočnej špecifickosti a to tak vzhľadom k prítomnosti nádoru ako aj k postihnutiu konkrétneho orgánu. Avšak môže byť užitočný na vyšetrovanie rizikových skupín jedincov ohrozených konkrétnym nádorovým ochorením.
- **Diagnostika nádorového ochorenia** – z podobných príčin ako v predchádzajúcom prípade nie sú tumorové markery obvykle vhodné ani na primárnu diagnostiku. Výnimkou je napr. pozitívny nález AFP (α -fetoproteín), ktorý potvrdzuje podozrenie na primárny karcinóm pečene alebo teratóm, alebo NSE (neurón špecifická enoláza) pri podozrení na malobunkový pľúcny karcinóm.
- **Určenie štádia nádoru a jeho prognózy** – vysoké hodnoty tumorového markeru znamenajú pokročilé štádium ochorenia (štádium T3, T4, generalizácia tumoru). Z hľadiska stanovenia prognózy znamenajú tumorové markery ďalší faktor, nezávislý na ostatných obvyklých ukazovateľoch prognózy. Hladina CEA (karcinoembryonálny antigén) má určitú prognostickú

výpoveď u kolorektálneho karcinómu, AFP a hCG (ľudský choriový gonadotropín) u germinatívnych nádorov, β 2-mikroglobulín u mnohopočetného myelómu a pod. Je nevyhnutné si však uvedomiť, že výška hladiny tumorového markeru nezávisí len na veľkosti nádoru, ale aj na iných faktoroch, ktoré nemajú s prognózou nič spoločné.

- **Sledovanie priebehu choroby a efektu terapie** – táto oblasť je pre uplatnenie tumorových markerov najdôležitejšia. Vždy je nevyhnutné stanoviť hladinu tumorového markeru pred liečbou (chirurgickou, rádio- či chemoterapiou). Pokles koncentrácie odráža úspešnosť liečby, je však nutné brať do úvahy polčas rozpadu, ktorý u jednotlivých markerov sa pohybuje v širokom rozmedzí: od niekoľkých hodín (hCG, CEA a iné) až po niekoľko dní (AFP, CA 15-3, CEA atď.). Vzostup koncentrácie tumorového markeru bezprostredne po liečbe môže byť známkou rozpadu nádorových buniek vplyvom účinnej terapie (tzv. „*lysis fenomen*“). Z uvedených dôvodov sa kontrolný odber opakuje o 3 - 4 týždne po zahájení liečby. Nárast koncentrácie tumorového markeru v troch po sebe nasledujúcich odberoch u pacienta bez terapie, aj keď sú výsledky v referenčnom rozmedzí je nutné považovať za podozrenie z recidívy, resp. progresie ochorenia. Počas terapie sa za progresiu považuje nárast o viac ako 25%, ako parciálna remisia pokles viac ako o 50% z pôvodnej hodnoty. Rýchlosť rastu tumoru je možné odhadnúť podľa času za ktorý stúpne koncentrácia tumorového markeru dvojnásobne („*doubling time*“). Uvádza sa, že tumorové markery môžu upozorniť na recidívu až o niekoľko mesiacov skôr ako zobrazovacie techniky. K dispozícii sú odporúčania ako často kontrolovať hladinu tumorových markerov v určitom období po primárnej terapii. K hodnoteniu pravdepodobnosti trvania remisie alebo recidívy ochorenia ako aj vhodných intervalov pre ďalšiu kontrolu sa využívajú expertné programy (napr. CRATES – Cancer Recurrence Analysis, Correlation, Testing and Statistics).

4.3 ONKOFETÁLNE ANTIGÉNY

KARCINOEMBRYONÁLNY ANTIGÉN - CEA

Ide o onkofetálny antigén, silne imunogénny antigén, glykoproteín, ktorý vytvárajú bunky sliznice čreva vo fetálnom období. Patrí do skupiny molekúl, ktoré ovplyvňujú bunkovú adhéziu. Pôvodný predpoklad, že bude dobrým indikátorom karcinómov hrubého čreva sa však úplne nepotvrdil. Nie je dostatočne citlivý (pri 90% špecifickosti je jeho citlivosť na dôkaz recidívy kolorektálneho karcinómu iba 61%) ani špecifický. Zvýšená koncentrácia sa nájde aj u pacientov s karcinómom pľúc, prsníka, pankreasu alebo pohlavných orgánov. Menej výrazné zvýšenie sa objavuje aj pri niektorých

nenádorových ochoreniach ako hepatitída, cirhóza pečene, pankreatitída, zápalové ochorenia hrubého čreva a autoimúnnych ochoreniach. Zvýšené hodnoty sú niekedy pozorované aj u fajčiarov; zvýšenie rizika rozvoja karcinómu pľúc u fajčiarov s porovnaním s fajčiarmi s nízkou hodnotou CEA neboli zatiaľ potvrdené. Je schopný tvoriť komplexy s imunoglobulínmi triedy G a M. Má nepriamy imunosupresívny vplyv na T-lymfocyty. Metabolizuje sa v Kupferových bunkách a následne sa eliminuje v hepatocytoch. Jeho polčas v cirkulácii je závislý na obsahu kyseliny sialovej. Je veľmi heterogénny, bolo popísaných viac ako 36 variant.

ALFA1-FETOPROTEÍN - AFP

Táto bielkovina podobná albumínu je produkovaná vo veľkom množstve bunkami žltkového vaku a pečeňou plodu a prechádza do krvi gravidných žien. Výrazné zmeny jeho koncentrácie v sére počas tehotenstva môžu indikovať fetálne malformácie (Downon syndróm, rázštep neurálnej trubice). U dospelých jedincov je jeho koncentrácia v krvi minimálna. Predpokladá sa vplyv AFP na bunkový rast a diferenciáciu, má aj transportnú funkciu a podieľa sa na udržiavaní onkotického tlaku, kedy nahrádza albumín. Syntéza sa obnovuje v nádoroch, ktoré obsahujú vyššie spomenuté štruktúry. Zvýšená koncentrácia je u 90-95% pacientov s primárnym karcinómom pečene (často nad 2mg.l^{-1}) a u pacientov s malígnym teratómom, obsahujúcim zvyšky žltkového vaku. Zvýšená koncentrácia však býva aj u pacientov s akútnou a chronickou hepatitídou aj keď ide koncentrácie nižšie ako $0,1\text{ mg.l}^{-1}$. Stanovenie AFP má význam pre kontrolu úspešnosti terapie a detekciu recidív uvedených tumorov ako aj pre ich včasný záchyt u pacientov s cirhózou pečene, hlavne ak ide o následok chronickej hepatitídy B alebo C.

4.4 KOMPLEXNÉ GLYKOKONJUGÁTY

Sú to glykoproteíny, alebo glykolipidy, ktoré sú produkované bunkami plodu; preto bývajú zaraďované k onkofetálnym antigénom. Pri ich odhalení sa vychádzalo z predpokladu, že nádorové bunky uvoľňujú do krvného obehu určité antigénne štruktúry, ktoré je možné v krvi dokázať. Homogenátmi zhubných nádorov boli imunizované laboratórne zvieratá a po izolácii vhodných línii imunokompetentných buniek boli pripravené bunkové línie produkujúce monoklonálne protilátky proti glykoproteínovým štruktúram na povrchu nádorových buniek. Tieto protilátky boli následne použité na detekciu tumorových antigénov v sére pacientov. Väčšina týchto antigénov sa označuje písmenami CA (*carbohydrate antigen*) a čísla podľa označenia bunkovej línie, ktoré produkujú príslušnú protilátku. Napriek tomu, že uvedené stanovenia nevykazujú úplnú špecifickosť a citlivosť sú vhodné opäť skôr na kontrolu priebehu ochorenia po liečbe. Je nutné upozorniť, že sety

jednotlivých firiem používajú rôzne monoklonálne protilátky a preto poskytujú u toho istého pacienta mnohokrát výrazne odlišné výsledky. Pri sledovaní priebehu ochorenia nie je teda možné meniť typ setu.

CA 15-3

Patrí medzi markery diferenciačného typu. Je to onkofetálny mucínový glykoproteín bez orgánovej špecificity, ktorý sa používa na posúdenie úspešnosti liečby a včasnej predikcie recidívy u pacientok s karcinómom prsníka. Citlivosť u generalizovaného nádoru je 75%, kým nádoru bez metastáz je pozitívny len u 9% (štádium T1), v 19% (T2) a v 38% (T3). Zvýšené hodnoty sa vyskytujú aj u niektorých ďalších karcinómov (GIT, vaječníky, maternica ale aj iné), mierne zvýšenie sa niekedy pozoruje aj u benígnych ochorení (hepatopatie, endometrióza, mastopatie). Alternatívou stanovenia CA 15-3 je stanovenie antigénu CA 27-29.

CA 19-9

Ide o glykolipid, derivát krvnej skupiny Lewis H. Asi 5 – 10 % populácie tento antigén neprodukuje, chýba enzým fukozyltransferáza. J eliminovaný výhradne žlčou, preto aj mierna cholestáza môže zvýšiť jeho hodnoty v sére nad normu. Najčastejšie je pozitívny u pacientov s karcinómom pankreasu, žalúdka, žlčových ciest a ďalších. Mierne zvýšenie pozorujeme aj u niektorých benígnych ochorení hepatobiliárneho systému a pankreasu.

CA 125

Tento heterogénny glykoproteín s vysokým obsahom sacharidov bol prvý krát identifikovaný na povrchu buniek ovariálneho karcinómu. Toto ochorenie je rovnako aj indikáciou k vyšetreniu; pozitívny CA 125 býva aj u karcinómu maternice, pankreasu, GIT a pľúc. Rovnako niektoré benígne ochorenia vaječníkov, endometria ako aj hepatopatie môžu byť sprevádzané zvýšením jeho koncentrácie. V dospelosti môže byť obmedzene syntetizovaný v normálnom epiteli tkaniva vajcovodov, bronchov, endometria, cervixu, ale aj v mezotele pleury, perikardu a peritonea.

CA 72-4

Antigén CA 72-4 (Tumor – asociovaný antigén, TAG 72) je definovaný ako epitop mucínu reagujúci s dvomi monoklonálnymi protilátkami. Za fyziologického stavu ho produkuje vyvíjajúci sa plod v žalúdku, čreve a pankrease. Pozitívny nález je typický u karcinómu žalúdka, pankreasu, žlčových

ciest, hrubého čreva a niektorých ďalších orgánov. Používa sa na monitorovanie priebehu predovšetkým u karcinómu žalúdka. Jeho hladina koreluje s prítomnosťou vzdialených metastáz.

Uvedené glykoproteínové onkofetálne antigény sú používané najčastejšie ale v ostatnej dobe sa objavujú ďalšie, založené rovnako na dôkaze prítomnosti monoklonálnych protilátok. Mnohé z nich je už možné stanoviť pomocou komerčne dostupných setov. Niektoré z nich spolu s indikáciou na ich stanovenie sú uvedené v tabuľke č.1 .

Tabuľka 1 Glykoproteínové onkogénne antigény

Antigén	Nádorová špecificita
Ca 15-3, CA M26, CA M29	Prsná žľaza
CA 549	Mliečna žľaza, GIT
CA 19-9, CA 72-4, CA 50	Pankreas, GIT
CA 125, CA 54/61, CA 602	Vaječníky
CA 130	Pľúca, vaječníky
CA 242, CA 195	Pankreas, hrubé črevo
CA 170	Adenokarcinómy
CA 174	Dlaždicobunkové karcinómy

4.5 ĎALŠIE TUMOROVÉ MARKERY ONKOFETÁLNEHO CHARAKTERU

CYFRA 21-1

Ide o proteínový fragment proteínu cytokreatínu 19, ktorý sa nachádza vo všetkých bunkách. Najvyššia koncentrácia v sére je u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc. Je vhodný aj na sledovanie priebehu tohto ochorenia a účinku liečby. Pozitívny je aj u karcinómov krčka maternice, močového mechúra a iných. Predpokladá sa, že jeho výskyt v sére pacientov s malígnym ochorením môže súvisieť s apoptózou (bunkovou smrťou) alebo nekrózou.

MCA, MSA A SCCA

MCA (antigén mucinóznych karcinómov) a MSA (mamárny sérový antigén) sú pozitívne hlavne u karcinómu prsníka. SCCA (antigén skvamóznych buniek) je pozitívny v prípade karcinómov tvorených epitelom dlaždicových buniek (dlaždicobunkový karcinóm pľúc, karcinóm krčka maternice).

TATI

TATI (s tumorom asociovaný trypsínový inhibítor) je produkovaný malígnymi bunkami karcinómu GIT a mukóznych cystadenokarcinómov vaječníkov.

4.6 ONKOPLACENTÁRNE ANTIGÉNY

CHORIOVÝ GONADOTROPÍN - HCG (HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN)

Tento syaloglykoproteín hormonálnej povahy je produkováný bunkami trofoblastu a placentou. Stanovuje sa v sére a v moči a používa sa na diagnostiku gravidity (aj mimomaternicovej) a aj ako kritérium pri skríningu vrodených porúch plodu. Hormón tvoria dve podjednotky; α -podjednotky sú spoločné pre všetky glandotrópne hormóny hypofýzy, β -podjednotka je špecifická pre hCG. Často sa preto stanovuje β -hCG namiesto celkového hormónu. Degradácia molekuly hCG sa môže líšiť u rôznych typov nádorov a produkty štiepenia molekuly hormónu majú rôznu imunoreaktivitu, ktorá však závisí na druhu protilátky ktorá sa použije v príslušnom sete. Vysoké hodnoty sú identifikované v moči aj v sére u *mola hydatidosa*; pri jej prechode na choriokarcinóm ďalej narastajú a sú rádovo vyššie ako v gravidite. Senzitivita je v tomto prípade 100%. Vysoká koncentrácia β -hCG je prítomná aj u germinatívnych nádorov u mužov; v 90% prípadov non.seminómov, ale len u 10% seminómov. Stanovovanie hCG má tak diagnostický význam a rovnako sa používa aj v prípade kontroly úspešnosti terapie a k odhaleniu recidívy ochorenia.

Dôležitou úlohou hCG počas tehotenstva je utlmať funkciu T-lymfocytov, a tým podporovať imunitoleranciu matky voči plodu. Podobnú funkciu má pravdepodobne tento hormón aj v nádorových bunkách. Produkcia hCG bola tiež dokázaná aj v bunkách nádorov iných orgánov; je prejavom výraznej nádorovej dediferenciácie a útľmu obrannej imunitnej reakcie organizmu voči nádorovým bunkám. Produkciu hCG môžeme považovať za známku malignity a potenciálnej tvorby metastáz.

BETA1 ŠPECIFICKÝ TEHOTENSKÝ GLYKOPROTEÍN - SP-1

Táto zmes glykoproteínov je produkováaná tiež bunkami trofoblastu a placentou. V sére je prítomný za rovnakých okolností ako hCG, ale jeho stanovenie je menej bežné.

4.7 PROLIFERAČNÉ TUMOROVÉ MARKERY

TKANIVOVÝ POLYPEPTIDOVÝ ANTIGÉN – TPA, TPS

TPA môže byť prítomný takmer vo všetkých bunkách epitelového pôvodu. Je to zmes fragmentov cytokeratínov rôzneho typu, ktoré sa podieľajú na tvorbe intermediárnych filamentov normálnych a malígnych buniek. TPA nie je špecifickým indikátorom určitého nádoru ale skôr ukazovateľom bunkovej proliferácie. To znamená, že v tomto prípade prevažuje citlivosť nad špecifickosťou. Z tohto dôvodu je zvýšený u mnohých rýchlo rastúcich zhubných nádorov (karcinóm

prsníka, kolorektálny karcinóm, karcinóm močového mechúra, vaječníkov alebo krčka maternice). Zvýšené hodnoty sa vyskytujú aj u proliferácii nenádorového pôvodu, napr. u zápalových ochorení pľúc, pečene alebo urogenitálnych orgánov. V prípade účinnej terapie a zastavení bunkovej proliferácie koncentrácia TPA rýchlo klesá; tento pokles je oveľa výraznejší ako u iných tzv. markerov diferenciačného typu.

K ďalším fragmentom keratínu patrí tzv. špecifický TPA (TPS) s rovnakým využitím ako v prípade TPA. K markerom proliferácie patrí aj tymidínkináza (TK) ktorá je podrobnejšie popísaná pri enzýmových tumorových markerov.

4.8 ENZÝMY

PROSTATICKÝ ŠPECIFICKÝ ANTIGÉN - PSA

PSA je serínová proteáza, produkovaná bunkami prostaty. Jeho funkcia ešte stále nie je úplne objasnená; pravdepodobne sa podieľa na hydrolýze proteínov ejakulátu. Určité množstvo PSA je možné identifikovať aj v sére, kde sa vyskytuje hlavne viazaný na inhibítory proteáz (α_2 -makroglobulín a predovšetkým α_1 -antichymotrypsín), voľná je iba malá časť. Zvýšená koncentrácia PSA je identifikovaná u pacientov s karcinómom prostaty. Zvýšené hodnoty majú aj pacienti s benígnou hyperpláziou prostaty a podobný nález môže spôsobiť aj palpácia prostaty pri vyšetrení *per rectum*, katetrizácii močového mechúra a dokonca aj pri dlhšej jazde na bicykli. Ak vylúčime posledné uvedené príčiny, zostáva odlíšiť karcinóm prostaty od benígnej hyperplázie.

Špecifickosť stanovenia PSA vzhľadom k malígnemu ochoreniu výrazne zvýšilo zavedenie ďalších kritérií:

- stanovenie referenčných hodnôt podľa veku (hodnota *cut-off* narastá s vekom);
- stanovenie tzv. denzity PSA, t.j. vzťahnutie kvantity PSA k objemu prostaty, čo sa určuje pomocou transrektálnej ultrasonografie;
- stanovenie rýchlosti rastu koncentrácie PSA v sére; tak denzita PSA ako aj rýchlosť rastu jeho koncentrácie je vyššia u pacientov s karcinómom;
- pri hranične koncentrácii $4-10\mu\text{g.l}^{-1}$ sa stanovuje pomer voľného a celkového PSA (free/total PSA); bolo zistené, že u pacientov s karcinómom sa podiel voľnej frakcie znižuje. Pri pomere $>25\%$ je pravdepodobnosť karcinómu menší ako 10%, ak je pomer $<10\%$, narastá pravdepodobnosť karcinómu nad 80%.

Niektorí autori odporúčajú skrining karcinómu prostaty pomocou stanovenia PSA u všetkých mužov starších ako 50 rokov. Aj keď je histologická prevalencia tohto ochorenia vysoká (ložiská

karcinómu v prostate sú nájdené u 25% mužov nad 60 rokov a u všetkých mužov starších ako 80 rokov, nakoľko ide o najčastejší nádor u mužov), je klinická prevalencia omnoho nižšia, pretože v mnohých prípadoch je klinicky bez výraznejšej progresie. Nakoľko radikálna liečba (prostatektómia) prináša mnoho komplikácií je racionálnejšie hľadať nie marker prítomnosti karcinómu, ale ukazovateľ jeho biologického potenciálu, to znamená tendenciu k progresii a generalizácii.

PROSTATICÁ KYSLÁ FOSFATÁZA - PACP

Stanovuje sa ako tartarát – nestabilná frakcia ACP alebo imunohistochemicky. Aj keď ide o iný typ proteínu ako v prípade PSA, indikácie na vyšetrenie sú rovnaké. Citlivosť v porovnaní s PSA je však horšia a výrazné zvýšenie je len u pacientov s generalizovaným karcinómom prostaty.

TYMIDÍNKINÁZA - TK

TK je enzým, ktorý katalyzuje priamu fosforyláciu tymidínu na tymidínmonofosfát. Ide o vedľajšiu cestu syntézy DNA; hlavnou cestou je premena dUMP na TMP, ktorá vyžaduje prítomnosť vitamínu B₁₂. Aktivita TK v bunke stúpa v S-fáze bunkového cyklu, kedy dochádza k syntéze DNA. Jej aktivita v sére odráža mieru bunkovej proliferácie. Z tohto dôvodu zvýšená aktivita je nielen u nádorových novotvarov (karcinóm prsníka, pľúc, kolorektálneho karcinómu, lymfómy, leukémie, mnohopočetný myelóm), ale aj u niektorých vírusových ochorení (predovšetkým u herpes vírusov, HIV a pod.) ako aj u niektorých zápalových ochoreniach pľúc a u psoriázy. Pretože normálna cesta syntézy DNA je blokovaná niektorými cytostatikami (analógy purínových báz, ako metotrexát alebo 5-fluorouracil), je v týchto prípadoch aktivovaná náhradná cesta a výrazne stúpa aktivita TK v sére. Z tohto dôvodu je nutné stanovovať aktivitu TK vždy pred zahájením cytostatickej terapie. Ďalšou príčinou zvýšenej aktivity TK je deficit vitamínu B₁₂.

NEURÓN-ŠPECIFICKÁ ENOLÁZA - NSE

NSE je izoenzým enolázy (2-fosfo-D-glycerát hydroláza), enzýmu glykolytickej dráhy, špecifický pre nervové tkanivo. Za fyziologického stavu ju produkuje nervové a pľúcne tkanivo plodu, v dospelosti je jeho výskyt v normálnom stave viazané predovšetkým na neuróny. Zvýšená aktivita v sére je prítomná u niektorých mozgových nádorov, hlavne neuroblastómoch a ďalších malígnych nádorov neuroektodermálneho pôvodu (malobunkový karcinóm pľúc, karcinoid, feochromocytóm a iné). Využíva sa pri kontrole liečby pacientov s neuroblastómom a malobunkovým karcinómom pľúc; na diagnostiku je málo citlivý. Výsledok však môže byť výrazne ovplyvnený hemolýzou, kedy dochádza k uvoľneniu enolázy z erytrocytov.

ALKALICKÁ FOSFATÁZA - ALP

Kostný izoenzým je zvýšený u osteosarkómu a u osteoplastických metastáz do kostí, ale rovnako aj u iných ochorení kostí. Pečeňový izoenzým býva u metastatického postihnutia pečene; súčasne je zvýšená aktivita aj GMT a AST. Podobný nález je aj v prípade nenádorových hepatopatií napr. u aktívnej cirhózy pečene. Niektoré nádory (GIT, pľúca) produkujú atypickú ALP, ktorá sa svojimi vlastnosťami podobá placentárnemu izoenzýmu.

LAKTÁTDEHYDROGENÁZA - LD

Posledný enzým anaeróbnej glykolýzy LD býva zvýšená u mnohých nádorov, nakoľko nádorové bunky získavajú energiu práve týmto spôsobom. Ide však o značne nešpecifický a neskorý ukazovateľ. Vysoká aktivita LD vo výpotku je predpokladom na podozrenie jeho malígneho pôvodu.

KATEPSÍN D

Je to intracelulárna proteáza, uplatňujúca sa pri degradácii bazálnej membrány čím je umožnený invazívny rast a metastázovanie nádorov; jeho stanovenie v cytosóle buniek mliečnej žľazy má prognostický význam. V podstate patrí medzi bunkové tumorové markery.

TUMOR M2-PK

Izoenzým pyruvátkinázy patrí medzi kľúčové enzýmy glykolýzy. Nádorový izoenzým existuje ako homodimér na rozdiel od nemalígnych foriem, ktoré tvoria homotetraméry. Pre stanovenie je nutné použiť EDTA alebo citrátovú plazmu z dôvodu možného uvoľnenia tohto izoenzýmu z lymfocytov. Ide o nový marker o ktorého použití je možné uvažovať u takých lokalizáciách ochorenia, kde nie sú iné vhodné solubilné markery k dispozícii. Tumor M2- pyruvátkináza bola nájdená u pacientov s karcinómom testes, obličiek, pľúc, prsníka, pankreasu a hrubého čreva. Príčinami zvýšenej hladiny v sére sú zápalové ochorenia, vírusové infekcie alebo poruchy obličiek.

4.9 HORMÓNY A ICH METABOLITY

Nádory endokrinných žliaz sa môžu prejaviť zvýšenou produkciou hormónu a klinickými príznakmi hyperfunkcie žľazy. Tieto parametre však nie sú vhodné k odlíšeniu malígneho adenokarcinómu od benígneho adenómu alebo hyperplázie. Stanovenie hormónov má význam pri podozrení na karcinóm mliečnej žľazy. U papilárneho alebo folikulárneho karcinómu býva

v sére zvýšená hladina tyreoglobulínu (TG), pri podozrení na medulárny karcinóm (autozomálne dominantne dedičné ochorenie) hľadáme zvýšenú hladinu kalcitonínu.

Nádorová dediferenciácia sa niekedy môže prejavíť tvorbou hormónov aj v bunkách nádorov neendokrinného pôvodu – hovoríme o tzv. ektopickej produkcii hormónov. Takýto typ nádoru má vždy horšiu prognózu, pretože je to prejav väčšej dediferenciácie a teda aj malignity. Najtypickejším príkladom je produkcia ACTH malobunkovým karcinómom pľúc. Niekedy môže nádorová bunka produkovať prolaktín, antidiuretín alebo iný hormón; ich tvorba sa prejaví rovnako ako hyperfunkcia príslušnej endokrinnéj žľazy a je súčasťou tzv. paraneoplastického syndrómu.

Niekedy sa stanovujú metabolity hormónov v moči. U nádorov, ktoré produkujú katecholamíny (feochromocytóm) býva zvýšený ich hlavný odpadový produkt kyselina vanilmandlová (VMK, VMA). Niekedy sa odporúča urobiť diferenciáciu jednotlivých katecholamínov (adrenalín, noradrenalín, dopamín), ktorých podiel sa líši podľa typu nádoru pochádzajúceho zo sympatických ganglií alebo kôry nadobličiek (feochromocytóm, feochromoblastóm, neuroblastóm). Hlavným príznakom týchto nádorov je hypertenzia záchvatovitého typu. Aj sekrécia katecholamínov nádorovými bunkami kolíše a odporúča sa opakovať vyšetrenie, najlepšie po záchvate hypertenzie. U karcinoidov, ktorých bunky vytvárajú serotonín, je v moči prítomná vysoká koncentrácia jeho metabolitu – kyseliny 5-hydroxyindolactovej (HIOK, HIOA).

4.10 SÉROVÉ PROTEÍNY

Niektoré sérové proteíny sú produkované priamo nádorovými bunkami, inokedy prítomnosť nádoru a jeho rast vyvolá reakcia organizmu, ktorá sa prejaví zmenou koncentrácie sérových proteínov. Tieto zmeny sú však veľmi málo špecifické a rovnako aj citlivosť je pomerne nízka. Prítomnosť zmien nás však núti v diferenciálnej diagnostických úvahách k predpokladaniu prítomnosti zhubného novotvaru.

BETA2-MIKROGLOBULÍN - B2-M

Tento glykoproteín nízkej molekulovej hmotnosti je súčasťou histokompatibilných antigénov (HLA) na povrchu buniek. Vyskytuje sa na povrchu všetkých jadrových buniek, vysoká hustota je hlavne na povrchu lymfocytov. Najvyššiu koncentráciu v sére nachádzame u nádorov odvodených od lymfocytov a plazmocytov (lymfómy, chronická lymfatická leukémia, mnohopočetný myelóm); β_2 -M je vytváraný priamo nádorovými bunkami. Je vhodný na sledovanie účinku terapie, v prípade mnohopočetného myelómu má aj prognostický význam – pacienti z jeho zvýšenou

koncentráciou majú niekoľkonásobne kratšiu dobu prežívania ako pacienti s normálnou hladinou tohto proteínu. Vzhľadom k tomu, že ide o mikroproteín, β_2 -M je zdravým glomerulom filtrovaný do moču, odkiaľ je takmer kompletne vstrebaný bunkami proximálneho tubulu obličiek. Zvýšenú koncentráciu v sére teda vyvoláva každý pokles glomerulárnej filtrácie, kým zvýšený odpad močom je ukazovateľom tubulárnej lézie.

FERITÍN

Feritín je vysokomolekulový proteín, ktorý slúži ako zásobáreň železa v črevnej sliznici a kostnej dreni. Zvýšená syntéza je indukovaná nedostatkom železa v organizme. Bunky niektorých nádorov, predovšetkým pri akútnej myeloblastickej leukémii, Hodgkinovom lymfogranulóme, lymfogranulóme a mnohopočetnom myelóme je produkován feritín, ktorého molekula má kyslejší charakter (kyslý izoferitín) a je ho možné dokázať v sére. Menej často je feritín zvýšený u niektorých solídnych tumorov (karcinóm prsníka, pľúc, vaječníkov, kolorektálny karcinóm).

4.11 MONOKLONÁLNE IMUNOGLOBULÍNY

Monoklonálne gamapatie sú spôsobené klonálnou proliferáciou buniek schopných produkovať imunoglobulíny, teda B-lymfocyty, resp. plazmocyty. Výsledkom je produkcia monoklonálneho imunoglobulínu, ktorý sa dá stanoviť vysoko rozlišovacou elektroforézou ako tzv. M-komponenty (alebo paraproteín). Nádorové bunky produkujú okrem monoklonálneho imunoglobulínu aj β_2 -mikroglobulín a cytokíny, predovšetkým interleukín 6 (IL-6). Klinické príznaky ochorenia:

- proliferácia klonu nádorových buniek (dochádza k úbytku iných buniek, následnej anémii a poruche imunity);
- pôsobenie cytokínov na okolie (vyvolávajúce napr. lytické zmeny v kostiach);
- biologický efekt M-komponentov (hyperviskozita krvi a pod.).

Typickou malígnou monoklonálnou gamapatiou je mnohopočetný myelóm. Toto ochorenie je sprevádzané anémiou, kostnými defektami, poruchami imunity a často renálnou insuficienciou. Produkcia IL-6 malígnymi plazmocytmi v kostnej dreni má za následok nielen kostnú deštrukciu ale aj zvýšenú produkciu proteínov akútnej fázy (C-reaktívny proteín, α_1 -antitrypsín), ktoré spolu s β_2 -mikroglobulínom majú prognostický význam. Ďalšími príčinami nálezu M-komponentov v sére môže byť solitárny plazmocytóm (kostný aj extramedulárny) a lymfoproliferatívne ochorenia –

Waldenströмова makroglobulinémia (s tvorbou monoklonálneho IgM) a choroba ťažkých reťazcov (*heavy-chain disease*), kedy sa v sére objavujú voľné ťažké reťazce monoklonálneho imunoglobulínu. Variantmi mnohopočetného myelómu je plazmocytárna leukémia a tzv. „tlejúci“ (*smoldering*) myelóm, kedy nachádzame atypické plazmocyty v kostnej dreni a M-komponenty v plazme, ale chýbajú ostatné príznaky, ako anémia alebo renálna insuficiencia; ochorenie je dlhodobo stabilizované.

Prítomnosť monoklonálneho imunoglobulínu sa môže prejavíť kryoglobulinémiou, amyloidózou, Fanconiho tubulárnym syndrómom, polyneuropatiou, poruchami koagulácie alebo nálezom chladových aglutinínov. Vysoká koncentrácia monoklonálneho IgM pri Waldenströmovej makroglobulinémii vyvolá príznaky zhoršenia periférnej cirkulácie ako súčasť tzv. hyperviskozitného syndrómu.

Diagnóza monoklonálnej gamapatie vyžaduje dôkaz M-komponentov – imunoglobulínov len s jedným typom ľahkých reťazcov v molekule. K tomuto účelu slúži vysoko rozlišovacia elektroforéza s následnou imunofixáciou. Aj určenie triedy monoklonálneho imunoglobulínu má svoj význam: je rozdiel v biologickom polčase rozpadu IgG a IgA a v rýchlosti množenia buniek produkujúcich tieto imunoglobulíny. Pri rovnakej koncentrácii M-komponentov má pacient s paraproteínom IgA horšiu prognózu ako v prípade monoklonálneho IgG. Nález voľných ľahkých reťazcov imunoglobulínov je odrazom nádorovej dediferenciácie, a teda aj horšia prognóza. Ľahké reťazce pre svoju malú molekulu ľahko prenikajú glomerulom; ich koncentrácia v sére býva preto veľmi nízka a stanovuje sa v moči ako tzv. Bence-Jonesova bielkovina. V moči však často možno nájsť aj celú molekulu monoklonálneho imunoglobulínu. Horšiu prognózu majú aj pacienti u ktorých došlo k strate polyklonálnych γ -globulínov a teda aj normálne protilátky.

Pre prognózu pacienta je dôležitá kvantifikácia M-komponentov. Koncentráciu monoklonálneho imunoglobulínu je možné odhadnúť denzitometricky z elektroforeogramu alebo imunochemicky; ani jedna z metód nie je bez nedostatkov. U niektorých pacientov sa nájde aj viac M-komponentov; došlo u nich k malígnemu zvratu a klonálnej proliferácii dvoch alebo viacerých radov plazmocytov (bi-, tri-, alebo oligoklonálne hyperimmunoglobulinémie). Tento obraz pri elektroforéze môže byť však niekedy spôsobený aj prítomnosťou cirkulujúcich imunokomplexov.

Nakoniec netreba zabudnúť na skupinu zvyčajne starších pacientov u ktorých pretrváva nízka koncentrácia M-komponentov niekoľko rokov bez toho aby došlo k rozvoju ochorenia. Pre stanovenie diagnózy tzv. benígnej monoklonálnej gamapatie je nutné aby boli splnené nasledujúce kritériá:

- koncentrácia M-komponentov $< 35 \text{ g.l}^{-1}$ (IgG) alebo $< 20 \text{ g.l}^{-1}$ (IgA),
- Bence- Jonesova bielkovina v moči negatívna,
- žiadne zmeny na skelete,

- plazmocyty v kostnej dreni < 10%,
- neprítomnosť anémie, hyperkalcémie ani renálnej insuficiencie,
- zachovaná normálna koncentrácia polyklonálnych Ig,
- β_2 -mikroglobulín, CRP, α_1 -antitrypsín, tymidínkináza v referenčných intervaloch,
- zvyčajne starší pacienti (> 60 rokov).

Stále sa častejšie využíva označenie monoklonálna gamapatia neurčeného pôvodu (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS). Bolo zistené, že ochorenie prechádza až v 40% po desiatkach rokov kľudovej fázy do mnohopočetného myelómu alebo lymfoproliferatívneho ochorenia; pretože tento syndróm sa vyskytuje u starších pacientov je možné že jeho rozvoju zabráni úmrtie jedinca na iné ochorenie.

4.12 CÍRKULUJÚCE IMUNOKOMPLEXY (CIK, CIC)

Tieto komplexy antigénov s protilátkami dokázanými v telesných tekutinách sú typické hlavne pre autoimúnne ochorenia, chronické hepatopatie ale pomerne často sprevádzajú aj malígne nádory rôznej lokalizácie. Identifikujú sa v dôsledku reakcie organizmu na antigény uvoľňované do krvného obehu priamo z nádorových buniek alebo antigény, ktoré majú pôvod v zápalovej reakcii v okolí nádoru. Stanovenie CIK nemá veľký význam, výhrady sú aj k špecifickosti metód používaných na stanovenie CIK, predovšetkým ku najjednoduchšej a preto k najčastejšie používanej metóde a to k precipitácii polyetylén glykolom.

4.13 PROTEÍNY AKÚTNEJ ZÁPALOVEJ FÁZY

Patria medzi ne predovšetkým nasledujúce proteíny: α_1 -antitrypsín, kyslý α_1 -glykoproteín, haptoglobín, C-reaktívny proteín a fibrinogén. Ich zvýšená produkcia je prejavom zápalovej reakcie organizmu na prítomnosť rýchlo rastúceho nádoru, ide teda o úplne nešpecifické ukazovatele. Spôsobujú zmeny v elektroforéze, popisované ako typ akútneho zápalu (zvýšenie α_1 - a α_2 -globulínov a tiež často β_2 -globulínov). Zvýšená hodnota fibrinogénu je hlavnou príčinou zvýšenej sedimentácie erytrocytov. Iné proteíny označované niekedy ako negatívne reaktanty akútnej fázy zápalu, sa v tejto situácii prejavujú poklesom koncentrácie v sére (prealbumín, albumín, transferín).

4.14 ĎALŠIE UKAZOVATELE MALÍGNYCH OCHORENÍ

KYSELINA SIALOVÁ

K tumorovým markerom možno zaradiť aj kyselinu sialovú, ktorej koncentrácia v sére u mnohých nádorových ochorení stúpa. Je súčasťou molekúl glykoproteínov - proteínov akútnej zápalovej fázy. Niekedy sa stanovuje kyselina sialová viazaná na lipidy (LASA), ktorá je pre nádory špecifickejšia ako celková kyselina sialová.

MELANOGENY

Pacienti s malígnym melanómom vylučujú močom prekurzory kožného pigmentu melanínu – melanogény. Pozitívny nález však pozorujeme zvyčajne až u generalizovaného nádoru.

PROTEÍN S 100 BETA

Bunky melanómu produkujú aj proteín S 100B, ktorý patrí do rodiny vnútrobunkových proteínov schopných viazať vápnik a uplatňujúcich sa pri regulácii rastu a diferenciácii buniek. Je konštitučnou súčasťou cytoplazmy astrocytov v nervovom tkanive. Koncentráciu proteínu S 100B v sére je možné použiť v prípade malígneho melanómu ako prognostický ukazovateľ.

OKULTNÉ KRVÁCANIE – OK

Má význam pre včasný záchyt u pacientov s kolorektálnym karcinómom. Ako okultné krvácanie je označovaný chemický dôkaz krvi v stolici pri jej normálnom makroskopickom vzhľade. Na dôkaz existujú tri metódy:

- Guajakové testy (g-FOBT) chemický dôkaz hemoglobínu, založený na peroxidázovej aktivite hemu. Výsledok môže byť ovplyvnený prítomnosťou iných oxidačných látok, ako aj hemoglobínu z potravy. Je preto dôležité aby pacient tri dni pred vyšetrením vynechal všetky potraviny obsahujúce krv a preparáty železa, pretože by mohli poskytnúť falošne pozitívny výsledok. Avšak tieto testy vykazujú nízku senzitivitu, len 30%.
- Imunochemické testy (i-FOBT) sú založené na detekcii globínovej časti hemoglobínu monoklonálnou protilátkou, čo vylučuje možnosť ovplyvnenia iným zdrojom hemoglobínu (z potravy). V tomto prípade nie je potrebné držať diétu, avšak vyšetrenie je finančne náročnejšie. Tieto testy majú takmer 2-násobnú citlivosť – 60%, oproti guajakovým testom, avšak vykazujú veľmi vysokú falošnú pozitivitu dosahujúcu až 25%, čo znamená že ich špecificita je nízka.

- Kvantitatívne stanovenie ľudského hemoglobínu (qi-FOBT) je najnovšou metódou detekcie okultného krvácania. Táto 3. generácia FOB testov predstavuje kvantitatívnu analýzu hemoglobínu vo vzorke stolice pomocou automatických analyzátorov. Ide o imunochemickú, aglutinačnú reakciu s polyklonálnym antigénom k proteínu ľudského hemoglobínu typu A₀. Pri tejto metóde je možné zabezpečiť až 83% senzitivitu pri súčasnej špecificite 97%.

Pozitívny výsledok testu spôsobuje krvácanie akéhokoľvek pôvodu (ďasná, duodenálny vred, hemoroidy, pri predávkovaní antikoagulantami, po podávaní nesteroidných antireumatík a iné); najväčší význam má však práve pre včasné odhalenie kolorektálneho karcinómu, kedy mikroskopické krvácanie môže byť dlho jediným príznakom tohto ochorenia. U imunochemickej metódy menej prekáža krvácanie z hornej časti tráviacej trubice (globín je degradovaný proteázami v tenkom čreve). Imunochemické testy sú podstatne jednoduchšie pre pacienta aj lekára. S výnimkou potreby vysadenia kyseliny acetylsalicylovej a antikoagulačnej terapie nie je potrebná žiadna diéta. Jednoduchší je tiež odber vzorky zo stolice, keďže odberová tyčinka sa zapichuje trikrát do stolice a vkladá sa do predplnenej odberovej nádoby. Skladovanie odobranej vzorky je možné až tri dni pri izbovej teplote. Odčítanie výsledku je prehľadné a zrozumiteľné.

V SR má štandardne pacient po 50. roku života nárok na test 1-krát ročne za 24 mesiacov, v prípade pozitívnej anamnézy 1-krát ročne, aj pred dovŕšením 50. roku života. U pacientov pred 50. rokom života zdravotné poisťovne vyžadujú odoslanie vyplneného formulára o výsledku vyšetrenia

4.15 BUNKOVÉ TUMOROVÉ MARKERY

Bunkové tumorové markery sú komponenty bunkových membrán alebo iných organel, typických pre nádorovú bunku alebo majúci význam pre diagnostiku a terapiu nádorových ochorení. Neuvoľňujú sa do krvného obehu a preto sa musia stanovovať v bunkových homogenátoch alebo *in situ*.

Patria sem napr. hormonálne receptory pri karcinóme prsníka. Identifikujú sa v homogenáte nádorového tkaniva alebo imunohistochemicky. Nález receptorov estrogénov a progesterónu je znakom zvýšenej diferenciácie nádorových buniek a vypovedá o ich senzitivite k hormonálnej liečbe.

V cytosóle buniek je možné identifikovať aj niektoré tumorové markery stanovené v sére (TPS, TPA, TK) alebo enzým katepsín D, nejde však o bežné vyšetrenia.

Ďalšie zmeny sa týkajú genetickej výbavy buniek. Už dlho je známa prítomnosť tzv. filadelfského chromozómu v bunkách chronickej myeloidnej leukémie. V ostatnom čase sa stále častejšie stretávame s onkogénmi (resp. protoonkogénmi) a tumorsupresorovými génmi. Protoonkogény sú súčasťou genómu zdravej bunky, kde boli vnesené vírusmi alebo boli v genóme

normálne prítomné. Ich aktivácia, spôsobená napr. bodovou mutáciou, amplifikáciou, translokáciou alebo inverziou vedie k ich premene na onkogénny. Produkty onkogénov sú látky proteínovej povahy, ktoré pôsobia ako rastové faktory. Ich pôsobenie môže mať za následok premenu normálnej buky na bunku nádorovú. Najznámejšími protoonkogénmi sú ras, myc, mdm2, bca1 alebo bca2.

Tumor supresorové gény (antionkogény) naopak kontrolujú rast buniek. Najznámejší z nich je p53; ktorý indukuje apoptózu buniek. Mutácia tohto génu, alebo jeho vyradenie z funkcie sa prejavuje rozvojom karcinogenézy. K tomu môže dôjsť napr. naviazaním produktu onkogénu alebo bielkoviny tvorenej bunkami infikovanými niektorými vírusmi.

Gény kódujúce enzýmy uskutočňujúce „opravy“ porušenej štruktúry DNA môžu tiež podliehať mutáciám; tieto tzv. „DNA mismatch repair genes“ napr. hMSH₂, hMLH₁ a ďalšie bolo identifikované u pacientov s kolorektálnym karcinómom, karcinómom pľúc ako aj u iných malígnych ochorení.

Aj keď vyššie uvedené gény sú typickými bunkovými tumorovými markermi, existujú práce, ktoré dokladujú ich včasný záchyt v krvi alebo iných telesných tekutinách. Takto bol mutovaný gén p53 nájdený v moči pacientov s karcinómom močového mechúra, mutovaný gén ras v stolici pacientov s kolorektálnym karcinómom a pankreasu a obidva tieto gény v spúte pacientov s pľúcnymi karcinómami, a to mnohokrát roky pred klinickou manifestáciou. Problém pre praktické využitie predstavuje nízka citlivosť vyšetrenia a hlavne veľké množstvo rôznych mutácií onkogénov.

4.16 CIRKULUJÚCE NÁDOROVÉ BUNKY (CTC)

Diagnostické a prognostické údaje z periférnej krvi o nádorových ochorení, môžeme získať analýzou molekúl, ktoré sú vo vzťahu k nádorovým bunkám, či už sú nimi priamo produkované, uvoľňujúce sa pri ich rozpade alebo ich produkciu stimulujú. Samozrejme najväčší diagnostický potenciál má analýza nádorových buniek samotných. Tak je tomu napríklad v prípade leukemických ochorení, kedy sa leukemické bunky nachádzajú priamo v periférnej krvi. U solídnych nádorov sa nádorové bunky môžu do krvného obehu dostávať cestou lymfogénneho alebo hematogénneho metastázovania.

Od 90-tych rokov sú cirkulujúce nádorové bunky predmetom intenzívneho výskumu. Napriek tomu, dodnes nie sú naše znalosti o CTC také, aby ich diagnostika v klinickej praxi pomáhala pacientom. Naopak dochádza k paradoxnej situácii, čím je vedomostí o CTC viac, tým sa vynára viac otázok.

Aký prínos pre liečbu pacientov s onkologickým ochorením sa od diagnostiky CTC očakáva? Detegovať cirkulujúce nádorové bunky by pomohlo hlavne na včasnú detekciu relapsu nádorového ochorenia, jeho rizika a ďalej pri voľbe protinádorovej terapie.

V súčasnej dobe je už dokázané, že u pacientov so solídnymi nádormi epiteliálneho pôvodu sa v periférnej krvi môžu nachádzať cirkulujúce bunky s vlastnosťami nádorových buniek. Vyskytujú sa tak u pacientov s lokalizovanými nádormi, ako aj s metastatickým postihnutím. Počet CTC je vo vzťahu k prognóze nádorového ochorenia. Zníženie počtu CTC po podanej chemoterapii je vo vzťahu k odpovedi na liečbu. Zatiaľ nie sú presné informácie o dĺžke prežívania CTC. Zistené však je, že nie všetky izolované CTC u toho istého pacienta majú rovnaký fenotyp, zostáva teda otázka ako identifikovať tie s "metastatickým potenciálom".

U pacientov so solídnymi nádormi sa nádorové bunky môžu nachádzať v periférnej krvi a lymfatických uzlinách. Z pohľadu diagnostiky je periférna krv dostupná pri pravidelnej kontrole pacienta.

Prítomnosť nádorových buniek môžeme zistiť v periférnej krvi alebo lymfatických uzlinách nepriamo, detekciou voľných nukleových kyselín (DNA, RNA) alebo priamo, detekciou nádorových buniek ako takých. Pri detekcii voľných nukleových kyselín sa predpokladá, že pochádzajú buď z rozpadnutých nádorových buniek, alebo sa uvoľnia do izolovaného materiálu z cirkulujúcich nádorových buniek. Následne sa izolujú nukleové kyseliny a detegujú sa špecifické mutácie v DNA (napr. mutácie génu K-ras), alebo sa stanovuje expresia génov, ktoré sú charakteristické pre nádorové bunky a to na úrovni RNA metódou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (RT qPCR).

Prínos stanovenia CTC by mal byť prínosom pre prognózu a sledovanie liečby pacientov s karcinómom prsníka, kolorekta a karcinómom prostaty. Rutinnému použitiu okrem iného však bráni absencia veľkých klinických štúdií, nemožnosť porovnania štúdií uskutočnených za použitia rôznych izolačných metód a do istej miery aj cena týchto vyšetrení.

4.17 TUMOROVÉ MARKERY Z ORGÁNOVÉHO HLÁDISKA

V predchádzajúcich kapitolách bola pozornosť venovaná tumorovým markerom, ich pôvodu a významu. Často je však predmetom záujmu, aké vyšetrenia je vhodné ordinovať pri podozrení na nádor určitého orgánu. Podľa citlivosti (percenta pozitívnych nálezov u jednotlivých typov nádorov) tumorové markery zvyčajne rozdeľujeme na:

- základné (najcitlivejšie; stanovujú sa ako prvé),
- doplnkové (citlivosť je menšia, avšak pri súbežnom stanovení základných markerov dosiahneme zvýšenú citlivosť).

Problematika je o to zložitejšia, že niektoré orgány môže postihnúť nádorové ochorenie rôzneho pôvodu, a teda sprevádzané pozitivitou úplne odlišných tumorových markerov. U jednotlivých typov ešte záleží aj na stupni zrelosti nádorových buniek. Záverom je nutné opäť zdôrazniť, že tumorové markery majú obmedzenú indikáciu a nadmerné požiadavky na ich stanovenia vedú často k plytvaniu a nie k zlepšeniu starostlivosti o pacienta.

4.18 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alexiou, D., Karayiannakis, A.J., Syrigos, K.N., Zbar, A., Kremmyda, A., Bramis, I., Tsigris, C. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer*, 2001, Dec, 37(18), p. 2392-2397.
- Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer*. 1993 Jul;68(1):122-4.
- Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer *Clin Biochem*. 2004 Jul;37(7):541-
- Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, Haglund C, Holubec VL, Klapdor R, Nicolini A, Topolcan O, Heinemann V. Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol*. 2010 Mar;21(3):441-7. Epub 2009 Aug 18. Review. PubMed PMID: 19690057.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003 Apr;39(6):718-27. Review.
- Duffy MJ. Evidence for the clinical use of tumour markers *Ann Clin Biochem*. 2004 Sep;41(Pt 5):370-7.
- Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*. 2004;10(1):39-49. Review
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast Jr., R.C., 2007. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 25, 5287e5312, .
- Holdenrieder S, Stieber P, Liska V, Treska V, Topolcan O, Dreslerova J, Matejka VM, Finek J, Holubec L. Cytokeratin serum biomarkers in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2012 May;32(5):1971-6.
- Holubec, L., Jr., Topolčan, O., Pikner, R.: Biologická aktivita u kolorektálneho karcinomu. *Čas. Lék. Čes*. 2002, 141(16), s. 508-512
- Kaušitz, J. et al.: *Onkológia*. Veda, 2003.
- Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O. Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2008;55(2):138-42. PubMed PMID: 18237252.
- Locker, G.Y., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J.M., Kemeny, N., Macdonald, J.S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast Jr., R.C., 2006. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J. Clin. Oncol*. 24, 5313e5327.,)
- Marko, P.:Skríning kolorektálneho karcinómu v SR.; *Via pract*, 2009, 6(4):171-172
- Nelson, AR., Fingleton, B., Rothenberg, LM., Matrisian, LM. Matrix Metalloproteases: Biologic Activity and Clinical Implications. *J Clin Oncology* 2000, 18(5), p. 1135-1149.
- Safranek J, Pesta M, Holubec L, Kulda V, Dreslerova J, Vrzalova J, Topolcan O, Pesek M, Finek J, Treska V. Expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in lung tissue of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and benign pulmonary disease. *Anticancer Res*. 2009 Jul;29(7):2513-7. PubMed PMID: 19596921.
- Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW, 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins". *J Cell Biol*. 174 (2): 169–174.
- Treska V, Topolcan O, Stanislav K, Liska V, Holubec L. Preoperative tumor markers as prognostic factors of colorectal liver metastases. *Hepatogastroenterology*. 2009 Mar-Apr;56(90):317-20. PubMed PMID: 19579590.
- Walid MS, Osborne TJ, Robinson JS (2009). "Primary brain sarcoma or metastatic carcinoma?". *Indian J Cancer* 46 (2): 174–175

V súčasnosti sme svedkami veľmi rýchleho rozvoja DNA a RNA diagnostiky a molekulovej cytogenetiky. Rovnako dochádza k rozvoju aplikácií DNA/RNA diagnostiky v imunológii, mikrobiológii a mnohých ďalších lekárskejších odboroch. Výsledkom aplikácie metód molekulovej diagnostiky je nielen lepšie porozumenie podstate ochorenia, ale tiež prevratné diagnostické a terapeutické poznatky. Tieto sa využívajú v diagnostike infekčných vírusových, bakteriálnych a mykotických ochorení, v prenatalnej a postnatalnej diagnostike dedičných chorôb, v diagnostike nádorových ochorení ako aj na identifikáciu osôb na transplantáciu a forenzné účely. DNA diagnostika stále viac zasahuje do ďalších a ďalších odborov medicíny z dôvodu možnosti jej využitia v retrospektívnej diagnostike a možnosti sledovania rôznych prognostických faktorov. DNA a RNA diagnostika si však vyžaduje nový spôsob myslenia aj práce. V súčasnej dobe je možné s použitím metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) vyšetriť jednu kópiu sekvencie (templátovej) DNA ľudského genómu. PCR je proces, pri ktorom z niekoľko mála kópií jednej molekuly (sekvencia nukleotidov) získame milión aj viacnásobok. Správna príprava vzorky a jej spracovanie majú zásadný význam pre spoľahlivé vyšetrenie. Je potrebné zabezpečiť, aby amplifikovaná molekula bola práve tá, ktorú sledujeme, a nie iná zavlečená do reakcie náhodne v dôsledku kontaminácie. Opakovateľnosť a kontrola kvality (pozitívna a negatívna kontrola) sú základnými podmienkami analýzy DNA a RNA. Analytické postupy v molekulovej genetike vo všeobecnosti využívajú metódy centrifugačné, metódy extrakcie a purifikácie DNA a RNA, elektroforetické, hybridizačné a amplifikačné metódy. Tieto metódy sa v praxi vzájomne prekrývajú a sú podkladom pre automatické metódy uskutočňované na genetických analyzátoroch (sekvenátoroch). Častým nástrojom týchto metód sú rôzne enzýmy, ktorých biologické funkcie sú používané pre špecifické reakcie *in vitro* (tab.2).

Základné prístrojové vybavenie tvorí napr. chladená centrifúga, termocyklery, termostat, vane pre horizontálnu agarózovú a vertikálnu polyakrylamidovú elektroforézu, zdroje jednosmerného napätia, UV transiluminátor, fotografická kamera alebo videodokumentačný systém, hybridizačné pece, laminárne boxy a genetický analyzátor alebo prístroj na čítanie DNA čipov (čítačka). Dnes už sú čím ďalej, tým menej rozšírené rádioizotopové pracoviská, vzhľadom k rýchlemu rozvoju nerádioaktívnych metód založených na fluorescencii.

Tabuľka 2 Enzýmy používané v metódach molekulovej genetiky

enzým	funkcia	hlavné použitie
alkalická fosfatáza	defosforyluje DNA a RNA na 5' konci	prevencia samovoľnej ligácie
DNA ligáza	katalyzuje väzbu dvoch molekúl DNA	ligácia DNA molekúl
DNA polymeráza I	syntetizuje dsDNA na templáte jednovláknovej DNA, má obe endonukleázové aktivity	syntéza ds cDNA, „nick translácia“ (značenie DNA rádioizotopovou metódou posunov zlomov)
DNáza I	odštiepuje nukleotidy z DNA zavádzaním zlomov	„nick translácia“, mutagenéza
exonukleáza III	odštiepuje nukleotidy na 3' konci DNA	sekvenovanie DNA, na vytváranie delécií
1-exonukleáza	odštiepuje nukleotidy na 5' konci DNA progresívne skracovanie DNA, na vytváranie delécií	sekvenovanie DNA
exonukleáza Bal31	odštiepuje nukleotidy na oboch koncoch DNA	progresívne skracovanie DNA, na vytváranie delécií
terminálna transferáza	pridáva nukleotidy na 3' konci DNA	syntéza homopolymérneho konca
S1-nukleáza	štiepi jednovláknovú DNA na nukleotidy	odstránenie slučiek vznikajúcich pri syntéze cDNA
polynukleotid kináza	prenáša fosfát z ATP na DNA alebo RNA	značenie DNA alebo RNA izotopom ³² P
reverzná transkriptáza	syntetizuje DNA na templáte RNA	syntéza cDNA z mRNA
restrikčná endonukleáza (typ II)	štiepi DNA podľa špecifickej sekvencie nukleotidov	restrikčná analýza, tvorba rekombinatnej DNA
Taq polymeráza (termostabilná)	syntetizuje dsDNA z jednovláknovej DNA	PCR
T4 DNA polymeráza	syntetizuje dsDNA, 3' endonukleázová aktivita	značenie DNA fragmentov výmennou syntézou na 3' konci

5.1 IZOLÁCIA A PURIFIKÁCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Princípy izolácie vychádzajú z chemických vlastností DNA:

- fosfátové estery sú silné kyseliny a pri neutrálnom pH sa správajú ako anióny,
- DNA sa ľahko precipituje alkoholom alebo izopropanolom,
- bázy sú len slabo zásadité a bez náboja,
- vodíkové väzby medzi –NH skupinami a –OH sú stabilné v rozmedzí pH 4-9,
- nukleové kyseliny majú maximum absorpcie UV svetla pri 260 nm, jednovláknová DNA má o 20-30% silnejšiu absorpciu ako dvojitá vlákna DNA,
- DNA je mimoriadne stabilná molekula a nachádza sa zvyčajne v terciálnej konformácii A, B, C, Z.

Na extrakciu a purifikáciu DNA z leukocytov (50µl až 20 ml plnej krvi s 5 mmol.l⁻¹ K₂EDTA proti zrážaniu), amniových buniek, choriových klkov alebo tkanivových kultúr sa používa zmes chloroformu-fenolu s proteinázou K, guanidín-hydrochlorid s proteinázou K, chloroform

s chloristanom sodným v silikónovej suspenzii a ďalšie metódy. V ostatnej dobe sa rýchlo rozvíjajú aj metódy založené na magnetickej separácii vyčistenej DNA. Tieto metódy je možné automatizovať.

Na účely PCR je možné použiť aj alternatívne zdroje DNA na jej extrakciu:

- izolácia DNA z krvného odberu na novorodenecký screening z tzv. Guthrieho kartičiek;
- izolácia DNA zo vzoriek buniek bukálnej sliznice získaných výplachom úst alebo steru;
- izolácia DNA z buniek vlasových korienkov;
- izolácia DNA z buniek močového sedimentu, a z ďalšieho biologického materiálu s jadrovou DNA (bioptická vzorka a pod.).
- avšak v praxi prevažuje ako zdroj jadrovej DNA vzorky žilovej krvi odobranej do skúmaviek s K_2 -EDTA (nie s heparínom, pretože ten inhibuje PCR a používa sa na klasickú cytogenetickú diagnostiku). Odobrané vzorky sa môžu ponechať v chladničke pri cca $+4^{\circ}\text{C}$ až jeden týždeň, na dlhšiu dobu je vhodné ich zmraziť pri teplote -20°C až -70°C . Výhodou uchovania v klasickej chladničke je nižšia miera hemolýzy, ktorá zvyšuje nároky na prečistenie DNA od hémových domén.

Izolácia RNA sa analyticky uskutočňuje napr. ultracentrifugáciou v prostredí CsCl po deštrukcii bunkových membrán guanidíntiokyanátom. RNA vytvorí pelet, DNA a proteíny zostanú nad vrstvou CsCl. Existuje množstvo komerčných kitov, kde niektoré sú založené na využití polyadenínového reťazca mRNA. Etanolový precipitát sa uchováva pri -20°C , vodný roztok pri -70°C . Izolovaná neporušená celková RNA dáva pri kontrole elektroforetickou agarózovou separáciou dva pruhy: 28s rRNA a 18s rRNA. Existujú tiež komerčné roztoky, v ktorých je možné uchovávať RNA pri izbovej teplote (technológia *RNA Later*), čo je výhodné pri zasielaní vzoriek na vyšetrenia na iné pracoviská. Kľúčové však je vzorku ihneď po odbere zmraziť, pretože natívna RNA je veľmi nestabilná. Tzv. *snap freeze* prístup je kľúčovým pre validitu RNA expresných štúdií pomocou RNA čipových technológií.

5.2 MERANIE KONCENTRÁCIE A ČISTOTY DNA A RNA

V bežnej praxi sa používajú dve metódy. Ak je vzorka čistá (neobsahuje nečistoty ako bielkoviny, fenol, agarózu) potom spektrofotometrické meranie v UV svetle je jednoduché a presné. Ak je množstvo DNA alebo RNA veľmi malé (menej ako $250\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) alebo vzorka obsahuje viac nečistôt, potom koncentrácia nukleových kyselín sa môže zisťovať z intenzity fluorescencie emitovanej etídiumbromidom porovnávaním so štandardnými vzorkami DNA s koncentráciami od $0,5$ do $50\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Touto metódou môžeme zistiť aj množstvo $1\text{--}5\text{ ng}$ DNA. Pri spektrofotometrickom meraní sa vzorka najskôr nariedi čistou destilovanou vodou a následne sa meria pri vlnových dĺžkach 260

a 280 nm. To umožňuje hodnotenie čistoty vzorky a očakávané pomery sú 1,8 pre DNA a 2,0 pre RNA. Pomer absorbanie 260/280 menší ako 1,75 svedčí o obsahu kontaminujúcich proteínov. V prípade vyššieho obsahu nečistôt je nutné uskutočniť purifikáciu vzorky.

Ak sa hodnota optickej denzity rovná 1 zodpovedá to približne 50 mg.l⁻¹ pre ds-DNA, 40 mg.l⁻¹ pre ss-DNA a RNA, 20 mg.l⁻¹ pre syntetické jednovláknové oligonukleotidy. Získanú DNA môžeme skontrolovať na celistvosť pomocou elektroforézy (DNA by mala byť nedegradovaná, „vysokomolekulová“ a preto schopná sa len minimálne vstrebať do gélu). Vizualizáciu robíme pomocou transiluminátora. Používa sa gél 0,8% agarózy pri 100V, asi 1 hodinu. Výťažok DNA z 5 ml krvi je zvyčajne 150-600 mg.l⁻¹, záleží to však na zdravotnom stave pacienta a množstve leukocytov v odbere. Na automatizáciu prevádzok v klinicko molekulovo genetických laboratóriách boli vyvinuté komerčné kity na izolácie DNA a RNA a jednoduché UV spektrofotometre na kvantifikáciu oligonukleotidov, DNA a RNA s automatickou kalkuláciou. Existuje aj veľké množstvo automatických extraktorov nukleových kyselín, ktoré fungujú buď čisto na chemickej báze, alebo na kombinovanom chemicko-magnetickom princípe. Vzhľadom k tomu, že dosiahnutá kvalita je štandardná, rozhoduje tu cena za jednu izoláciu a množstvo krvi (alebo inej vzorky), ktoré je potrebné spracovať.

5.3 DĹŽKOVÝ POLYMORFIZMUS RESTRIKČNÝCH FRAGMENTOV (RFLP)

Základnou metódou charakterizácie DNA je jej restričná analýza pomocou jej štiepenia restričnými endonukleázami na definované fragmenty. Na identifikáciu a analýzu produktov štiepenia sa používa elektroforéza. Poznáme veľké množstvo bakteriálnych restričných endonukleáz, ktoré sa od seba líšia tým, že rozpoznávajú rôzne krátke sekvencie nukleotidov (4,6,8 - báz) a štiepia DNA na rôzne dlhé fragmenty podľa individuálneho poradia báz a podľa rozpoznanej sekvencie. Za daných podmienok vzniká reprodukovateľný počet restričných fragmentov o určitej opäť reprodukovateľnej dĺžke (počtu párov báz - pb). Počet a dĺžka fragmentov sú pre daného jedinca špecifické. Niektoré restričné endonukleázy sú rovnako citlivé na metyláciu cytozínu, čo sa diagnosticky využíva pri poruchách *imprintingu*. Rozlíšenie rôznych druhov DNA sa uskutočňuje na základe polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov. Tento polymorfizmus vzniká na základe prítomnosti alebo neprítomnosti rozpoznávacích a štiepných miest pre restričné endonukleázy. Všeobecne platí, že tie enzýmy, ktoré rozpoznávajú kratšie sekvencie, štiepia DNA častejšie a na menšie úseky, kým restričné endonukleázy rozpoznávajúce dlhšie sekvencie štiepia DNA menej často a na dlhšie fragmenty. Pri neúplnom (parciálnom) štiepení DNA vplyvom nevhodných reakčných podmienok (napr. vysoký obsah proteínov, nevhodná teplota alebo krátka doba štiepenia) vznikajú dlhšie úseky. Hviezdičkové štiepenie (tzv. „star“ aktivita enzýmu) je spôsobená

nešpecifickým štiepením mimo rozpoznávaného miesta, a vzniká tak veľa krátkych nešpecifických fragmentov. Tento stav môže byť spôsobený napr. nadbytkom glycerolu v reakcii. Vtedy nie je vhodné zvyšovať množstvo enzýmu (objem) ale jeho koncentráciu pri rovnakom objeme.

Okrem RFLP sa pre DNA diagnostiku a pre štúdium príbuzenských vzťahov (napríklad dôkaz otcovstva) často používa aj polymorfizmus repetetívnych úsekov DNA – VNTR (variabilný počet tandemových opakovaní, najčastejšie v podobe STR – „*short tandem repeats*“ – t.j. krátkych tandemových repetícií od 2 do 5 pb). Existuje veľké množstvo komerčných diagnostických súprav, vrátane presných počítačových vyhodnocovacích programov.

Kým pri RFLP sú jednotlivé alely charakterizované veľkosťou získaných fragmentov v závislosti na prítomnosti variabilného restriktčného miesta, pri VNTR sú jednotlivé alely charakterizované buď veľkosťou fragmentov v závislosti na počte repetícií, alebo intenzitou (množstvom) pri štiepení, ktoré oddelí jednotlivé repetície.

V súčasnosti je RFLP modifikovaná do tzv. fragmentačnej analýzy, ktorá sa uskutočňuje na automatických genetických analyzátoroch pomocou viacfarebných fluorescenčne značených PCR primerov. Túto analýzu už veľmi často nepredchádza restriktčné štiepenie fragmentov, ale skôr ich diferenciálna amplifikácia pomocou PCR. Výhodou automatizácie je možnosť stanoviť nielen relatívnu dĺžku analyzovaných fragmentov, ale tiež semikvantitatívne zhodnotiť génovú dávku (metóda QF-PCR – *quantitative fluorescent PCR* – kvantitatívna fluorescenčná PCR). Najčastejšie sa využíva na molekulové cytogenetické vyšetrenia najčastejších chromozomálnych aneuploidíí.

5.4 HYBRIDIZAČNÉ METÓDY

Základnou metódou detekcie sekvencií nukleotidov je komplementárna a teda špecifická hybridizácia získaných fragmentov DNA s inou molekulou DNA – značenou sondou; teraz najčastejšie používaným syntetickým oligonukleotidom. Hybridizácia sa robí na pevných nosičoch, na ktorých je polynukleotid viazaný a súčasne je schopný hybridizácie, napriek tomu, že kinetika tejto reakcie je pomalá a pomer málo efektívny. Medzi varianty hybridizácie na pevnom nosiči patrí dot, blot a slot hybridizácia, Southernov blot, hybridizácia RNA (*northern blotting*) a hybridizáciu *in situ*. Imobilizácia vzoriek sa robí na membrány z nitrátu celulózy alebo nylonu. Prenosu DNA na pevný nosič predchádza depurinácia, alkalická denaturácia a neutralizácia. V klasickej podobe sa prenos uskutoční buď jednoduchou difúziou na princípe kapilárnych síl, alebo pomocou vákua, alebo pôsobením elektrického prúdu (*electroblotting*). Malé fragmenty (do 1500 pb) sa prenesú na membránu pomocou difúzie kapilárnych síl do 2 hodín, väčšie fragmenty (nad 15 kb) vyžadujú viac ako 15 hodín. Permanentná fixácia na membránu sa docieľa napr. pôsobením UV svetla alebo tepla („zapekanie“).

Vlastná hybridizácia znamená reasociáciu príslušných dvojíc báz (A-T a C-G) podľa špecifického poradia nukleotidov so sondou značenou rádioaktívnym alebo dnes už prevažne nerádioaktívnym markerom.

Ide buď o úseky DNA (jednovláknové alebo dvojvláknové), kedy si klonované pomocou bakteriálneho vektoru, dnes syntetickými oligonukleotidami. Menej často sa používajú tzv. ribosondy (cRNA) alebo RNA-proteín-DNA sondy s vyššou špecifitou. Senzitivita hybridizácie závisí na štyroch hlavných faktoroch:

- dĺžke (počte báz) a komplementarite sondy,
- koncentrácii sondy (a potlačení nešpecifických väzieb),
- špecifickej aktivite sondy danej aktivitou (koncentráciou) naviazaného markeru,
- koncentrácii testovanej DNA prenesenej a fixovanej na membráne.

Potlačenie nešpecifických väzieb (napr. prehybridizácia so sonifikovanou lososou spermatickou DNA, ktorá pokryje nešpecifické väzobné miesta na membráne a/alebo so sonifikovanou ľudskou DNA) dovoľuje vyššiu koncentráciu sondy pri dodržaní hybridizačných podmienok – teploty, koncentrácii solí a pod. Reakčná zmes a kinetika hybridizačnej reakcie sú zvyčajne stanovené empiricky. Po hybridizačnej reakcii v špeciálnom inkubátore s termostatom nasleduje vymývanie tlmivým roztokom SSC o rôznych koncentráciách (1x SSC; 0,15 mol.l⁻¹ NaCl, 0,015 mol.l⁻¹ citrát trojsodný) na vymytie nepresne hybridizovanej sondy.

Dot, blot a slot hybridizácia: názvy sú odvodené od tvaru jednotlivých vzoriek nanesených na membránu:

- dot – veľmi pravidelný okrúhly tvar („koliesko“),
- slot – veľmi pravidelný pretiahnutý tvar („elipsa“),
- blot – ručne nanesená vzorka viac menej náhodného tvaru („kvapka“).

Reverzný *blotting* spočíva v tom, že na membránu je najskôr fixovaná sonda, ktorá je potom hybridizovaná z DNA z vlastnej skúmanej vzorky. Reverzná hybridizácia je najrozšírenejšia v komerčných diagnostických kitoch na detekciu mutácií. Je to veľmi spoľahlivý systém, ktorého obmedzením je menší počet naraz vyšetřovaných mutácií.

Southernov prenos a hybridizácia RNA (*northern blotting*) sú zvláštne tým, že prenosu fragmentov DNA alebo RNA na membránu a následnej hybridizácii predchádza elektroforetické delenie. Elektroforetickej separácii často predchádza štiepenie restričnou endonukleázou. Táto metóda poskytuje dve informácie: interpretuje po vizualizácii prúžkov (autorádiograficky alebo kolorimetricky) jednak prítomnosť a jednak veľkosť nukleovej kyseliny, ktorá hybridizovala s aplikovanou špecifickou sondou. *Northern blotting* a hybridizácia sa používajú najčastejšie na

hodnotenie úrovné génovej expresie konkrétnych mRNA, a preto sa kvantifikácia alebo semikvantifikácia uskutočňuje ku referenčnej kontrolnej hybridizačnej sonde (napr. β -aktín).

In situ hybridizácia sa vyznačuje tým, že hybridizácia prebieha v morfológicky intaktnom tkanive, v bunkách alebo na chromozómoch, ktoré sú fixované na mikroskopickom sklíčku. Demonštruje sa genetická informácia v morfológickom kontexte a metóda združuje štandardnú svetelnú mikroskopiu s detekciou hybridizácie. Hybridizácii so značenou sondou môže predchádzať amplifikačná reakcia (nepriama *in situ* PCR). Priama *in situ* PCR inkorporuje marker viazaný na oligonukleotidový primer alebo na deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) priamym spôsobom. Nasleduje obvykle detekcia protilátkou a vizualizácia, pričom celý prenos môže byť automatizovaný. Príkladom je metóda **FISH** (fluorescenčná *in situ* hybridizácia), ktorá sa využíva v molekulovej cytogenetike. Špeciálnou metódou je analogicky priama a nepriama ***in situ* RT-PCR** (reverzná transkripcia a amplifikácia cDNA), ktorá využíva vlastnosti rekombinantnej *rTth* DNA polymerázy. Podobne existuje aj metóda PRINS (*primed in situ*) amplifikácia špecificky naviazanej sondy, ktorá dosahuje vysokú spoľahlivosť na detekciu špecifických génov napríklad na histologických preparátoch.

5.5 REVERZNÁ TRANSKRIPCIA

Detekcia a analýza molekúl RNA patrí k dôležitým molekulovo-biologickým postupom. Na celkovom množstve izolovanej RNA sa mRNA podieľa len 1-2% (prevažnú časť tvorí rRNA). Adaptácia amplifikačných techník umožňuje relatívne jednoduchú analýzu mRNA tým, že po reverznej transkripcii nasleduje amplifikácia cDNA napr. pomocou PCR.

RT-PCR je veľmi hodnotná metóda na analýzu génovej expresie, detekciu infekčných agens, detekciu genetických chorôb (eliminujú sa intróny, poskytuje informácie o alternatívnom zstrihu). Medzi používané reverzné transkriptázy patrí: **MMLV**, **AMV**, **Tth**. Reverzné transkriptázy M-MuLV (z Moloneyho myšacieho leukemického vírusu) a AMV (z vtáčieho myoblastického vírusu) sú schopné syntetizovať cDNA až do 10 kb, kým bakteriálna termostabilná Tth DNA polymeráza len do 2 kb. Reverzná transkriptáza Tth na rozdiel od dvoch predchádzajúcich nemá aktivitu RNázy a vyžaduje v reakcii ešte Mn^{2+} ióny. Optimálne reakčné teploty sa líšia: M-MuLV 37 °C, AMV 42 °C, Tth 65°C. Používajú sa tri typy primerov:

- špecifické oligonukleotidy pre syntézu vybranej určitej mRNA,
- zmes náhodných hexanukleotidov,
- oligo(dT)₁₂₋₁₈.

Možnosť uskutočniť reverznú transkripciu a PCR v jednej reakcii a v jednej skúmavke je jedinečnou výhodou enzýmu Tth, pretože sa podstatne znižuje riziko kontaminácie a celá procedúra sa zjednodušuje. Ako bolo uvedené vyššie, rozhodujúce je však urýchlené spracovanie vzorky po biopsii alebo jeho okamžité (!) zmrazenie v tekutom dusíku po odbere v dôsledku značnej nestability RNA.

5.6 AMPLIFIKAČNÉ METÓDY

5.6.1 POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) bola vyvinutá v Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. Ide o enzymatickú amplifikáciu DNA *in vitro* syntézou mnohých kópií vybranej sekvencie DNA v cyklickej reakcii pri troch teplotných fázach za použitia termostabilnej DNA polymerázy, alebo tiež „Taq polymerázy“. PCR patrí k základným metódam DNA diagnostiky. Dvojvláknová DNA je najskôr denaturovaná na dva jednovláknové templátové (matricové) molekuly DNA. Nukleotidová sekvencia cieľovej DNA nemusí byť známa, ale musia byť známe aspoň sekvencie krátkych úsekov na oboch koncoch cieľovej amplifikovanej DNA, ktoré ju ohraničujú. Oligonukleotidové sondy (primery), ktoré hybridizujú na oboch stranách cieľ prvej DNA, riadia syntézu nových vlákien v smere 5'→3'. Ich syntézu katalyzuje termostabilná DNA-polymeráza (napríklad Taq z baktérie *Thermus aquaticus*, izolovaná z horúcich termálnych prameňov). Počas prvého cyklu syntézy nového vlákna pokračuje ďalej až na sledovanú sekvenciu, ale nasledujúce cykly amplifikujú prevažne len úsek medzi dvoma vybranými primermi (sondami). Niektoré termostabilné DNA polymerázy umožňujú amplifikáciu fragmentov až do dĺžky 5000 pb. Rozhodujúce je empiricky stanoviť optimálnu teplotu hybridizácie primerov a počet cyklov k dosiahnutiu čo najvyššej špecifickosti reakcie. Vhodné je na začiatku reakcie použiť vyššiu teplotu a postupne ju v priebehu ďalších cyklov mierne znižovať až na empiricky stanovené optimum („touch-down“ PCR).

Reakčné podmienky:

- reakčný objem je zvyčajne 5 až 100 µl,
- templátová DNA potrebná pre PCR je medzi 1,0 až 500 ng,
- oligonukleotidové primery sú syntetizované tak, aby hybridizovali s komplementárnou sekvenciou na oboch vláknach dubletu DNA; sú zvyčajne dlhé 20-30 nukleotidov. Potrebné množstvo každého z nich pre jednu reakciu je 25-50 pmolov. Pomer GC:AT by mal byť optimálne 1:1. Primer by nemal obsahovať oblasti bohaté na AT a GC. Primery by nemali byť

medzi sebou komplementárne, hlavne na 3' konci, kde prekrytie dvoch alebo troch báz môže spôsobiť vznik diméru primerov a to hlavne pri ich nadbytku. Môže tak vzniknúť nežiaduci PCR produkt. Niekedy vznikajú problémy so sekundárnou štruktúrou, hlavne u primerov bohatých na CG. V tomto prípade sú vhodné dlhšie primery, napr. 25-30 pb.

- dNTP - deoxytrínukleotidtrifosfáty, optimálne $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého, tolerančné rozpätie 200-400 $\mu\text{mol.l}^{-1}$,
- Mg^{2+} ióny, optimálne 4 mmol.l^{-1} , tolerančné rozpätie 3-8 mmol.l^{-1} , vyššia koncentrácia zvyšuje špecifickosť, ale u primerov bohatých na GC je vyššia koncentrácia lepšia,
- *Taq* DNA polymeráza, optimálne 1-2 U na každú reakciu, tolerančné rozpätie 0,5-5 U, vyššia koncentrácia zvyšuje pravdepodobnosť chybného hybridizácie a pozadia.

Teplotné fázy cyklu.

- denaturácia optimálne pri 95°C , tolerančné rozpätie $92-98^{\circ}\text{C}$, pre fragmenty do 1 kb 15 sekúnd, pre väčšie fragmenty 30 sekúnd až 1 minútu,
- hybridizácia optimálne podľa denaturačnej teploty duplexu templátovej DNA obvykle v rozmedzí $50-55^{\circ}\text{C}$, nízka teplota podstatne znižuje špecifickosť, vysoká teplota zabraňuje amplifikácii,
- syntéza obvykle v rozmedzí $70-74^{\circ}\text{C}$, pre fragmenty do 1 kb 30 sekúnd až 1 minútu, pre úseky 6-10 kb je potrebná doba 15 minút, pre primery bohaté na GC je niekedy vhodná teplota 80°C .

Významnú inhibíciu PCR spôsobujú erytrocyty (napríklad primárne hemolyzovaná krv). Takáto vzorka vyžaduje odstránenie inhibítorov alebo ich neutralizáciu. Jednoduchá metóda je založená na využití iónomeničovej živice (napr. kopolymér styrén-divinylbenzén) Chelex 100, ktorá viaže dvojmocné ióny.

Skúsenosti s PCR poukázali na nutnosť zavedenia techník, ktoré minimalizujú kontamináciu amplikónom (produktom PCR) s predchádzajúcich reakcií. V praxi sa bežne používa slepá a negatívna kontrola (reakčná zmes bez cieľovej DNA). Ďalšia preventívna metóda na zabránenie kontaminácie je založená na využití dUTP miesto dTTP v reakčnej zmesi PCR. Bakteriálny enzým uracil-N-glykozyláza degraduje DNA obsahujúcu uracil. Degradované budú len fragmenty DNA pochádzajúce z PCR, pretože normálna DNA uracil neobsahuje. Uracil-N-glykozyláza je pridaná do reakčnej zmesi pred začatím amplifikačnej reakcie, aby všetky prípadné amplikóny boli včas degradované. Samotný enzým je potom inaktívovaný pri prvom denaturačnom cykle, takže nové produkty PCR sa už môžu akumulovať v reakčnej zmesi. Iná metóda je založená na pridaní derivátov psoralenu do zmesi na začiatku reakcie. Psoralen neinterferuje s amplifikáciou a je stabilný počas teplotných cyklov.

Skúmanky sú po ukončení reakcie ešte pred otvorením vystavené UV svetlu. Interakcie medzi formami izopsoralenu a pyrimidínmi neovplyvňujú hybridizáciu, ale zabraňujú následnej amplifikácii DNA polymerázou. Ďalšou bežnou metódou je používanie špeciálnych pipiet a pipetovacích špičiek s filtrom. Z tohto dôvodu by mala byť oddelená prevádzka pre- a post-PCR a je nutné na prípravu vzoriek používať laminárne boxy.

Rozsiahle diagnostické využitie repetitívnych sekvencií DNA je umožnené aplikáciami metód PCR, napr. **AFLP** (dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov). Repetitívne sekvencie sú označované podľa svojich špecifik ako VNTR (*variable number of tandem repeats*), STR (*short tandem repeats*), $(CA)_n$ a mikrosatelity. V ľudskom genóme je približne 50 000-100 000 $(dC-dA)_n \cdot (dG-dT)_n$. Ide o podskupinu STR bežne označovanú $(CA)_n$. Využitie je napr. v diagnostike príbuzenských vzťahov, delícii génov alebo straty heterozygoty. Základným obmedzením je však relatívna nestabilita týchto dinukleotidov a zvýšené riziko ich chybnnej amplifikácie pomocou PCR.

„Nested“ PCR. Amplifikuje sa najskôr úsek, kde templátom je genomická DNA. Nasleduje ďalšia „vnorená“ PCR, tzv. *nested* reakcia, kde templátom je produkt predchádzajúcej reakcie. Pre prvú reakciu sa použije prvá sada oligonukleotidov, v druhej, „*nested*“ reakcii sa použijú oligonukleotidy, ktoré sú navrhnuté pre fragment získaný ako produkt prvej PCR (a sú tak „vo vnútri“ prvej sady primerov). Táto obľúbená modifikácia má celý rad aplikácií, niektoré vystačia so sadou len troch primerov (*semi-nested* PCR). Týmto prístupom sa zvyšuje citlivosť a špecificita, avšak vzrastá riziko kontaminácie.

Analýza heteroduplexov sa používa na detekciu mutácií genetických chorôb stále častejšie. Táto metóda je jednoduchá a citlivá. Jej princípom je skutočnosť, že heteroduplexy, ktoré sa tvoria po amplifikácii u heterozygotov, migrujú v agarózovom géle pomalšie ako homoduplexy vďaka svojej nestabilite. Keď amplifikované fragmenty z dvoch odlišných alel (mutácie, polymorfizmus) spolu hybridizujú, vytvárajú dva homoduplexy a dva typy heteroduplexov. Za vhodných hybridizačných podmienok (napríklad po skončení PCR sa produkty denaturujú po dobu 10 minút a potom sa nechajú 30 minút rehybridizovať pri teplote 50°C) vznikajú všetky štyri druhy duplexov približne v ekvimolárnom pomere. Detekcia separovaných fragmenov v géle sa uskutočňuje farbením etídiumbromidom. V niektorých prípadoch sa využíva tzv. generátor heteroduplexov t.j. molekuly DNA upravených cielenou mutagénou.

Asymetrická PCR je modifikácia PCR, ktorá umožňuje preferenčnú syntézu len jedného vlákna z duplexu DNA tým, že jeden s primerov je v nadbytku. Vzniká tak jednovláknová DNA ako produkt PCR vhodný napríklad pre priame sekvenovanie. Inou modifikáciou je SSPR (*single strain producing reaction*), ktorá je ešte špecifickejšia. Táto metóda sa tiež vhodne kombinuje s „*nested*“ PCR. Jej obmedzením je však pracnosť a zvýšené riziko kontaminácie.

Multiplexná reakcia je veľmi výkonná metóda PCR určená na testovanie mnohých delécií a bodových mutácií v jednej amplifikačnej reakcii, v jednom elektroforetickom delení v agaróze obvykle s etídiumbromidom. Najzložitejšia je prípravná fáza, kedy je nutné vypracovať také reakčné podmienky (sekvencia nukleotidov, koncentrácia primerov, optimálne teploty jednotlivých krokov cyklu atď.), aby amplifikačná reakcia pre každý testovaný exón alebo časť exónu neprebiehala len v prípade, že ide o deléciu v tom ktorom príslušnom mieste. Dôležitá je tiež koncentrácia Mg^{2+} iónov a pomer jednotlivých primerov, vrátane optimalizácie teploty jej multiplexnej hybridizácie. Pre každú reakciu je tiež nevyhnutná pozitívna a negatívna kontrola. Napríklad v DNA diagnostike delécií v oblasti génu pre dystrofín, multiplexová reakcia pre 3' koniec testuje 11 rôznych exónov a pre oblasť 5'-koniec 7 exónov naraz. Prakticky to znamená, že namiesto skôr uskutočňovaných 18 samostatných amplifikácií sa urobia len 2 reakcie.

Pre priamu detekciu známych bodových mutácií je vhodná metóda hybridizácie s **ASO** (alelovo špecifické oligonukleotidy). Produkty PCR sa rozdelia elektroforeticky napríklad v 1% agarózovom géle, potom nasleduje denaturácia a dvojité blottovanie z gélu, ktorý je umiestnený medzi dvoma nylonovými membránami. Denaturačný roztok slúži ako prenosový tlmivý roztok. Fixácia DNA k membránam sa uskutoční expozíciou UV-svetlom v transiluminátore. Nasleduje hybridizácia s alelovo špecifickými oligonukleotidmi (normálnymi a mutovanými), ktoré sú označené vhodným detekčným systémom, napr. na 5' konci $\alpha^{32}P$ (ATP) pomocou T4 polynukleotidkinázy. Za určitých hybridizačných podmienok sa dosiahne situácia kedy jediný chýbajúci báзовý pár medzi sondou a analyzovanou DNA zabráni hybridizácii. Bezchybne komplementárne úseky naopak hybridizujú veľmi dobre. Po hybridizácii sa uskutoční premývanie a kolorimetrická detekcia prúžkov. V súčasnej dobe sa ASO používa predovšetkým v rôznych komerčných diagnostických súpravách v multiplexovej podobe a s nerádioaktívnym značením sond.

AS-PCR (alelovošpecifická PCR). Na detekciu bodových mutácií a malých delécií sa často používajú metódy PCR, ktoré využívajú tzv. alelovo špecifické oligonukleotidy ako primery. Špeciálne pripravený primer hybridizuje svojou 3'-oblasťou k štandardnej a mutovanej alele. Najčastejšie sa využíva variant ARMS („*amplification refractory mutation detection system*“). Podstatou ARMS je nevyhnutnosť presnej komplementarity báz na 3'-konci primeru, ktorá je kľúčová pre správnu amplifikáciu. Pri nesúlade komplementarity („*mismatch*“) nedochádza ku špecifickej amplifikácii, čo je základom AS-PCR. Dôležité je však použiť vnútornú kontrolu reakcie k odlíšeni špecifickej chýbajúcej amplifikácii od nešpecifického zlyhania samotnej PCR. Metódy AS-PCR prešli veľkým vývojom – od manuálnych až po automatizované prístupy. Metóda je jednoduchá, spoľahlivá, neizotopová a jasne rozlišuje heterozygotov v sledovanom lokuse od homozygotov pre jednu alebo druhú alelu. Alelovo-špecifická PCR bola prvý krát použitá na detekciu subtypov HLA, dnes sa dá prakticky použiť pre akúkoľvek

sekvenciu vrátane malých inzercií alebo delécií. Jej nevýhodou je však relatívna prácnosť. V súčasnej dobe sa najviac rozšíril variant AS-PCR v podobe tzv. minisekvenovania.

PSM (*PCR-mediated side directed mutagenesis*) je metóda, ktorá umožňuje identifikáciu špecifických alel umelou zmenou sekvencie počas PCR tak, že dôjde k vytvoreniu nového alebo k zániku pôvodného restrikčného miesta pre restrikčnú endonukleázu. Je založená na nepresnej hybridizácii sondy s genomickou DNA opäť na jej „citlivom“ 3' konci. Sekvencia je modifikovaná tak, že jeden z primerov sa v jednom nukleotide líši a hybridizuje s templátom v blízkosti sledovanej mutácie. Amplifikácia oblasti s takto umelo vytvorenou mutáciou vedie k inkorporácii zámenny nukleotidu do výsledného produktu PCR. Po štiepení príslušným restrikčným enzýmom a elektroforetickej separácii sa identifikujú jednotlivé alely. Ako príklad je možné uviesť princíp detekcie mutácie R1443X v nádorovom supresorovom géne *BRCA1*. Táto mutácia je výsledkom tranzície C→T v 4446. nukleotide a spôsobuje zámenu arginínu v STOP-kodóne. Zavedenie restrikčného miesta AlfIII do produktu PCR mutantnej alely vedie k vzniku fragmentov o dĺžke 180 pb. Nemutovaná alela sa neštiepi a produkt PCR zostáva dlhý 197 pb.

RACE je metóda rýchlej amplifikácie cDNA koncov pomocou PCR. Najskôr sa syntetizuje cDNA reverznou transkripciou z mRNA. Je to metóda amplifikácie cDNA kedy syntéza prebieha smerom k 5'-alebo 3'-koncu, pričom musí byť známa časť sekvencie niektorého z vyšetrovaných exónov. Amplifikácia 5'-koncov vyžaduje purifikáciu prvotnej cDNA a ukončenie reťazca terminálnou transferázou za vzniku druhého poly(A)konca. Kombináciou sa potom získa celá plnohodnotná cDNA.

5.6.2 LIGÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA

Ligázová reťazová reakcia (LCR, LAR) je metóda amplifikácie DNA určená k detekcii stopových množstiev DNA o známej sekvencii. LCR je dvojfázová cyklická reakcia. V prvej fáze sa za vysokej teploty (95°C) cieľové molekuly dvojvláknovej DNA rozvinú na jednovláknové. V druhej fáze (70°C) sa dve sady (2x2) komplementárnych oligonukleotidov priložia (hybridizujú) k cieľovým jednovláknovým molekulám a termostabilnou ligázou sú spolu spojené. Produkty ligázovej reakcie z jedného cyklu slúžia ako templát (podklad) pre nasledujúcu reakciu cyklu. Používajú sa *Tth* DNA ligáza, izolovaná z *Thermus thermophilus* a *Pfu* DNA ligáza z *Pyrococcus furiosus*.

LCR je alternatívna amplifikačná technika, ktorá môže mať niektoré priame výhody oproti PCR. Pri PCR sa často tvoria nešpecifické amplifikačné produkty, ktoré komplikujú interpretáciu výsledkov. Toto „pozadie“ (amplifikačné artefakty) vzniká tým spôsobom, že sa oligonukleotidové sondy hybridizujú k oblastiam nielen úplne, ale aj čiastočne ku sekvenčnej homológii s pôvodnou templátovou DNA. Rozlíšenie produktov PCR vyžaduje separáciu pomocou elektroforézy, niekedy

izoláciu z gélu a následné určenie sekvencie amplifikovaných úsekov. Naopak molekuly amplifikované pomocou LCR sú len tie, kde sa úplne, presne a správne priložili oligonukleotidové sondy k homologickým úsekom templátovej DNA. V prípade, že sa jedna oligonukleotidová sonda pre LCR označí napríklad biotínom kovalentnou väzbou a druhá napríklad alkalickou fosfatázou, potom sa amplifikácia aj detekcia objavujú súčasne. Elektroforéza alebo sekvenovanie nie sú nutné. Z tohto dôvodu je LCR vhodnejšia aj k automatizácii v porovnaní s PCR, a predovšetkým má vyššiu špecifitu. Niektoré metódy kombinujú PCR s LCR, takže polymeráza a ligáza sú prítomné v jednej reakcii súčasne.

5.6.3 Q-B REPLIKÁZOVÁ REAKCIA

Patrí medzi metódy amplifikujúce hybridizačnú sondu. RNA bakteriofág Q-β využíva RNA polymerázu k replikácii svojho genómu. Q-β replikáza nepotrebuje oligonukleotidový primer k iniciácii syntézy RNA, ale rozpoznáva vysoko organizovanú oblasť RNA genómu ako iniciátora. Jednovláknová molekula RNA je vhodným templátom pre Q-β replikázu. To umožňuje *in vitro* exponenciálny vzostup počtu kópií RNA. Na iniciáciu ďalšej replikačnej reakcie nie je potrebná denaturácia. Enzým Q-β replikáza je veľmi rýchly a výkonný: jedna molekula templátu je amplifikovaná na 10^{12} kópií za 10-15 minút pri teplote 37°C. V praxi je najskôr sonda hybridizáciou naviazaná na Q-β templát. Po hybridizácii sa uskutoční amplifikácia. Aplikácie metódy sú limitované požiadavkou na absolútnu špecifitu hybridizácie sondy. Akékoľvek hybridizačné pozadie vedie k ľahkej amplifikácii akéhokoľvek produktu.

5.6.4 3SR AMPLIFIKAČNÁ REAKCIA

3SR amplifikačná reakcia (*self-sustained sequence replication*) využíva kolektívny účinok reverznej transkriptázy, RNázy H (z baktérie *Escherichia coli*) a T7 RNA polymerázy. Na syntézu cDNA sa používa hybridný primer, ktorý obsahuje cieľovú špecifickú oblasť a nehybridizujúci koniec s promotorom pre T7 RNA polymerázu. Výsledná kópia cDNA má na jednom konci tento promotor. RNáza H degraduje RNA v hybride RNA/DNA. T7 RNA/DNA polymeráza syntetizuje podľa DNA mnoho kópií RNA, ktoré sú následne cieľom pre reverznú transkriptázu, ktorá syntetizuje ďalšie cDNA. Všetky reakcie prebiehajú pri rovnakej teplote. Reakčné činidlá sú v takých koncentráciách aby umožnili akumuláciu produktu.

K ďalším amplifikačným reakciám patria **reakcie cyklujúce sondy** (*cycling probe reaction*) alebo modifikácie ako napr. **transkripčné amplifikačné reakcie** (TAS, *isothermal transcription-based amplification reaction*), **NASBA** (*nucleic acid sequence-based amplification*).

5.7 ELEKTROFORETICKÉ METÓDY

Produkty restričných alebo amplifikačných reakcií (fragmenty DNA) sa delia podľa svojej relatívnej molekulovej hmotnosti a veľkosti náboja fragmentov DNA elektroforézou v géli. Sacharidovo-fosfátová základná kostra nukleových kyselín je príčinou rovnomerného rozloženia negatívnych nábojov v molekulách DNA a RNA. Pohyb týchto vysoko elektronegatívnych molekúl v elektrickom poli vedie k ich separácii na základe ich molekulových hmotností. Delenie veľkých fragmentov (až 5000 kb) je možné doceliť použitím elektroforézy v pulzujúcom poli (**PFGE**). Analýza veľkosti fragmentov je podstatou celého spektra molekulových biologických metód. Najčastejšie sa používa ako elektroforetické médium agaróza (0,8 - 3,0 %), ktorej koncentrácia sa určuje podľa veľkosti fragmentov, ktoré majú byť separované (orientačná tabuľka č.3), pre menšie fragmenty DNA sa používa polyakrylamid, ktorý môže oddeliť fragmenty o veľkosti 1 – 2 bp. Existujú tiež finančne náročnejšie agarózy na špeciálne použitie.

Tabuľka 3 Koncentrácie agarózy podľa veľkosti fragmentov (orientačné)

Veľkosť fragmentov	Koncentrácia agarózy
1-20kbp	0,4 - 0,8 %
500-1000bp	2 %
100-500bp	3 %
10-100bp	5 %

Mnohé aplikácie používajú horizontálnu elektroforézu (podmienky: U=80-200 V, I=20-60 mA) a gél je uložený vo vani ponorený do tlmivého roztoku (TE, TBE, TAE). Najčastejšie sa používajú dve aplikácie gélov, napr. 12x20 cm a 5x9 cm, čo predstavuje približne 4,5, resp. 9 V/cm. Nanášanie vzoriek (0,1 až 5,0 mg DNA) na štart do jamiek predchádza zmiešanie s nanášajúcim tlmivým roztokom zvyčajne v pomere 1:4 alebo 1:5, ktorý obsahuje farbičku viditeľného spektra (napr. brómfenolovú modrú 0,5 g.l⁻¹, 400g.l⁻¹ sacharózy, 20 mmol.l⁻¹ EDTA). Rozdelené frakcie je možné preniesť na špeciálne membrány (fólie) tzv. blottovaním a následne podrobiť hybridizácii, alebo pomocou fluorescenčných farbičiek napr. etídiumbromidom interkaláciou medzi nukleotidy (50 µg na 100 ml gélu) vizualizovať na transiluminátore v UV svetle s následnou fotodokumentáciou. Krovový rebríček po 50 alebo 100 pb (*step ladder*) alebo iné PCR markery sa používajú ako kalibračná škála molekulovej hmotnosti (veľkosti fragmentov).

5.7.1 POLYAKRYLAMIDOVÁ ELEKTROFORÉZA

Druhým najčastejšie používaným elektroforetickým médiom v molekulovej biológii je polyakrylamidový gél (denaturačný, zvyčajne s močovinou, alebo nendenaturačný). Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE) je vertikálna elektroforéza. Zmes akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje pri izbovej teplote v tlmivom roztoku (TAE) pomocou voľných radikálov poskytovaných persulfátom amónnym (APS), ktorý spôsobuje homolytické štiepenie väzieb O-O. Na urýchlenie polymerizácie sa používa voľná zásada TEMED (tetrametyléndiamín), ktorý katalyzuje tvorbu voľných radikálov persulfátu amónneho. Ďalším používaným iniciátorom polymerizácie je riboflavín, ktorý je účinný už pri veľmi nízkych koncentráciách 5-10 ng.l⁻¹. Polymerizácia sa neuskutoční pri nízkom pH alebo za prístupu O₂. Konečná koncentrácia TEMED a APS v polymerizačnom roztoku by mala byť 0,05%. Použitá koncentrácia polyakrylamidu sa líši podľa veľkosti separovaných fragmentov DNA od 3,5% (fragmenty dĺžky od 1 až 2 kpb) až po 20% gély na separáciu malých fragmentov 10-100 pb.

5.7.2 METÓDA ANALÝZY JEDNOVLÁKNOVÉHO KONFORMAČNÉHO POLYMORFIZMU

Metóda analýzy jednovláknového polymorfizmu (SSCP) je jednoduchá, senzitívna a efektívna technika na detekciu mutácií typu zámenny jednej bázy. Metóda je založená na princípe rôznej migrácie jednovláknových molekúl DNA líšiacich sa svojou sekundárnou štruktúrou (konformáciou) v natívnom polyakrylamidovom géle (zvyčajne 6%, 0,4 mm hrubý, v TBE tlmivom roztoku). Unikátna konformácia jednovláknového fragmentu DNA je daná intramolekulovými interakciami vo vnútri sekvencie DNA. Táto konformácia je závislá na teplote a iónovej sile. Teplota pri elektroforéze je kľúčovým parametrom, ktorý ovplyvňuje kvalitu rozlíšenia prúžkov DNA. Už tak malý rozdiel, akým je zámena jednej bázy, spôsobí zmenu konformácie a rozdielnu pohyblivosť pri elektroforéze. Táto vysoko citlivá technika zachytáva 100% mutácií vo fragmentoch menších ako 200 báz a 80% mutácií v DNA fragmentoch menších ako 400 báz. Optimálna veľkosť PCR produktu je 150 báz pre detekciu mutácií; väčšie PCR produkty sú vhodné na sledovanie polymorfizmov. Potrebným zariadením je vhodný zdroj napätia, zariadenie pre sekvenčnú gélovú elektroforézu (20 mA, izbová teplota) a niekedy chladená elektroforéza (45 mA, 4°C). Vzhľadom ku jednoduchosti je metóda SSCP veľmi rozšírená ako metóda rýchleho a hrubého skrínungu neznámych mutácií. V súčasnosti existujú aj iné varianty na použitie v genetických analyzátoroch.

5.7.3 DENATURAČNÁ GRADIENTOVÁ GÉLOVÁ ELEKTROFORÉZA

Denaturačná gradientová elektroforéza (DGGE) je metóda, ktorá umožňuje separáciu molekúl DNA v polyakrylamidovom géle na základe odlišnej sekvencie (líši sa v jednom nukleotide). Gél obsahuje lineárny gradient formamidu a močoviny. Dvojvláknová DNA putuje rýchlosťou určenou jej molekulovou hmotnosťou až do doby keď vstúpi do tej časti gélu, kde je taká koncentrácia denaturačných látok, ktorá spôsobí denaturáciu dsDNA na jednovláknové molekuly. Tým sa výrazne zmení jej pohyblivosť v elektroforéze. Konečná pozícia fragmentov DNA v géli závisí teda na denaturačnom bode (*melting*). Fragменты identickej veľkosti môžu byť takto separované na základe odlišnej sekvencie v géloch s gradientom denaturačného činidla. Gély majú fixnú koncentráciu akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid = 37,5:1) v TAE tlmivom roztoku s lineárnym gradientom denaturačného činidla. Používajú sa dva typy DGGE:

- paralelné gély, v ktorých sa zvyšuje koncentrácia denaturačných činidiel lineárne zhora dolu v dvoch samostatných paralelných géloch (prvý 10-50%, druhý 40-80%);
- perpendikulárne gély, v ktorých sa zvyšuje koncentrácia denaturačných činidiel lineárne zľava doprava naprieč gélom. Paralelné gély sú vhodné na vyšetrenie niekoľkých vzoriek, perpendikulárne gély majú na štarte jednu jamku cez celý gél na jednu vzorku. Najčastejšie používaná stratégia je vyšetrenie kľúčovej vzorky v perpendikulárnom géle a potom ostatné vzorky z rodokmeňu v géle paralelnom. Obvykle používaná koncentrácia akrylamidu v tejto aplikácii je 6 - 8%, separuje sa pri konštantnej teplote 60°C, pri napätí 150 V po dobu 6 - 10 hodín. Detekcia sa robí etídiumbromidom. Dnes sú k dispozícii aj varianty DGGE, kde chemický gradient je nahradený teplotným (TTGE). Účinnosť je podobná a technický personál nie je vystavený pôsobeniu karcinogénnych látok (etídiumbromid alebo formamid).

5.7.4 KAPILÁRNA ELEKTROFORÉZA

Alternatívna metóda separácie fragmentov DNA, ktorej výhodami sú minimálna spotreba vzorky (1-2 nl o koncentrácii 5-50 mg.l⁻¹), relatívna rýchlosť a ľahká vizualizácia. Separácia prebieha v lineárnom hydrofilnom polymére v kapiláre (vnútorný priemer 25-50 µm, dĺžka niekoľko cm až 1m) a elektroforetickom tlmivom roztoku podľa molekulovej hmotnosti. Elektroendoosmóza sa využíva na zavedenie vzorky a ďalej je eliminovaná použitím kapilár so špeciálnou úpravou vnútorného povrchu. Na zariadenie je pripojená priama detekcia merania absorpcie pri 260 nm. Typická analýza trvá menej ako 20 minút. Na separáciu jednovláknovej DNA sa používa tlmivý roztok obsahujúci močovinu (7 mol.l⁻¹). Systém umožňuje jednoduché zmeny v zložení tlmivého roztoku.

Po označení nukleových kyselín nasleduje fáza detekcie alebo kvantifikácie. Značenie DNA sa robí metódami enzymatickými alebo priamo chemickou väzbou. V oboch skupinách rozlišujeme značenie rádioaktívne a značenie neizotopové. Enzymatické metódy umožňujú značenie homogénne alebo značenie len 3'-alebo 5'-koncov. Na rádioaktívne značenie sa používajú nukleotidy značené izotopmi (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{14}C , ^{131}I). Neizotopové enzymatické systémy značenia majú rovnakú citlivosť ako rádioaktívne a sú vhodné na automatizáciu. Najpoužívanejšie systémy detekcie sú:

- biotín – protilátka – enzým – substrát,
- biotín – streptavidín – enzým – substrát,
- sulfónová skupina – protilátka – enzým – substrát,
- digoxigenín – protilátka – enzým – substrát,
- fluorescenčný detekčný systém (napr. rodamín).

Vo všetkých týchto systémoch sa používa niektorý z chromogénnych, chemiluminiscenčných alebo fluorescenčných substrátov a enzým je konjugovaný s protilátkou alebo s avidínom. Používajú sa alkalická fosfatáza, peroxidáza, glukozidáza alebo β -galaktozidáza.

Veľmi citlivým spôsobom detekcie je biotinylácia nukleových kyselín a následná špecifická reakcia s modifikovaným avidínom. Biotinylácia sa uskutočňuje arylazidovým derivátom biotínu s následnou fotoaktiváciou. Vzniká vysoko reaktívna skupina, ktorá umožní kovalentnú väzbu biotínu s nukleovou kyselinou. Hybridizácia *in situ* vyžaduje niekedy ešte inaktiváciu endogénneho biotínu (napr. v hepatocytoch).

Často sú tiež používané niektoré metódy priameho značenia založené na fyzikálnych a chemických princípoch väzby s nukleovou kyselinou. Medzi tieto systémy patrí značenie etídiumbromidom, rádioaktívnym jódom alebo farbením striebrom. Možná je tiež kovalentná väzba enzýmu na nukleovú kyselinu. Príkladom je zosilnený chemoluminiscenčný detekčný systém. DNA sa značí priamo peroxidázou, ktorá pôsobí za prítomnosti H_2O_2 na luminol, zosilnenie signálu sa uskutočňuje pomocou derivátov fenolu (napríklad 4-jodofenol). Emitované svetlo sa deteguje na fotografickom filme alebo sa meria na luminometri.

Mnohé detekčné systémy umožňujú rôzne zostavy a v spojení s amplifikačnou reakciou sú tieto metódy vhodné na automatizáciu (napr. technológia *lightCycler*) v sklenených mikrocetrifugačných skúmavkách. *LightCycler* je systém, ktorý umožňuje uskutočniť real-time, on-line PCR kombinovanou s rýchlym cyklovaním pre 96 alebo 384 vzoriek (podľa typu termobloku). Výsledky môžu byť kvantifikované a analyzované súčasne pomocou monitorovania fluorescencie počas amplifikácie nukleových kyselín. Optický systém umožňuje uskutočnenie multiplexnej PCR reakcie pomocou

sekvenčnej špecifickej detekcie za použitia rôznych typov sond (napr. HybProbe sondy, SimpleProbe sondy, hydrolyzačné sondy alebo sondy iného typu). Sekvenčne nezávislá on-line detekcia môže byť uskutočnená pomocou SYBRGreen I farbičky. Analýza kriviek teplôt topenia umožňuje genotypizáciu (detekciu jednonukleotidých polymorfizmov - SNP) pomocou špecifických sond alebo je možné produkt charakterizovať pomocou *High resolution melting dye* (HRM analýza).

5.9 SEKVENOVANIE NUKLEOVÝCH KYSELÍN

Určenie sekvencie (poradia) nukleotidov úseku DNA a RNA o veľkosti niekoľko sto bázach (čo odpovedá napríklad bežne veľkému exónu) sa uskutočňuje najčastejšie na princípe štandardnej Sangerovej metódy (dideoxynukleotidová, ddNTP reakcia) alebo novšie pomocou cyklického sekvenovania na termocykleri bez nutnosti alkalickéj denaturácie. Označené produkty sekvenčnej reakcie sa rozdeľujú na sekvenčnom gély pomocou elektroforézy s vysokým rozlíšením. Pôvodná metóda vyžadovala 4 samostatné sekvenčné reakcie a tiež samostatné delenia elektroforézou pre každý jednotlivý nukleotid. Metóda má štyri fázy:

- hybridizácia primeru k analyzovanému fragmentu DNA,
- označenie primeru,
- predlžovanie primeru o ďalšie komplementárne bázy syntézou pomocou DNA polymerázy,
- ukončenie reakcie inkorporáciou dideoxynukleotidu.

Značenie primerov sa robilo pomocou rádioizotopov. Sekvenačný 5% polyakrylamidový gél je denaturačný (napr. 7 mol.l⁻¹ močovina), obvyčajne 0,3 mm hrubý, separačná vzdialenosť je 50 cm v TBA tlmivom roztoku. Parametre zdroja pre separačnú rýchlosť asi 100 báz za hodinu sú 60 W (1900 V, 45 mA). Moderné sekvenovanie je plne automatizované a používa viacfarebné fluorescenčné značenie v genetických analyzátoroch. Dnes sa teda namiesto rádioaktívneho značenia používa značenie fluoresceínom, namiesto značenia primerov sa používa značenie terminátorov reakcie (ddNTP), reakcia prebieha v termocyklerochoch pomocou *Taq* DNA polymerázy, všetky štyri reakcie je možné uskutočniť v jednej skúmavke a elektroforetické delenie je tiež robené z jednej vzorky. Laserom sprostredkovaná detekcia emisie štyroch rôznych fluorescenčných farieb sa robí pomocou fotonásobiča a veľmi citlivého detektora priamo z gélu (alebo dnes častejšie z polyméru v kapiláre). Počítač riadi posun, fokusáciu, optimálny laserový lúč a vyhodnotenie získaných dát. K dispozícii je špecializovaný program. V súčasnosti existuje niekoľko alternatívnych komerčných systémov, ktoré sú porovnateľné z hľadiska kvality aj výkonnosti.

5.10 BRANCHED DNA

Metóda využívajúca *branched DNA* (bDNA) je amplifikačná metóda, ktorá je zvláštna tým, že po reakcii s cieľovou detegovanou DNA (RNA) prebieha amplifikácia signálu a nie templátu. Táto metóda sa používa napr. na detekciu a kvantifikáciu vírusovej RNA alebo DNA (HIV, HCV, HBV). Systém využíva alkalickú fosfatázu a substrát na chemoluminiscenciu (dioxetan). Signál je priamo úmerný množstvu kópií (molekúl) detegovanej nukleovej kyseliny (počet kópií.ml⁻¹) a meria sa na luminometri.

5.11 NOVÉ METÓDY

Mutácia je zmena sekvencie DNA oproti referenčnej vzorke t.j. štandardnej alele. Táto definícia však neurčuje patogenetický potenciál danej zmeny. Polymorfizmus je naopak mutácia, ktorá sa vyskytuje vo viac ako v 1% obecnej populácie (alebo lepšie vo viacerých nezávislých populáciách), je považovaná arbitrárne za nepatogénnu, avšak jej presný patogenetický potenciál je skôr kontextuálny a uplatňuje sa v komplexnej patogenéze multifaktoriálnych genetických ochorení (aditívny a multiplikatívny efekt).

K technikám detekcie mutácií patrí genotypizácia, t.j. záchyt už známych mutácií (synonymum – skríning) a mutačné skenovanie, t.j. záchyt doteraz neznámych mutácií (napr. SSCP, DGGE). V širšom slova zmysle detekcia mutácií zahŕňa aj vyšetrenie génovej dávky, intragénových prestavieb a metylácie DNA.

U všetkých nových metód sú základnými predpokladmi:

- senzitivita (citlivosť) – t.j. podiel mutácií ktoré je možné v danej vzorke určitou metódou zachytiť,
- špecificita – t.j. podiel falošne pozitívnych nálezov.

Dôležitá je aj cena, technická náročnosť a množstvo vzoriek, ktoré je možné za danú dobu spracovať („*throughput*“). Na zhodnotenie týchto metód je potrebné vypracovať nezávislé stratégie a overiť ich na rozsiahlych súboroch.

5.11.1 GENOTYPIZÁCIA

Základom súčasných genotypizačných metód je PCR analýza dĺžkových polymorfizmov restričných fragmentov (RFLP) a dodnes je stále platnou a veľmi robustnou metódou. Avšak táto metóda je prácna a nedovoľuje spracovanie väčšieho množstva vzoriek naraz. Jedinou možnosťou je využitie tzv. MADGE formátu agarózových gélov, ktoré umožňujú využitie multiplexných pipiet a tzv. šikmý formát elektroforézy. Väzbová analýza sa tiež výrazne zrýchlila použitím STR (*short tandem repeat*) markerov, ktoré sa doteraz používajú aj v nepriamej DNA diagnostike. Veľmi prínosné sú aj pre rozvoj molekulovej cytogenetiky pomocou fluorescenčnej PCR (QF-PCR) na genetických analyzátoroch.

5.11.2 SINGLE NUCLEOTID POLYMORPHISMS

Jednonukleotidové polymorfizmy (*single nucleotide polymorphisms* – SNP) sú dialelické zámeny jednej bázy v ľudskom genóme. Z tohto dôvodu sú menej informatívne ako STR markery, avšak sú viac rozšírené a prevažne veľmi stabilné v rámci ľudského genómu. Pravdepodobne sa viac nachádzajú v nekódujúcich sekvenciách. V súčasnej dobe sa mnoho výskumných laboratórií snaží vytvoriť prehľad existujúcich SNP polymorfizmov („*SNP profiling*“) pre potreby farmakogenetiky a asociačných štúdií multifaktoriálnych chorôb. Avšak verejne dostupné databázy sú bohužiaľ stále nepresné a polymorfný charakter daného SNP polymorfizmu je potrebné vždy overiť v konkrétnej populácii. Ďalšou veľkou výhodou SNP variant je, že vďaka rozsiahlym oblastiam väzbovej nerovnováhy sú „bloky“ (haplotypy) SNP polymorfizmov dedené spoločne, čo uľahčuje typizáciu u multifaktoriálnych ochorení. Nakoniec SNP varianty sú atraktívne z dôvodu ich analýzy pomocou DNA čipovej technológie vrátane ďalších metód ako je ARMS, ktoré je možné účinne automatizovať. K typizácii SNP polymorfizmov sa používajú nasledujúce metódy.

Minisekvenovanie (*minisequencing*) spočíva v pridaní jediného komplementárneho nukleotidu na 3'-konci oligonukleotidového primeru, ktorý hybridizuje k cieľovej DNA bezprostredne k „vyšetrovanému“ nukleotidu. Ide teda o modifikáciu alelovo špecifickej PCR. Pridanie jednej špecifickej (ddNTP) bázy môže byť detegované agarózovou elektroforézou, efektívnejšie je však použitie mnohých dostupných komerčných súprav, ktoré je možné automatizovať a využiť diferenciálne fluorescenčné značenie. Táto metóda dosiahla v súčasnej dobe značného komerčného rozšírenia a je možné ju použiť na multiplexné analýzy veľkého množstva vzoriek, zvlášť u variant, kde primery sú viazané k pevnému podložiu. Existujú aj varianty na použitie mikrotitračných doštičiek, vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie, hmotnostnej spektroskopie, magnetických guľôčok

a hlavne v DNA čipovom formáte, ktorý predovšetkým umožňuje spracovanie veľkého množstva vzoriek v jednej analýze. Avšak u paralelných systémov, t.j. tam kde je analyzované veľké množstvo vzoriek naraz v rámci jednej reakcie (analýzy), je hlavným obmedzením kapacita metódy PCR pre rýchlu amplifikáciu vyšetrovaných vzoriek. Z uvedeného vyplýva, že metóda minisekvenovania je veľmi užitočná a robustná metóda, ktorú je možné použiť v jednoduchých i komplexných diagnostických aplikáciách.

Metóda TaqMan je komerčný systém, ktorý je možný použiť tak pre genotypizáciu ako aj na stanovenie génovej dávky. Zmeny jediného nukleotidu v PCR amplikónoch je možné detegovať špecifickou komplementárnou hybridizáciou sondy, ktorá má pripojený ako fluorochrom, tak aj tzv. zhášač fluorescence („*quencher*“). Pokiaľ dochádza ku špecifickej hybridizácii je *quencher* odštiepený a naviazaný fluorochrom je štandardne detegovaný na základe špecifickej vlnovej dĺžky. Vzhľadom k tomu, že je možné použiť rôzne farebné fluorochromy, je možné využiť tento typ vyšetrenia v multiplexnom formáte a detegovať obe alely príslušného SNP v jednej reakcii.

Molecular beacons (voľne preložené ako „molekulové signály“) sú špeciálne syntetické primery, kde sú fluorochrom aj zhášač v špeciálnej terciálnej štruktúre detekčného primeru. Vo voľnom stave je primer stočený na princípe komplementarity do tvaru pružnej vlasovej sponky („*hairpin*“), t.j. oba voľné konce s fluorochromom a zhášačom sú hneď vedľa seba. Po pridaní cieľovej DNA s komplementárnou sekvenciou dôjde k špecifickej hybridizácii a tým k roztvoreniu vlasovej sponky, a tak k oddialeniu fluorochromu a zhášača čo vedie k vyvolaniu špecifickej fluorescence. Takto je možné napríklad presne rozlíšiť oba nukleotidy SNP polymorfizmu.

Tak metóda *TaqMan* ako aj metóda *molecular beacons* môžu byť použité v rámci detekčných systémov, ktoré sledujú fluorescenciu jednorázovo, alebo priebežne, t.j. v reálnom čase. Na podobnom princípe fungujú aj tzv. **padlock probes** (t.j. sondy, ktoré majú tvar visiaceho zámku vzhľadom k cieľovej sekvencii DNA) a opäť na princípe zmien terciárnej konformácie pri špecifickej hybridizácii emitujú fluorescenciu rôznej vlnovej dĺžky. Zvláštnym tvarom sondy je dosiahnutá vysoká citlivosť.

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) je metóda, ktorá využíva fyzikálne zákony pre štandardnú PCR a PCE v reálnom čase za použitia dvoch oligonukleotidových primerov, keď jeden funguje vďaka naviazaným doménam ako príjemca svetelnej energie, zatiaľ čo druhý ju vysiela. Pokiaľ oba modifikované oligonukleotidy hybridizujú súčasne na cieľovej sekvencii vo vzájomnej tesnej blízkosti, môžu sa obe naviazané domény vzájomne ovplyvňovať na podklade fyzikálnych zákonov. Prvý fluorochrom je excitovaný v špeciálnom termocykleri (*lightcycler*), ktorý umožňuje „presvietiť“ pomocou LED diód PCR proces prebiehajúci v sklenenej mikrocentrifugačnej skúmavke. Zelený fluorochrom aktivovaný pomocou LED „aktivuje“ červený fluorochrom v jeho bezprostrednej blízkosti t.j. vo vzdialenosti piatich nukleotidov, kedy je možné zaznamenať rozdiely vo fázovom posune

vlnovej dĺžky a vďaka interferencii takto sekvenčne špecifických vyžarovaných svetelných signálov. Ďalšie použitie je podobné ako u vyššie uvedených systémov. V poslednej dobe došlo aj k vývoju FRET technológie na báze mikrotitračných doštičiek. U metódy FRET sa však stále overuje jej robustnosť.

Varianty LAR. Detekcia mutácií na podklade špecifickej ligácie (t.j. spojenie dvoch úsekov) DNA využíva vysokú špecificitu ligačnej reakcie na spojenie komplementárnej dvojvláknovej DNA. V DNA diagnostike sa však skôr uplatňuje princíp ligácie „nad“ vyšetrovanou DNA než priamou ligázou sprostredkovanej amplifikácie t.j. LAR. Príkladom je metóda „**oligonucleotide ligation assay**“ (OLA), využívajúca špecifickú ligáciu u dvoch detekčných oligonukleotidov ktoré sú ligázou spojené len pokiaľ vyšetrovaná sekvencia pod ich 5'- a 3'- je presne komplementárna. V spojení s diferenciálnym fluorescenčným značením detekčných oligonukleotidových primerov je možné výslednú ligáciu zaznamenať fluorimetricky. Vďaka použitiu rôzne dlhých syntetických oligonukleotidov je možné uskutočniť štandardnú fragmentačnú analýzu v multiplexnom formáte a tým odlišiť jednotlivé alely. V súčasnej dobe sú vyvíjané paralelné systémy na podklade mikrotitračných doštičiek a kapilárnej elektroforézy, čo umožnilo aj typizáciu inak ťažko vyšetriteľných STR polymorfizmov.

Pyrosekvenácia („pyrosequencing“) je priame sekvenovanie krátkej sekvencie DNA (maximálne do 20 pb) bez nutnosti elektroforézy amplikónu t.j. sekvencia je docielená synteticky. Špeciálna polymeráza využíva uvoľnenie pyrofosfátu (PPi) pri syntéze DNA. Tak dôjde k diferenciálnej emisii luciferázového signálu pri inkorporácii jednotlivých nukleotidov do vyšetrovanej DNA. Veľkou výhodou tohto systému je možnosť charakterizovať sekvenciu okolo vyšetrovaného SNP polymorfizmu, čo zvyšuje diagnostickú presnosť a istotu vyšetrenia zmeny správneho dinukleotidu. Pokiaľ sa do budúcnosti podarí predĺžiť sekvenciu, ktorú bude možné vyšetriť bude pyrosekvenácia predstavovať účinnú alternatívu voči klasickej sekvenčnej reakcii.

Technológia „invader“ je nová a veľmi perspektívna metóda, ktorá využíva tzv. FLAP endonukleázu (FEN) a už spomínaný FRET systém na detekciu rozdielov vo vlnovej dĺžke farieb rôznych fluorochromov. Veľkou a doposiaľ celkom nedopracovaným variantom je použitie tejto technológie bez predchádzajúcej PCR amplifikácie vyšetrovanej vzorky („*invader squared method*“), čo by zásadným spôsobom zvýšilo množstvo potenciálne vyšetrených vzoriek a obmedzilo cenu vyšetrenia.

Nové formy diagnostického využitia komplementárnej hybridizácie DNA

Špecifická hybridizácia DNA – DNA je jednou z prvých metód, ktoré sa skôr používali na genomickú DNA a následne PCR amplikóny. Optimalizácia hybridizácie umožnila, že akékoľvek zmeny SNP môžu byť nájdené pomocou unikátnych 18-24 pb dlhých syntetických oligonukleotidov. Táto metóda sa používa predovšetkým v tzv. reverznej forme kedy k podloži su viazané „detekčné“

oligonukleotidy ktoré po špecifickom naviazaní amplikónov (a vymytí nešpecificky naviazaných amplikónov) vyvolajú následnú kolorimetrickú reakciu *in situ* (dot alebo slot hybridizácia). Tento systém je robustný a stále sa používa napríklad na detekciu mutácií pri cystickej fibróze alebo pri HLA typizácii. Hybridizáciu oligonukleotidov je však možné zaznamenávať aj *v reálnom čase* (*dynamic allele specific hybridization* – DASH) a sledovať dynamiku hybridizácie optickými senzormi alebo fluorescenčne čo umožňuje paralelnú detekciu cieľových sekvencií. Rozšíreniu týchto variant však doteraz bráni ich vysoká cena.

5.12 DNA ČIPY

Metóda alelovo špecifickej hybridizácie sa začala výrazne rozvíjať vďaka novej technológii tzv. DNA čipov (DNA chips/DNA arrays). DNA čipy predstavujú v podstate „miniatúrnú“ verziu pôvodnej metódy dvojdimenzionálnej alelovo špecifickej hybridizácie, kedy dochádza ku fixácii buď vyšetrovanej DNA, alebo detekčných oligonukleotidových primerov na podložie a ku detekcii špecifického signálu pomocou fluorescencie. Inkubačnej (hybridizačnej) fáze zvyčajne podľa potreby predchádza amplifikácia testovanej cieľovej DNA pomocou PCR. Hustota oligonukleotidovej matice (čipu) a jej informačná kapacita je limitovaná priestorovým rozlíšením, v akom môžu byť jednotlivé oligonukleotidové sekvencie na čipe imobilizované, syntetizované a predovšetkým na koniec detegované po hybridizácii. Rozhodujúca je často aj kapacita predchádzajúcej reakcie PCR. Ukazuje sa, že pre DNA čipové metódy je nevyhnutné optimalizovať a štandardizovať metódy izolácie DNA.

Hlavnou výhodou (ale súčasne aj nevýhodou) DNA čipov je miniaturizácia celého detekčného systému. Vyšetrovaná DNA alebo primery sú zvyčajne naviazané na sklo, plast alebo silikónové podložie (priamou adhéziou alebo kovalentnou väzbou prostredníctvom väzobných medzičlánkov) a na odčítanie fluorescencie sú používané špeciálne prístroje („čítačky“). Na dosiahnutie priestorovej citlivej detekcie intenzity emitovanej fluorescencie sa používa špeciálny laserový skener (*epifluorescence confocal scanning microscopy*). Nevyhnutné je tiež použitie špeciálneho softwaru a systému spracovania obrazu. Primery môžu byť naviazané tak zo svojej 3'- strany, ako aj z 5'- strany. Mechanicky pripravené DNA čipy (pomocou prístroja spotter) majú jednotkovú veľkosť okolo 200 mikrónov a sú skenované čítačkami s rozlíšením 5-20 mikrónov. Zvyčajne je takýmto spôsobom dosiahnutých približne 10 – 15 tisíc diagnostických jednotiek na mikroskopické sklíčko. Firma Affymetrix však dosahuje približne dvojnásobné rozlíšenie vďaka patentovanej technológii fotochemickej syntézy oligonukleotidových primerov *in situ* (fotolitografie). Napriek tomu DNA čipové technológie majú zatiaľ pomerne malú senzitivitu, a preto dosiahli hlavne využitie v oblasti génových expresií. Na DNA diagnostiku zatiaľ nedosiahli potrebnú spoľahlivosť, rovnako ak aj pre tzv.

resequencing, metódu DNA čipom sprostredkovanej (re-)sekvenácie menších génov, kedy sú v sérii na DNA čipe naviazané špecifické primery pre každý nukleotid jeho kódujúcej sekvencie.

Meta-analýzy doteraz publikovaných prác nepreukázali vyššiu efektivitu pri skenovaní neznámych mutácií. Hlavným problémom je nastavenie optimálnej citlivosti a teploty „vymytia“ nešpecificky naviazaných segmentov vyšetrovanej DNA v tak malom priestore a v tak vysoko paralelnom prevedení. Stále viac sa totiž ukazuje, že samotná hybridizácia nie je optimálnou metódou na využitie viazanej DNA na detekciu mutácií. Z tohto dôvodu sa pracuje na vývoji DNA čipov, ktoré v druhej fáze detekcie bude citlivosť zvýšená napríklad pomocou metódy primer extension alebo špecifickej ligácie. U mechanicky pripravovaných DNA čipov nie je problémom ukotvenie oligonukleotidu za jeho 5'-koniec čím sa uvoľní jeho 3'-koniec reakciou „*primer extension*“. To však nie je možné u fotochemickej metódy firmy Affymetrix, kde sú oligonukleotidy ukotvené za svoj 3'-koniec. Táto „nepriaznivá orientácia“ nebráni špecifickej ligácii, ale metódy založené na „*primer extension*“ sú preto neaplikovateľné. Tento problém je však možno obísť tým, že reakcia „*primer extension*“ sa uskutoční najskôr v roztoku a až potom sú primery špecificky naviazané prostredníctvom komplementárnej sekvencie na „ukotvené“ segmenty na DNA čipe.

Na podobnom princípe pracuje tzv. technológia *liquichip*, pri ktorej detekcia zmien sekvencie prebieha za pomoci oligonukleotidu viazaného na magnetické guľôčky. Tieto guľôčky potom môžu byť rozdelené na princípe metódy separácie FACS (*fluorescence activated cell sorting*) na prístrojoch rady Luminex. Pokiaľ sa použije až 96 odlišných markerov pre špecificky značené guľôčky, je možné dosiahnuť vysoko paralelných a pritom spoľahlivých vyšetrení na DNA diagnostiku.

Metódy DNA čipov sa neustále a rýchlo vyvíjajú a spresňujú. Existuje mnoho súbežne vyvíjaných systémov, pričom nie je jasné, ktorý z nich dosiahne širokého diagnostického použitia a bude cenovo prijateľný (podobne ako keď v 80-tych rokoch minulého storočia spolu súťažili rôzne systémy na záznam videosignálu alebo teraz využívané vysokokapacitných diskov DVD). Rozhodujúce je tiež, do akej miery pôjde o otvorené systémy, ktoré si zákazník bude môcť sám operatívne prispôsobiť pre svoje aktuálne potreby (čo v súčasnej dobe nie je vždy možné).

5.13 HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA

Hmotnostná spektrometria (MS) je ďalší separačný a detekčný systém. Zavedenie šetrných ionizačných techník, napríklad elektrosprej alebo MALDI („matrix-assisted laser desorption ionization“), umožnilo aplikovať MS na analýzu väčších biomolekúl – DNA. Veľmi perspektívna je tzv. metóda MALDI-TOF („matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“), ktorá sa v ostatných rokoch stala podobne ako DNA čipy ďalšou najviac rozvíjanou metódou predovšetkým na

SNP typizáciu. V súčasnosti sa najviac používa systém TOF v spojení s MS vďaka svojej robustnosti a presnosti odčítavania. To znamená, že jednotlivé nukleotidy (A, T, C, G) sú rozlíšené po ionizácii na základe svojej „dĺžky letu“ (to znamená, nepriamo na základe svojej molekulovej hmotnosti) v inertnom priestore. Unikátna kombinácia MS-TOF s citlivou metódou vyšetrenia SNP pomocou „*primer extension*“ umožňuje veľmi rýchlu, kvantitatívnu a priamu detekciu SNP polymorfizmov (a ďalších mutácií). Je nevyhnutné použiť komplexný softvér a bioinformatické protokoly pri hodnotení dosiahnutých výsledkov. Metóda MALDI-TOF bola použitá na stanovenie SNP polymorfizmov asociovaných s multifaktoriálnymi ochoreniami ako aj vo farmakogenomike. Je veľmi vhodná na celogénové analýzy desiatok tisíc markerov alebo na identifikáciu mutovaných variantov bakteriálnych alebo vírusových patogénov. MALDI-TOF môže byť používaná aj na detekciu doteraz neznámych mutácií, sekvenácií, analýzu metylácie DNA a štúdium génovej expresie. Rozšíreniu tejto metódy bránia vysoké náklady.

5.14 METÓDY NA SLEDOVANIE METYLÁCIÍ DNA

V ľudskom genóme je metylácia daná prítomnosťou 5-metylcytozínu, ktorý sa vo väčšine prípadov nachádza v rámci tzv. CpG dinukleotidov. DNA diagnostika na vyšetrenie abnormálnej metylácie DNA sa zaoberá epigenetickými poruchami imprintingu, inaktíváciou chromozómu X a v niektorých prípadoch aj onkogenézou. Metódy detekcie abnormálnej metylácie zahŕňajú diferenciálne restriktčné štiepenie pomocou enzýmov citlivých na metyláciu cytozínu, diferenciálne štiepenie pomocou špeciálnych chemických zlúčenín (napr. hydrazínu, kedy 5-metylcytozín je odolný jeho pôsobeniu v rámci špeciálne upravenej sekvenačnej reakcii) a diferenciálnu reaktivitu bisulfátu sodného, ktorý deaminuje natívny, ale nie metylovaný cytozín. Ostatný prístup je najrozšírenejší v podobe PCR závislej na metylácii cytozínu, ktorý sa používa na detekciu porúch génového imprintingu. Existujú už aj metódy na kvantifikáciu metylovanej DNA na princípe metódy PCR v reálnom čase.

5.15 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta*. 2006 Jan; 363(1-2):83-94. Epub 2005 Sep 13.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. Measuring the formation and repair of UV damage at the DNA sequence level by ligation-mediated PCR. *Methods Mol Biol*. 2012; 920:189-202.
- Buh Gasparic M, Tengs T, La Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, Zel J, Gruden K.; Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem*. 2010 Mar;396(6):2023-9
- Baretino D. , M Feigenbutz, R Valcárcel, H G Stunnenberg Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis.; *Nucleic Acids Research*; 22(3):541-2.
- De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPLEX Genotyping System. *Mutat Res*. 2005 Jun 3;573(1-2):111-35
- Deiman B, van Aarle P, Sillekens P.; Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA).; *Mol Biotechnol*. 2002 Feb; 20(2):163-79.
- Fahy E, Kwok DY, Gingeras TR.; Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR.; *PCR Methods Appl*. 1991 Aug; 1(1):25-33.
- Gibbs, RA. DNA amplification by polymerase chain reaction. *Ann Chem*, 1990, 62, p. 1202-1214.
- Gingeras TR, Whitfield KM, Kwok DY.; Unique features of the self-sustained sequence replication (3SR) reaction in the in vitro amplification of nucleic acids; .*Ann Biol Clin (Paris)*. 1990; 48(7):498-501.
- Guatelli, JC, Whitfield, KM., Kwok, DY., et al. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a mutienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci LISA*, 1990,87, p. 1874-1878.
- Han SX, Jia X, Ma JL, Zhu Q. Molecular Beacons: A Novel Optical Diagnostic Tool. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Jan 5. [Epub ahead of print]
- Hayashi K, Yandell DW.;How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*. 1993; 2(5):338-46.
- Hayashi K.; PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA.; *PCR Methods Appl*. 1991 Aug; 1(1):34-8.
- Innis, MA Gelfand, DH Sninski, JJ et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990.
- Kim MY, Kim J, Hah SS. Poly(A)-targeting molecular beacons: fluorescence resonance energy transfer-based in vitro quantitation and time-dependent imaging in live cells.; *Anal Biochem*. 2012 Oct 15;429(2):92-8.
- Kramer, FR, Lizardi, PM, Tyagi, S. Qbeta amplification assays. *Clin Chem*, 1992, 38, p. 456-457.
- Kwok DY, Kwok TJ.;Target amplification systems in nucleic acid-based diagnostic approaches.; *Am Biotechnol Lab*. 1990 Oct; 8(13):14-25.
- Kwon SM, Cho H, Choi JH, Jee BA, Jo Y, Woo HG.; Perspectives of integrative cancer genomics in next generation sequencing era.; *Genomics Inform*. 2012 Jun; 10(2):69-73. Epub 2012 Jun 30.
- Langaee, T., Ronaghi, M. Genetic variation analyses by py- rosequencing. *Mutat Res*, 2005, 573, p.96-102.
- Lee AC, Dai Z, Chen B, Wu H, Wang J, Zhang A, Zhang L, Lim TM, Lin Y.; Electrochemical branched-DNA assay for polymerase chain reaction-free detection and quantification of oncogenes in messenger RNA.; *Anal Chem*. 2008 Dec 15;80(24):9402-10
- Macek, M. Jr., Mercier, B., Mackova, A., et al. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Hum Mutat*, 1997, 9, p. 136-147.
- Mann K, Ogilvie CM.; QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenat Diagn*. 2012 Apr; 32(4):309-14.
- Mifflin, TE., Sansieri, CA., Kapp, DW., et al. Characterisation of a rapid method for isolation of genomic DNA suitable for amplification. *J Clin Chem*, 1994, 40, p. 1091-1092.
- Moorthie S, Mattocks CJ, Wright CF. Hugo J.; Review of massively parallel DNA sequencing technologies. 2011 Dec; 5(1-4):1-12. Epub 2011 Oct 27.
- Olerup, O., Zetterquist, H. HLA-DRB1 01 subtyping by allele specific PCR amplification: a sensitive, specific, and rapid technique. *Tissue Antigens*, 1991, 37, p. 197-204.
- Olivier, M. 77/e Invader assay for SNP genotyping. *Mutat Res*, 2005, 573, p. 103-110.
- Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L, Syvänen AC.; Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res*. 1997 Jun; 7(6):606-14.

Prusa, R., Vosmik, M. Extrakce DNA metodou s guanidinyd- rochloridem a uchovdvaní vzorků v DNA bance. *Klin Biochem Metab*, 1996, 25, p. 233-236. .

Reyes AA, Carrera P, Cardillo E, Ugozzoli L, Lowery JD, Lin CI, Go M, Ferrari M, Wallace RB.; Ligase chain reaction assay for human mutations: the Sickle Cell by LCR assay.; *Clin Chem*. 1997 Jan; 43(1):40-4.

Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001 Jan;11(1):3-11.

Saiki, RK., Gelfand, DH., Stoffel, S., et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239, p. 487-491.

SambrookA, J., Fritsch, E Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Vols. 1,2 and 3, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Shi, MM. Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes. *Am J Phar- macogenomics*, 2002, 2, p. 197-205.

Schutzbank, TE., Stern, HJ. Principles and applications of the polymerase chain reaction. *JIFCC*, 1993, 5, p. 96-104.

Syvanen, AC. From gels to chips: »minisequencing« primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat*, 1999, 13, p. 1-10.

Tost, J., Gut, IG. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem*, 2005, 38, p. 335-350.

Zadran S, Standley S, Wong K, Otiniano E, Amighi A, Baudry M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Nov;96(4):895-902

6 TYPY ŠTÚDIÍ VYUŽÍVANÝCH V ONKOLÓGII

Dizajn štúdie a jej voľba je veľmi komplexná problematika. Dizajn je ovplyvnený predovšetkým cieľom štúdie (čo by chcel zadávateľ štúdie dokázať), klinickými aspektmi (akým parametrom je možné splnené ciele štúdie sledovať) a štatistickými aspektmi. Skôr ako začneme pracovať na štúdiu je nevyhnutné aby boli splnené nasledovné požiadavky:

1. Položiť si správnu otázku aký je cieľ štúdie.
2. Zvoliť správny dizajn štúdie, výber správnych metód a nástrojov.
3. Výber študovanej populácie.
4. Voľba miesta, prostredia.
5. Časový plán štúdie.
6. Zdroj financovania a podpory.
7. Analýza a interpretácia údajov, publikácia.

Tabuľka 4 prehľad typov štúdií 1

Klinická experimentálna štúdia (štúdie s terapeutickou intervenciou)		
Štúdie s kontrolou	Paralelná (súbežná) kontrola	Randomizovaná (paralelná) klinická štúdia
		Nerandomizovaná klinická (paralelná) štúdia
	Sekvenčná kontrola	Self-controlled design
		Cross-over design
	Externá alebo historická kontrola (nebezpečenstvo „bias“)	
Štúdie bez kontroly		
Observačné štúdie (štúdie bez terapeutickej intervencie)		
Case-series (deskriptívne) štúdie		
Case-control štúdie (retrospektívne – „Čo sa stalo?“)		
Cross sectional štúdie (prevalencia – „Čo sa deje?“)		
Kohortová štúdia (prospektívna – „Čo sa stane?“)		
Historická kohortová štúdia		

6.1 KLINICKÁ ŠTÚDIA

Klinická štúdia (experimentálna štúdia v humánnej medicíne) je charakterizovaná intervenciou, to znamená terapiou s použitím liečiv, alebo použitím iného terapeutického postupu (napr. rehabilitácia).

Typické delenie klinických štúdií je delenie na **štúdie s kontrolou** a **štúdie bez kontroly**.

6.1.1 ŠTÚDIE S KONTROLOU

Štúdie s kontrolou musia mať aspoň dve ramená (experimentálne a kontrolné). Štandardom v klinickom výskume je randomizovaná klinická štúdia s aspoň jedným experimentálnym ramenom a aspoň jedným kontrolným ramenom, kedy liečba v oboch ramenách prebieha paralelne (súbežne). Všeobecne sa neodporúča použitie tzv. historickej kontroly (to znamená kontroly z inej štúdie) kvôli veľmi pravdepodobnému bias (výchylke, rozdielom medzi skúmanými populáciami a výberom). Jedinou možnosť, ako bias obmedziť je randomizácia.

RANDOMIZÁCIA

Randomizácia znamená náhodné rozdelenie výberu z jednej populácie do dvoch (alebo viac) ramien, to znamená náhodné rozdelenie osôb do kontrolnej a experimentálnej skupiny. V prípade randomizácie je každá disproporcia medzi ramenami (bias) len náhodná a každé rameno by malo mať vyvážené zastúpenie pohlaví, veku, štádia ochorenia a ďalších i nesledovaných rušivých faktorov.

RANDOMIZOVANÁ KLINICKÁ ŠTÚDIA

Randomizovaná štúdia môže byť

- otvorená (pacient aj lekár vie do ktorého ramene štúdie je randomizovaný, tj. aká liečba je použitá),
- jednoducho zaslepená (pacient nevie, ako je randomizovaný liečený, ale jeho ošetrojúci lekár áno),
- dvojito zaslepená (nevie to pacient ani lekár) alebo
- trojito zaslepená (nevie to ani štatistik, ktorý štúdiu vyhodnocuje, ten pozná iba údaj o randomizácii typu A alebo B).

Randomizovaná klinická štúdia je charakterizovaná tým, že liečba v oboch ramenách prebieha paralelne a každý pacient je liečený iba jednou z randomizovaných terapií.

SKRÍŽENÁ ŠTÚDIA (CROSS-OVER DESIGN)

Často používaný je tzv. skrížený (*cross-over*) dizajn, kedy pacient v randomizovanom poradí dostane postupne obe terapie. *Cross-over* dizajn je veľmi výhodný pretože umožňuje posúdiť individuálnu odpoveď každého pacienta na obe liečby a porovnať efekt v prvej a druhej perióde, to znamená posúdiť ako sa efekt liečby mení s časom. Napriek výhodnosti sa *cross-over* dizajn nepoužíva často, nakoľko použitie tohto dizajnu je spojené s problémami, ktoré obmedzujú jeho použiteľnosť:

- Pacient môže byť po prvej perióde už „vyliečený“ a potom by druhá perióda nebola zmysluplná (či etická). Optimálne je, aby bol pacient na začiatku každej z periódy v približne

rovnakom stave. To je možné zaručiť u farmakokinetických štúdií pri pomerne dlhej *wash-out* perióde na vylúčenie účinnej látky z organizmu.

- Etický dôvod - môže sa jednať o vážnu diagnózu a pacientovi, ktorý je zjavne responder na terapiu v prvej perióde, by bolo neetické ju vysadiť a zmeniť na terapiu druhej periódy.
- Príliš dlhý *carry-over* efekt (prenos liečebného efektu prvej periódy aj po vysadení liečby až do druhej periódy) – efekt prvého liečiva by sa miešal s efektom liečiva v druhej perióde.

Výhody a nevýhody skríženej štúdie

- porovnanie účinku na tých istých osobách je presnejší
- vyžaduje menší počet respondentov
- je možné študovať len krátkodobé účinky liečiv, štúdie sú vhodné iba na štúdium chronických stabilných ochorení
- odstúpenie pacientov zo štúdie znižuje kvalitu štúdie
- možnosť nežiaduceho prenesenia účinku liečiva z 1. fázy do 2. fázy štúdie
- poradie podania liečiv môže ovplyvniť ich účinok

REALIZÁCIA KLINICKÝCH ŠTÚDIÍ

Klinické štúdie, ktorých zámerom je testovanie nových liečiv, sa realizujú ako dvojito zaslepené, placebo kontrolovanými pokusmi. Dvojito zaslepený pokus zabraňuje skresleniu výsledkov zo strany meraného subjektu (pacienta) aj zo strany merateľa (lekára). Placebo je neúčinná látka, rovnakého tvaru, farby a chuti ako skúšané liečivo. V prípadoch, kedy nie je možné placebo použiť, porovnávame účinky nového liečiva oproti štandardne používanému liečivu.

FÁZY KLINICKEJ ŠTÚDIE

Po predklinických skúškach v laboratóriu nasleduje:

1. Prvé podanie látky ľudským subjektom - stanovenie vhodnej veľkosti dávky nového liečiva, znášanlivosti a základných údajov pre farmakokinetiku.
2. Zistenie terapeutickkej účinnosti liečiva, overenie vhodnosti zvažovaných indikácií. Registrácia výskytu prípadných nežiaducich účinkov.
3. Fáza potvrdzujúca účinnosť a bezpečnosť liečiva – s veľkým počtom pacientov, často medzinárodný charakter štúdie. Hodnotenie je porovnávacie, buď s placebom, alebo štandardne používaným liečivom. Fáza je podkladom na registráciu nového liečiva.
4. Sledovanie liečiva pri používaní v širokej klinickej praxi vrátane nežiaducich účinkov.
5. Overovanie účinku v ďalších menších štúdiách (často marketingového charakteru).

6.1.2 ŠTÚDIE BEZ KONTROLY

Sú to štúdie, kde napríklad chceme dokázať, že terapeutická odpoveď nastane u väčšieho percenta prípadov, ako je dopredu definované percento (napr. 60%). alebo chceme dokázať, že percento nežiaducich účinkov je menšie ako nejaké dopredu stanovené percento. Myslí sa tým však štatistický významnejší (väčší, či menší)!

6.2 ŠTÚDIE BEZ INTERVENCIE

Sú to štúdie bez akýchkoľvek terapeutických postupov, uplatňujú sa tu však diagnostické postupy napr. biopsie.

Tri základné dizajny týchto štúdií:

1. case-control štúdia (slovenský termín „prípad-kontrola“),
2. kohortová štúdia,
3. prierezová štúdia (*cross-sectional*).

Case-control dizajn porovnáva dve populácie na základe výberu z každej z nich a to prípady (pacienti = cases) a kontroly (porovnávaciu skupinu). Obidva výbery by mali byť vyvážené z hľadiska veku či zastúpenia pohlaví. Aj tak ale môže byť medzi výbermi bias, ktorý nesúvisí s tým, kto patrí medzi prípady a kto medzi kontroly. V *case-control* štúdiách nás zaujíma otázka: „Čo viedlo k tomu, že sa u niekoho vyvinula určitá diagnóza?“ Tento dizajn patrí medzi retrospektívne, používa sa hlavne pri zisťovaní príčin choroby, rizikových faktorov a tiež pri evaluácii (hodnotení) diagnostických postupov.

Retrospektívna štúdia (tiež štúdie prípadov a kontrol). V tomto type štúdií sa testuje hypotéza o možnej príčine ochorenia (vychádzame od ochorenia a ideme naspäť k príčine ochorenia). Vytvoríme dva súbory - súbor osôb s ochorením a súbor osôb bez ochorenia, teda súbor kontrolný. V oboch súboroch zisťujeme (napr. z dokumentácie) podiel osôb, ktoré prišli do styku s daným rizikovým faktorom. Je dôležité správne vytvorenie kontrolného súboru.

Kontrolný súbor je súbor osôb bez ochorenia, a mal by byť výberom z rovnakej populácie, ako súbor sledovaný. Ak tvoria sledovaný súbor pacienti danej nemocnice, vyberáme veľmi často do kontrolného súboru pacientov z tej istej nemocnice, ale s inou diagnózou. Dôvod: ak je sledovaný súbor skreslený oproti základnej populácii (kvalitou bývania, typom zamestnania atď.), bude rovnako skreslený tiež súbor kontrolný.

Metóda párového vyvažovania (*matching*) je spôsob ako dosiahnuť vzájomnú porovnateľnosť sledovaného a kontrolného súboru. Ku každej osobe zo sledovaného súboru hľadáme kontrolu s

rovnakými znakmi (to znamená pohlavím, vekom, zamestnaním, atď.) Používa sa vtedy, ak je rozsah základnej populácie veľký a výbery sú malé.

Výhody a nevýhody retrospektívnej štúdie:

- metóda je lepšie technicky uskutočniteľná a vystačí s menším rozsahom súborov,
- potrebné údaje nemusia byť v dokumentácii k dispozícii,

Príklady retrospektívnych štúdií:

- v súbore osôb s karcinómom pľúc a bez karcinómu zisťujeme fajčenie a prítomnosť ďalších rizikových faktorov;
- štúdium vzťahu medzi vývojovými poruchami u novorodencov a medikáciou matiek v priebehu tehotenstva.

PROSPEKTÍVNA (KOHORTOVÁ) ŠTÚDIA

Na začiatku máme výber z jednej populácie, u žiadnej z osôb zatiaľ nebola diagnostikované ochorenie, ktorého výskyt sledujeme. Vytvoríme dva súbory: súbor osôb so sledovaným rizikovým faktorom a súbor osôb bez rizikového faktoru. Obidva súbory sledujeme v čase a zisťujeme, koľko osôb ochorelo. Časový horizont, ktorého sa týka táto otázka, môže byť veľmi dlhý, aj niekoľko desiatok rokov. Kohortová štúdia sa používa na zistenie príčin ochorenia a nájdenie prognostických (rizikových) faktorov vzniku ochorenia.

Výhody a nevýhody prospektívnej štúdie:

- štúdia umožňuje postupovať od príčiny k dôsledku
- umožňuje plánovať a stanoviť pevné kritériá
- značné nároky na čas a prostriedky
- strata osôb z evidencie pri dlhšie trvajúcim sledovaní
- zmena zvykov a chovania sledovaných osôb

Príklady prospektívnych štúdií

1. prenatálne riziká a atopie v detskom veku. Štúdia závislosti výskytu astmy a atopie u detí s:
 - atopiou v anamnéze matky
 - fajčením matky
 - počtom pôrodov matky
 - konzumáciou antioxidantov (napr. vitamínu E) v tehotenstve.
2. Sledovanie vzťahu medzi typom zamestnania a vývojom varixov.
3. Sledovanie vzťahu medzi fajčením a výskytom rakoviny pľúc

PRIEREZOVÁ (CROSS-SECTIONAL) ŠTÚDIA

Táto štúdia na základe výberu z populácie odpovedá na otázku: “Čo sa deje práve teraz?” Napr. aká je práve teraz incidencia a prevalencia nejakého ochorenia? Často nás tiež zaujíma zastúpenie štádií a foriem ochorenia v populácii v súvislosti s daným ochorením. V ľubovoľnom okamžiku uskutočníme náhodný výber zo základnej populácie – to nám umožní urobiť odhady o podiele chorých osôb a počtu osôb s rizikovým faktorom. Prierezové šetrenie môžeme uskutočniť na štúdii prospektívnej aj retrospektívnej. Príkladom prierezovej štúdie je napr. štúdia MONICA, epidemiologická štúdia zamarená na kardiovaskulárne ochorenia (prebiehala v 21 krajinách Európy). V priebehu 10-tich rokov bol vo všetkých prierezových šetreniach zisťovaný výskyt kardiovaskulárnych rizikových faktorov (fajčenie, DM, vysoký TK, zvýšené triacylglyceroly, porucha metabolizmu lipidov) a úmrtnosť na srdcové a cievne ochorenia. V každom prierezovom šetrení bolo vyšetrených okolo 30 000 mužov a 30 000 žien vo veku 35-64 rokov.

LONGITUDINÁLNA ŠTÚDIA

Longitudinálna štúdia je označenie pre štúdie, v ktorých sú rovnakí respondenti skúmaní, meraní alebo anketovaní opakovane v niekoľkých časových obdobiach – spravidla niekoľko rokov alebo niekoľko desiatok rokov. Štúdie bývajú väčšinou realizované prospektívne. Typickým rysom je prevedenie opakovaných meraní na rovnakých jedincoch.

MULTICENTRICKÁ ŠTÚDIA je štúdia, ktorá prebieha vo viacerých centrách (napr. na klinikách rôznych nemocníc).

6.3 CHYBY V ŠTÚDIÁCH

Výberová chyba (*sampling error*) vzniká v dôsledku toho, že neuskutočňujeme úplné sledovanie, ale skúmame iba výber, teda časť cieľovej populácie.

K **nevýberovej chybe** (*non-sampling error*) dochádza v priebehu procesu merania, zisťovania a spracovania údajov zapríčinených prístrojmi, výskumníkom aj respondentom. Môže byť dôsledkom neúplnosti odpovedí, chybami merania alebo straty už získaných informácií.

Podľa povahy rozlišujeme **náhodné chyby** (*random errors*), ktoré vznikajú nepozornosťou respondenta a pýtajúceho sa a prinášajú tak nadhodnotenie, ako aj podhodnotenie správnej hodnoty znaku a **systematické chyby** (*systematic errors*), ktoré sú naopak výsledkom zle formulovanej otázky alebo meraním nesprávne nastaveným prístrojom a pôsobí vo vzťahu k správnej hodnote vždy len jedným smerom.

Za formálne chyby v údajoch sa považujú také chyby, kedy napr. nefajčiar odpovedá na otázku koľko vyfajčí cigariet, alebo ide o zle formulovanú alebo nejednoznačnú otázku.

6.4 POUŽITÁ LITERATÚRA

- Coupland, C.A.C, Forman, D, Chilvers, D.E.D., Davey, G., Pike, M.C. and Oliver, T.D.; Cancer Causes and Control, 2004; 15: 277 - 283
- Dušek L.: Klinické studie v onkologii - analýza a management dat. V:Obecná onkologie a podporná léčba. Adam Z., Vorlíček J., Kostíková J. (eds), Grada 2003, 745-748
- Green, S.B.: Basics of Clinical Trial Design and Interpretation, American Society of Clinical Oncology , 1999 Educational Book
- Green, S.B.: Interpreting Clinical Trials: A Review, American Society of Clinical Oncology , 2003 Educational Book
- Havránek T.: Statistika pro biologické a lékařské vědy, Academia Praha, 1993. 480s
- Jager, K. J., Stel, V. S., Wanner, C., Zoccali, C., Dekker, F. W.The valuable contribution of observational studies to nephrology. Kidney Int., 2007, 72 (6), 671–675
- Kasal P.: Lékařská informatika, Praha: Karolinum , 1998. 543s
- Libiger J.: Placebo: klamání nemocného nebo nástroj poznání? Psychiatrie 2003; 7(4):290-300.
- Richiardi, R., Pettersson, A. and Arket, O., International journal of andrology, 2007; 30, 230 - 241
- Rosina J., Horák J., Hendrichová M., Krátká K., Vrána A., Živčák J. Statistika v klinické a experimentální medicíně Čas. Lék. čes. 2012; 151: 383-388
- Stel, V. S., Jager, K. J., Zoccali, C., Wanner, C., Dekker, F. W.The randomized clinical trial: An unbeatable standard in clinical research? Kidney Int., 2007, 72 (5), 539–542.
- Tuček, M., et al. Hygiena a epidemiologie. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2025-1.
- Vandenbroucke, J. P.In defence of case reports and case series. Ann. Intern. Med, 2001, 134 (4), 330-334

7 ZÁKLADNÉ ŠTATISTICKÉ UKAZOVATELE POUŽÍVANÉ PRI INTERPRETÁCII VÝSLEDKOV

7.1 P-HODNOTA

p-hodnota je daná arbitrárne (konvenciou) a je vyjadrením sily dôkazu, že nulová hypotéza, ktorá hovorí, že rozdiel v sledovaných parametroch v populácii je nula, je nepravdivá. To znamená, že p-hodnota je vyjadrením sily dôkazu proti nulovej hypotéze. Čím je p-hodnota menšia, tým je silnejší dôkaz, že nulová hypotéza je nepravdivá (teda rozdiel existuje).

Ak $p = 0,05$ znamená to 5 % riziko falošnej positivity (teda zistenie, že rozdiel existuje (nulová hypotéza je nepravdivá), napriek tomu, že neexistuje).

Ak $p = 0,01$ znamená to 1% riziko falošnej positivity (teda zistenie, že rozdiel existuje (nulová hypotéza je nepravdivá), napriek tomu, že neexistuje).

Konvenčne dohodnutá možnosť pochybenia I. typu je menej ako 5 %, t. j. $p \leq 0,05$.

Je potrebné si uvedomiť, že:

- Potenciálne medicínsky dôležité pozorované rozdiely v malých štúdiách, kde p-hodnota je vyššia ako 0,05, sú uzatvárané ako štatisticky nesignifikantné a nie je im venovaná pozornosť. Avšak, nemusí to byť vždy pravda.
- Všetky štatisticky signifikantné nálezy sú považované za výsledok skutočného liečebného efektu, avšak pri p-hodnote 0,05 je v priemere v 1 z 20 prípadov platná nulová hypotéza.
- Všetky štatisticky signifikantné nálezy sú považované za medicínsky dôležité, avšak ak budeme mať dostatočne veľký súbor, bude možné detegovať aj extrémne malý, štatisticky signifikantný rozdiel v sledovanej populácii.

7.2 INTERVAL SPOĽAHLIVOSTI

Okrem p-hodnoty je potrebné si všímať vždy aj interval spoľahlivosti (*confidence interval*). Malý rozdiel nemusí byť klinicky signifikantný, a tak platí, že štatistická signifikancia neznamenať vždy aj klinickú signifikanciu. Tiež platí, že v malých štúdiách, nemusí veľká p-hodnota znamenať, že nulová hypotéza je platná. Takéto štúdie nemajú dostatočnú silu, aby preukázali štatisticky signifikantný rozdiel. Absencia dôkazu však neznamenať dôkaz absencie.

7.3 SILA TESTU

Sila testu (*power*) ($\text{sila testu} = 1 - \beta$) je to schopnosť testu odhaliť rozdiel (napr. medzi štandardnou a experimentálnou liečbou), ak tento rozdiel naozaj existuje. Je to schopnosť správne rozoznať, že nulová hypotéza je nepravdivá. Čím je súbor väčší tým sa sila testu zvyšuje. V klinických štúdiách sa jej hodnota pohybuje v rozpätí 80 – 90 %. Napríklad sila štúdie 85 % znamená že existuje 85% šanca, že štúdia zistí štatisticky signifikantný rozdiel medzi experimentálnou a štandardnou liečbou, ak tento rozdiel skutočne existuje. Jej význam spočíva v tom, že ak máme malú štúdiu s nízkym počtom pacientov a výsledok tejto štúdie je „nesignifikantný“, t.j., že sa nenašiel štatisticky významný rozdiel medzi experimentálnou a štandardnou liečbou, nemusí to znamenať, že tento rozdiel tam nie je. Sila štúdie bola jednoducho nedostatočná na to, aby existujúci rozdiel odhalila. Zvýšením počtu pacientov sa zvýši sila štúdie, a teda aj pravdepodobnosť, že ak existuje rozdiel medzi efektivitou skúmaných liečebných postupov, tak štúdia ho odhalí. Tiež z tohto dôvodu rôzne subanalýzy súboru uskutočnené pri vyhodnocovaní štúdie nemajú väčšinou dostatočnú silu na zistenie existujúceho rozdielu. aj z tohto dôvodu sú výsledky *post hoc* (potom) subanalýz len hypotézy generujúce. Napríklad pri vyhodnocovaní štúdie skúmajúcej efektivity adjuvantnej chemoterapie podľa schémy FAC (5-FU, doxorubicín a cyklofosfamid) sa na konci uskutoční subanalýza u pacientok nad 70 rokov. Keďže týchto pacientok bolo málo zaradených do štúdie, nepozorujeme signifikantný vplyv chemoterapie na ich prežívanie. Vzhľadom na nízky počet pacientov nevieme povedať, či je to prejav nedostatočnej efektivity chemoterapie, alebo je to spôsobené nedostatočnou silou testu.

7.4 INTERVAL SPOĽAHLIVOSTI

Interval spoľahlivosti (*confidence interval, CI*) hovorí s určitou pravdepodobnosťou, že určitý parameter leží medzi dvoma limitmi. 95 % CI hovorí, že s 95 % pravdepodobnosťou sa daná hodnota nachádza v uvedenom intervale. Obdobne 90 % CI hovorí, že s 90 % pravdepodobnosťou sa daná hodnota nachádza v uvedenom intervale.

7.5 RELATÍVNE (POMERNÉ) RIZIKO (RELATIVE RISK, RISK RATIO, RR)

Každá zo štúdií overuje určitú hypotézu. Pri štúdiu príčin ochorení overujeme hypotézu, či počet jednotlivcov v jednej skupine voči druhej nie je väčší v porovnaní s počtom, ktorý by bolo možné očakávať, keby tieto dve udalosti nemali súvis. Inými slovami, ak by sme v niektorom návrhu štúdie príčiny ochorenia zistili, že v oboch skupinách je rovnaký počet jedincov, potom by sme to považovali za stav, kedy sa nevyskytol vplyv nami sledovaného faktoru.

RR je teda pomerom rizík v jednotlivých liečebných ramenách. Ako príklad môžeme sledovať aký je pomer rizika vzniku kolorektálneho karcinómu v experimentálnom ramene, teda v ramene, kde pacienti dostávali kapecitabín a rizika vzniku kolorektálneho karcinómu v kontrolnom ramene, kde pacienti dostávali placebo. (EER = miera udalostí experimentálnej liečby, CER = miera udalostí kontrolnej liečby). Udalosťou v našom prípade je teda vznik kolorektálneho karcinómu. $RR = EER/CER$. V našom prípade $RR = 0,35/0,4 = 0,875$. Ak je číslo menšie ako jedna, to znamená že riziko v experimentálnom ramene je nižšie ako v ramene kontrolnom (avšak v čitateli musí byť samozrejme EER).

7.6 ODDS RATIO, OR

Odds ratio, OR – pomer pravdepodobnosti (šance) – je to podiel frekvencie, s ktorou sa daný jav vyskytuje k frekvencii s ktorou sa nevyskytuje. Namiesto pravdepodobnosti môžeme teda použiť aj inú mieru - šancu (odds). Šanca je podiel počtu všetkých výsledkov priaznivých pre tento jav a počtu všetkých nepriaznivých (pravdepodobnosť je počet priaznivých voči všetkým možným výsledkom). Pravdepodobnosť javu sa pohybuje medzi nulou a jednotkou. Šanca sa pohybuje medzi nulou a nekonečnom, pri čom, ak je šanca väčšia ako nula, sa jav skôr uskutoční. Pokiaľ je šanca javu menšia ako jedna, potom sa jav skôr neuskutoční. Rovnako, ako pri relatívnom riziku aj v tomto prípade hovoríme o odhade jeho hodnoty, vzhľadom na to, že pracujeme z údajmi z výberového súboru a nie z celej populácie. Napriek tomu, sa v určitých prípadoch dáva prednosť výpočtu RR pred OR. Uvedme si niekoľko prípadov, kedy je výhodné túto prednosť uplatniť:

- pomer šancí môže vždy nadobúdať hodnotu medzi nulou a nekonečnom, čo relatívne riziko nemôže;
- pomer šancí má tiež vlastnosť symetrie, t.j. keď vymeníte medzi sebou stĺpce, potom bude výsledkom recipročná hodnota pomeru šancí. To však v žiadnom prípade neplatí o relatívnom riziku. Je to veľkou výhodou najmä pri interpretácii výsledkov. Ako náhle v retrospektívnych (kontrolovaných) štúdiách sami určujeme, kto bude tvoriť kontrolnú skupinu a tým aj veľkosti skupín, nie sme oprávnení usudzovať, že získané pomery sú odhadom rizika. Sme oprávnení sa domnievať, že pomery šancí zodpovedajú relatívnemu riziku. Inými slovami, v prospektívnych štúdiách používame ako mieru asociácie RR, v retrospektívnych štúdiách používame OR výhradne ako mieru vzťahu príčiny a efektu.
- pri práci so sprievodnými parametrami, používajúc logistickú regresiu, táto poskytuje výsledky vo forme pomeru šancí.

Na predchádzajúcom príklade je to pomer „šance“ (odds) objavenia sa verzus neobjavenia sa kolorektálneho karcinómu v jednom verzus v druhom liečebnom ramene

$$OR = (b/d)/(a/c)$$

$$OR = (35/65)/(40/60) = 0,54/0,66 = 0,82$$

V prípade, že sa OR rovná jednej, tak sú „šance“ v oboch ramenách rovnaké.

OR je vždy viac vzdialené od hodnoty 1, ako RR, teda ak $RR > 1$, potom $OR > RR$ a ak $RR < 1$, potom $OR < RR$. V prípade zriedkavo sa vyskytujúcich udalostí je OR približne rovnaké s RR. V prípade, že sa udalosť vyskytuje pomerne často, môžu byť analýzy založené na výpočte RR postihnuté chybami výpočtu, ale tieto nevznikajú pri výpočtoch OR. V prípade OR sú závery rovnaké, či berieme do úvahy udalosť ako výskyt alebo absenciu udalosti. OR sa udávajú preferenčne v štúdiách typu „case-control“.

V praxi sa v publikáciách môžeme stretnúť ešte s nasledujúcimi termínmi:

Hazard function – v praxi je odhadnutý ako proporcia pacientov, u ktorých nastane udalosť (zomrú, majú rekurenciu a pod.) v určitom časovom intervale k počtu pacientov, ktorí prežijú čas t bez vzniku tejto udalosti.

H (t) = počet zomrelých za časovú jednotku v intervale/počet prežívajúcich čas t .

Hazard ratio, HR – meria relatívny efekt liečby, je to vlastne miera zlyhania (failure rate) nejakej liečby.

HR = miera zlyhania novej liečby/miera zlyhania štandardnej liečby. Ak $HR < 1$ preferuje novú liečbu. Ak $HR > 1$ preferuje štandardnú liečbu. Ak $HR = 1$ medzi liečbami nie je rozdiel.

Napríklad HR 0,875 znamená, že miera udalostí je v experimentálnom ramene je o 12,5 % nižšia $(1 - HR) * 100 \%$, teda $(1 - 0,875) * 100 \%$ v porovnaní so štandardnou liečbou. Rozdiel $(1 - HR)$ je zároveň i relatívnou redukciou rizika.

7.7 ŠTATISTICKÉ OPERÁCIE POUŽÍVANÉ PRI ANALÝZACH S RÔZNOU DĹŽKOU SLEDOVANIA PACIENTOV

Zjednodušene povedané, pacienti, u ktorých počas sledovania nenastala hodnotená udalosť, sú „cenzorovaní“ k dátumu poslednej kontroly a neberú sa do úvahy pri hodnotení za týmto časom. Teda za časom poslednej kontroly nevieme, či udalosť nastala. Napríklad, analýza výsledkov štúdie je uskutočnená k určitému dátumu. Pacient, ktorý bol zaradený do tejto štúdie pred 6 mesiacmi, ale stále žije, je cenzorovaný k dátumu analýzy a teda jeho údaje o prežívaní sa uplatňujú len počas prvých 6 mesiacov krivky prežívania. Na následný tvar tejto krivky, napríklad v čase 8 mesiacov a viac, prežívanie tohto pacienta nemá vplyv.

Celkové prežívanie (*overall survival – OS*) – do analýzy sú zahrnutí všetci pacienti v súbore. Udáva sa najčastejšie od začiatku liečby a trvá do dátumu úmrtia pacienta z akejkoľvek príčiny alebo poslednej kontroly. Smrť z akejkoľvek príčiny sa považuje za udalosť.

Pacienti, ktorí žijú sú cenzorovaní od dátumu poslednej kontroly. Pacienti, ktorí sa stratili zo sledovania sú tiež cenzorovaní. Keďže u týchto pacientov ide o takzvaný neinformatívny cenzor, malo by ich byť pri analýze čo najmenej, resp. vždy by sme sa mali snažiť zistiť, čo sa stalo s takýmto pacientom. Ak je takýchto pacientov veľa, môžu skresliť výsledky štúdie, preto sa v štúdiách toleruje strata sledovania väčšinou do 10 – 15 %. Podľa ACP Journal and Evidence-Based Medicine Maximálna tolerovateľná strata zo sledovania je 20 %.

Toto platí pre akúkoľvek časovú udalosť – TTF (čas do zlyhania liečby), DFS (prežívanie bez choroby) a pod. Celkové prežívanie udáva šancu prežiť určitý časový úsek pre skupinu pacientov. Prežitie sa často udáva vo forme mediánu. Medián celkového prežívania udáva časový úsek, ktorý prežíva polovica pacientov v súbore. Medián prežitia 14 mesiacov znamená, že polovica pacientov žije menej ako 14 mesiacov a polovica pacientov prežíva viac ako 14 mesiacov. Ak v súbore prežíva viac ako polovica pacientov, tak nie je možné udať medián prežitia. Najčastejšou príčinou je buď krátke sledovanie alebo u kuratívnych malignít (lymfómy, adjuvantná liečba) vysoké percento vyliečených pacientov. V tom prípade je vhodnejšie uviesť prežívanie za určitý časový úsek a zároveň uviesť medián sledovania súboru. Pri mediáne sledovania 15 mesiacov je 1-ročné prežívanie 80 %. To znamená to, že 80 % pacientov v súbore prežíva viac ako 1 rok.

Keďže celkové prežívanie sa hodnotí od začiatku liečby do smrti pacienta, podieľa sa na jeho výslednej dĺžke nielen sledovaná liečba, ale i následné liečby (ďalšie línie), ako aj smrť z iných príčin. Preto, ak je významný rozdiel medzi časom do progresie a celkovým prežívaním, treba vždy zvážiť, či ide o efekt hodnotenej liečby (napr. terapia zmenou biológie nádoru zvýši/zníži jeho agresivitu, napr. v prípade karcinómu močového mechúra), alebo ide o vplyv následnej terapie.

Špecifické prežívanie pre nádor (*cancer-specific survival – CSS*) – udáva sa od začiatku liečby a trvá do dátumu úmrtia pacienta na rovnaký (primárny) nádor alebo do dátumu poslednej kontroly. Smrť spôsobená onkologickou liečbou, sekundárnou malignitou alebo nenádorovou príčinou je cenzorovaná. Veľmi toxická liečba, spojená s vysokou mortalitou počas liečby (napr. transplantácia kostnej drene, TKD), alebo spojená s vysokým výskytom sekundárnych malignít môže mať dobré výsledky čo sa týka CSS, kým OS môže byť rovnaké, alebo dokonca horšie (napr. TKD u niektorých lymfómoch). Podobne liečba spojená s vysokým výskytom kardiovaskulárnych (KVS) úmrtí môže mať dobrý CSS bez vplyvu na celkové OS. Pri indolentných nádoroch vo vyššom veku, ako napríklad pri karcinóme prostaty, zase iné príčiny smrti (zvyčajne KVS) kompetujú so smrťou spôsobenou

nádorom. Z tohto dôvodu je potrebné vždy okrem CSS sledovať i OS ako parameter efektivity novej liečby.

Čas do zlyhania liečby (*time to treatment failure – TTF*) – udáva sa od začiatku liečby do dátumu akejkoľvek udalosti (okrem smrti z inej príčiny ako nádor), alebo do dátumu ostatnej kontroly. Na rozdiel od TTR (čas do relapsu, viď nižšie) ako udalosť hodnotí aj sekundárne malignity. Pri efektívnej liečbe, ale spojenej so závažnými nežiaducimi účinkami (v dôsledku čoho časť pacientov liečbu predčasne ukončí) môže parameter TTF na rozdiel TTF (čas do progresie, viď nižšie) nadhodnocovať účinok liečby.

Prežívanie bez choroby (*disease free survival – DFS*) – hodnotí sa len u pacientov v kompletnej remisii. U pacientov v adjuvatných štúdiách sa hodnotí od začiatku liečby, u pacientov s metastatickým nádorom sa hodnotí od dátumu dosiahnutia kompletnej remisie do vzniku akejkoľvek udalosti.

Prežívanie bez relapsu (*relapse-free survival – RFS*) – udáva čas do akejkoľvek udalosti s výnimkou sekundárnych nádorov. Za udalosť sa považuje rekurencia rovnakého nádoru ako aj smrť z akejkoľvek príčiny. Sekundárne nádory sa ignorujú, pacienti stratení zo sledovania sa cenzorujú.

Čas do relapsu (*time to recurrence – TTR*) – hodnotí sa od začiatku liečby do relapsu, či už lokoregionálneho alebo vzdialeného. Taktiež smrť spôsobená rovnakým nádorom sa považuje za udalosť. Sekundárne nádory, smrť spôsobená iným nádorom, smrť spojená s liečbou alebo smrť z inej príčiny ako nádor sa cenzoruje.

Okrem uvedených definícií sa v klinickej praxi môžeme stretnúť aj s ďalšími:

Prežívanie bez udalosti (*event free survival – EFS*) – udáva čas od začiatku liečby do akejkoľvek udalosti podľa typu štúdie (môže to byť napríklad zlomenina pri liečbe hodnotiacej efektivitu bisfosfonátov, alebo iná klinicky významná udalosť – progresia, rekurencia). EFS sa počíta predovšetkým pri štúdiách, ktorých cieľom je zistiť efektivitu liečby nie na celkové prežívanie ale na oddialenie alebo zabránenie špecifickej komplikácie spojenej z chorobou. V niektorých štúdiách je definícia zhodná s DFS (viď vyššie).

Prežívanie bez progresie (*progression-free survival – PFS*) – udáva sa od začiatku liečby do progresie ochorenia alebo smrti pacienta. Jej výhodou je väčšinou dobrá korelácia s celkovým prežívaním, ako aj to, že nie je ovplyvnený nasledujúcou liečbou. Keďže k progresii ochorenia dochádza skôr ako ku smrti, môže slúžiť PFS ako náhradný (*surrogate*) cieľ pri nádoroch, kde by na vyhodnotenie OS bolo potrebné dlhé sledovanie pacientov alebo veľmi vysoký počet pacientov. Môže sa tiež použiť u metastatického ochorenia a pri nádoroch s pomalým rastom, ktoré je problémom vyliečiť ako

napríklad indolentné lymfómy. Používa sa tiež pri paliatívnej liečbe, kde cieľom nie je vyliečenie ale kontrola choroby. Ako udalosť sa hodnotí opäť smrť akejkoľvek príčiny.

Čas do progresie (*time to progression* – TTP) – podobný ukazovateľ ako PFS, ale cenzorovaní sú pacienti, ktorí zomreli na nádor, inú malignitu (u metastatického ochorenia zriedkavé) ako i pacienti, ktorí zomreli na komplikáciu liečby, alebo zomreli z neonkologickej príčiny. V prípade, že väčšina úmrtí pacientov je spôsobená neonkologickou príčinou je TTP vhodným cieľom štúdie, v opačnom prípade je PFS preferenčným cieľom štúdie.

Trvanie odpovede (*response duration* – RR) – u metastatického ochorenia udáva čas od dosiahnutia odpovede do progresie choroby alebo smrti pacienta pre nádorové ochorenie. Cenzorovaní sú pacienti, ktorí zomreli z inej príčiny ako nádor, alebo zomreli na toxicitu liečby. Do analýzy sú zahrnutí len pacienti, ktorí dosiahli objektívnu odpoveď (kompletnú, alebo parciálnu remisiu). Ak len malé percento pacientov dosiahne objektívnu odpoveď a táto je spojená s dlhším prežitím, môže nás tento údaj nadhodnotiť skutočnú efektivitu liečby.

Objektívna odpoveď (*objective response rate* – ORR) – je definovaná ako proporcia pacientov s redukciou veľkosti tumoru trvajúca minimálny definovaný čas (väčšinou 4 týždne podľa RECIST a WHO kritérií). ORR je priamy dôkaz antitumorovej aktivity liečby a môže byť vhodným cieľom väčšinou v nerandomizovanej štúdií fázy II, keďže existuje korelácia medzi ORR a klinickým benefitom. Keďže korelácia medzi ORR a ďalšími cieľovými parametrami (napr. OS, TTP) nie je dostatočná, ORR nie je vhodným cieľom v štúdiách fázy III, aj keď sa jednoducho vyhodnocuje bez potreby dlhého sledovania pacientov. Stabilizácia nie je súčasťou ORR, keďže môže odrážať aj prirodzený priebeh choroby a nie efekt liečby.

Čas sledovania (*follow-up*) – začína dňom zaradenia pacienta do štúdie a končí dňom, kedy u pacienta dôjde ku vzniku udalosti, stratí sa zo sledovania, alebo sa obdobie sledovania skončí.

7.8 POUŽITÁ LITERATÚRA

Badenoch, D. and Heneghan, C. Evidence-based Medicine Toolkit. BMJ Books 2002. BMJ Publishing Group

Kirkwood, B.R. and Sterne, J.A.C. Medical Statistics. 2nd Edition. 2003 by Blackwell Science Ltd.

Mego M, Rečková M. Úvod do interpretácie klinických štúdií (3.časť). Onkológia, 2008, 3 (4): 241–243

Rečková, M. Mego, M. Úvod do interpretácie klinických štúdií (2.časť). Onkológia, 2008, 3 (3): 178–181

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

AA	kyselina arachidonová	NADP ⁺ , NADPH	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát (oxidovaná a redukovaná forma)
ACTH	adrenokortikotropín	NOS	reaktívne formy dusíka (Reactive Nitrogen Species)
AFLP	dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov	NSE	neurón špecifická enoláza
AFP	α-fetoproteín	OK	okultné krvácanie
ALA	kyselina alfa-linolová	OLA	Oligonucleotide ligation assay
ALP	alkalická fosfatáza	ORR	objektívna odpoveď (Objective Response Rate)
ASO	alelovo špecifické oligonukleotidy	OS	celkové prežívanie (Overall Survival)
AS-PCR	alelovo špecifická PCR	PACP	prostatická kyslá fosfatáza
ATP	adenozíntrifosfát	PAGE	polyakrylamidová elektroforéza
B ₂ -M	beta ₂ -mikroglobulín	PET	pozitrónová emisná tomografia
BCAA	rozvetvené aminokyseliny	PFS	prežívanie bez progresie (Progression-Free Survival)
DNA	deoxyribonukleová kyselina	PG	prostaglandíny
bdDNA	rozvetvená DNA (branched DNA)	PGE ₂	prostaglandín E ₂
BPTES	bis-2-[5-fenylacetamido-1,2,4-tiodiayol-2-yl]etyl sulfid	PPI	pyrofosfátu
cAMP	3',5'-cyklický adenosínmonofosfát	PSA	prostatický špecifický antigén
CEA	karcinoembryonálny antigén	PUFA	polyénové mastné kyseliny (Polyunsaturated Fatty Acids)
CSS	špecifické prežívanie pre nádor (Cancer-Specific Survival)	RFLP	dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov
CTC	cirkulujúce nádorové bunky	RFS	prežívanie bez relapsu (Relapse-Free Survival)
DASH	dynamic allele specific hybridization	RNS	reaktívne metabolity dusíka
DFS	prežívanie bez choroby	ROS	reaktívne formy kyslíka (Reactive Oxygen Species)
DFS	prežívanie bez choroby (Disease Free Survival)	RR	relatívne (pomerné) riziko (Relative Risk, Risk Ratio)
DGGE	denaturačná gradientová elektroforéza	RR	trvanie odpovede (Response Duration)
DHA	kyselina dokozahexaénová	SCCA	antigén skvamózných buniek
EFS	prežívanie bez udalosti (Event Free Survival)	SNP	jednonukleotidový polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorphisms)
EPA	kyselina ekozapentaénová	SREBP1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
FACS	fluorescenčne aktivovaná separácia buniek (Fluorescence Activated Cell Sorting)	SSCP	metóda analýzy jednovláknového polymorfizmu
FAD	flavínadenín dinukleotid	SSPR	Single Strain Producing Reaction
FASN	syntáza mastných kyselín (Fatty Acid Synthase)	STR	Short Tandem Repeats
FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxy-D-glukóza	TATI	s tumorom asociovaný trypsínový inhibítor
FISH	fluorescenčná in situ hybridizácia	TEMED	tetrametyléndiamín
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	TG	triacylglyceroly
g-FOBT	guajakové testy	TK	tymidínkináza
hCG	ľudský choriový gonadotropín	TKD	transplantácia kostnej drene
HIOK	kyselina 5-hydroxyindolactová	TNF	tumor nekrotizujúci faktor
HR	Hazard Ratio	TPA	tkanivový polypeptidový antigén
i-FOBT	imunochemické testy	TTF	čas do zlyhania liečby (Time to Treatment Failure)
IL-1, 6	interleukín 1,6	TTP	čas do progresie (Time To Progression)
K ₂ EDTA	dvojdraselná soľ kyseliny etyléndiamínotetraoctovej	TTR	čas do relapsu (Time To Recurrence)
KVS	kardiovaskulárny systém	VNMK	vysoko nenasýtené mastné kyseliny
LA	kyselina linolová	VNTR	variabilný počet tandemových opakovaní
LCM	laserová mikrodisekcia (Laser Capture Microdissection)		
LCR, LAR	ligázová reťazová reakcia (Ligase Chain Reaction)		
LD	laktátdehydrogenáza		
LMF	lipidy mobilizujúci factor		
LPL	lipoproteínová lipáza		
MALDI-TOF	hmotnostná spektrometria		
MCA	antigén mucinózných karcinómov		
MK	mastné kyseliny		
MS	hmotnostná spektrometria		
MSA	mamárny sérový antigen		
NAD ⁺ , NADH	nikotínamid dinukleotid (oxidovaná a redukovaná forma)		