

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**



FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Veronika Vrbková**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z PLAZMY PRO  
DIAGNOSTIKU PACIENTŮ S MELANOMEM**

**Bakalářská práce**

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

PLZEŇ 2021

# ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika VRBKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z18B0301P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Izolace nukleových kyselin z plazmy pro diagnostiku pacientů s melanomem**  
Zadávací katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- RAPLEY, Ralph a David L. MANNING, ed. Methods in Molecular Biology: RNA Isolation and Characterization Protocols. United States: Humana Press, 1998, 264 s. ISBN 0-89603-393-7
- FORETOVÁ, Lenka, Eva MACHÁČKOVÁ, Jana ŠMARDOVÁ a Jitka PACHOLÍKOVÁ. Molekulární biologie a genetika nádorů. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3324-1
- BROWN, T. A. Klonování genů a analýza DNA: úvod. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. ISBN 978-80-244-1719-6
- AUSUBEL, Frederick M. a Robert E. KINGSTON. Short Protocols in Molecular Biology. Fourth Edition. United States: John Wiley, 1999, 1104 s. ISBN 978-0-471-32938-1

Vedoucí bakalářské práce:

**Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.**

Katedra záchranářství, diagnostických oborů  
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



---

**PhDr. Lukáš Štich, MBA**  
děkan



---

**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 3. 2021

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Vrbková Veronika

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Izolace nukleových kyselin z plazmy pro diagnostiku pacientů s melanomem

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

Počet stran – číslované: 42

Počet stran – nečíslované: 39

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 37

Klíčová slova: MikroRNA, melanom, izolace, plazma

Souhrn:

Cílem této práce bylo zjistit, zda je kolonková metoda se silikátovou membránou vhodná pro izolaci molekul mikroRNA z plazmy pacientů léčených pro melanom a zda poskytuje dostatečný výtěžek pro diagnostické a prognostické stanovení pacientů. Pro izolaci molekul miRNA z plazmy získané z plné krve byla použita souprava značky Qiagen a parametry izolované RNA (koncentrace a čistota) byly měřeny na přístroji Nanodrop 1000.

Práce je rozdělena do části teoretické a praktické. V teoretické části je popsána patogeneze nádorového onemocnění a charakteristické znaky maligně transformovaných buněk. Dále je v této části kapitola zaměřující se na druhy rakoviny kůže, podrobněji pak na samotný melanom. Ke konci teoretické části je popsána miRNA a její vztah k rakovině, metody stanovení těchto molekul a koncept tekuté biopsie.

Praktická část začíná definováním cílů a metodikou práce. Dále je podrobný popis izolace nukleových kyselin na silikátovém povrchu. Následuje analýza a vyhodnocení výsledků a statistické vyhodnocení naměřených hodnot. Bakalářská práce je zakončena diskusí metodických problémů a výsledků.

## **Abstract**

Surname and name: Vrbková Veronika

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Isolation of nucleic acids from plasma for the diagnosis of patients with melanoma

Consultant: Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Number of pages – numbered: 42

Number of pages – unnumbered: 39

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 37

Keywords: MicroRNA, melanoma, isolation, plasma

Summary:

The aim of this work was to determine whether the column method with silicate membrane is suitable for the isolation of microRNA molecules from the plasma of patients treated for melanoma and whether it provides sufficient yield for diagnostic and prognostic determination of patients. A Qiagen kit was used to isolate miRNA molecules from plasma obtained from whole blood, and the parameters of the isolated RNA (concentration and purity) were measured on a Nanodrop 1000 instrument.

The bachelor thesis is divided into theoretical and practical part. The theoretical part describes the pathogenesis of cancer and the characteristics of malignantly transformed cells. In this part there is a chapter too focusing on the types of skin cancer, in more detail on the melanoma itself. At the end of the theoretical part is miRNA and its relation to cancer, the concept of liquid biopsy and methods for the determination of these molecules are described.

The practical part begins with the definition of objectives and methodology of the work. The following is an analysis and evaluation of the results and a statistical evaluation of the measured values, which are part of the appendix. The bachelor thesis ends with a discussion of methodological problems and results.



## **Předmluva**

Cílem této bakalářské práce byla izolace RNA z plazmy krve pacientů v léčení pro melanom pro výzkum markerů časně detekce recidivy a zhodnocení výtěžku izolované RNA včetně porovnání předoperačních a pooperačních hodnot výtěžků. Celkově jsem izolovala ze 732 vzorků plné krve celkovou RNA, následně jsem měřila čistotu, koncentraci a kvalitu takto izolované RNA pro posouzení, zda je vhodná pro stanovení mikroRNA a zhodnocení výtěžků. Sledování recidivy pacientů léčených pro melanom pomocí molekulárně genetických metod by mělo pomoci jejímu včasnému záchytu.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu doc. RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, poskytnutí materiálních podkladů, cenné připomínky a odborné rady. Také děkuji za vstřícnost, čas, který mi věnoval a podporu během psaní této práce.

Dále bych chtěla poděkovala RNDr. Kateřině Houfkové, Ph.D. a Mgr. Bc. Tereze Macánové za vstřícnost, materiální podklady a odborný dohled při práci v laboratoři. PharmDr. Václavě Černé děkuji za vypracování statistických grafů.

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| SEZNAM GRAFŮ .....   | 12 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ .....   | 13 |
| SEZNAM TABULEK .....   | 14 |
| SEZNAM ZKRATEK .....   | 15 |
| ÚVOD.....  | 18 |
| TEORETICKÁ ČÁST .....  | 19 |
| 1 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ .....                           | 19 |
| 1.1    Obecná definice nádoru .....                                | 19 |
| 1.2    Charakteristické znaky maligně transformovaných buněk.....  | 19 |
| 1.2.1    Soběstačnost v produkci růstových signálů.....            | 20 |
| 1.2.2    Necitlivost k signálům zastavujících buněčný cyklus ..... | 20 |
| 1.2.3    Poškozená aktivace apoptózy .....                         | 21 |
| 1.2.4    Neomezený replikační potenciál .....                      | 22 |
| 1.2.5    Posílení angiogeneze .....                                | 22 |
| 1.2.6    In vazivita a tvorba metastáz .....                       | 23 |
| 1.3    Onkogeny a tumorsupresory.....                              | 24 |
| 2 RAKOVINA KŮŽE .....  | 26 |
| 2.1    Melanom.....  | 26 |
| 2.1.1    Povrchově se šířící melanom.....                          | 28 |
| 2.1.2    Nodulární melanom .....                                   | 29 |
| 2.1.3    Lentigo maligna melanom .....                             | 29 |
| 2.1.4    Akrolentiginózní melanom .....                            | 29 |
| 2.2    Bazocelulární karcinom.....                                 | 29 |
| 2.3    Spinocelulární karcinom.....                                | 30 |
| 2.4    Karcinom Merkelových buněk .....                            | 30 |
| 3 MIKRORNA.....  | 32 |
| 3.1    Biogeneze mikroRNA .....                                    | 32 |
| 3.2    MikroRNA a karcinogeneze .....                              | 33 |
| 4 TEKUTÁ BIOPSIE .....   | 34 |
| 4.1    cfDNA .....   | 35 |
| 4.1.1    Analýza cfDNA a RNA.....                                  | 35 |
| 4.2    Cirkulující mikroRNA.....                                   | 36 |
| 5 METODY IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN (MIRNA) .....                  | 37 |
| 5.1    Izolace mikroRNA z plazmy .....                             | 38 |
| 5.2    Hodnocení výtěžku a čistoty RNA .....                       | 38 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 6     | METODY STANOVENÍ MOLEKUL MIKRORNA .....                                    | 39 |
| 6.1   | Polymerázová řetězová reakce .....   | 39 |
| 6.1.1 | RT real-time PCR .....   | 39 |
| 6.2   | Microarrays.....   | 40 |
| 6.3   | Next generation sequences .....  | 40 |
|       | PRAKTICKÁ ČÁST .....   | 42 |
| 7     | CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....  | 42 |
| 7.1   | Hlavní cíl .....   | 42 |
| 7.2   | Dílčí cíle .....   | 42 |
| 8     | VÝZKUMNÉ OTÁZKY .....  | 43 |
| 9     | METODIKA PRÁCE .....   | 44 |
| 9.1   | Přístrojové vybavení .....   | 44 |
| 9.2   | Postup izolace miRNA z plazmy .....  | 47 |
| 9.3   | Postup měření koncentrace a čistoty miRNA na přístroji Nanodrop 1000 ..... | 48 |
| 10    | ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....                                      | 50 |
|       | DISKUZE .....  | 57 |
|       | ZÁVĚR.....   | 59 |
|       | SEZNAM LITERATURY .....  | 60 |
|       | SEZNAM PŘÍLOH .....  | 64 |
|       | PŘÍLOHY .....  | 65 |

## SEZNAM GRAFŮ

|  |    |
|--|----|
| Graf 1: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy získaných před operací .....                  | 52 |
| Graf 2: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy získaných po operaci .....                    | 52 |
| Graf 3: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy získaných 1.-4. den po operaci .....          | 53 |
| Graf 4: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy odebraných při první návštěvě ambulance ..... | 53 |
| Graf 5: Celkový výtěžek izolované RNA, všechny vzorky dohromady .....  | 54 |
| Graf 6: Čistota izolované RNA, všechny vzorky dohromady .....  | 55 |
| Graf 7: Box plot porovnání koncentrací izolované RNA u jednotlivých skupin odběrů ....                       | 56 |

## SEZNAM OBRÁZKŮ

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1: Melanom kůže.....                                    | 26 |
| Obrázek 2: Bazocelulární karcinom .....                         | 30 |
| Obrázek 3: Spinocelulární karcinom .....                        | 30 |
| Obrázek 4: Karcinom Merkelových buněk .....                     | 31 |
| Obrázek 5: Centrifuga Micro Star 17 .....                       | 45 |
| Obrázek 6: Centrifuga MiniSpin® .....                           | 45 |
| Obrázek 7: Centrifuga Fresco 2 .....                            | 46 |
| Obrázek 8: Vortex Digital vortex mixer with IR sensors TX4..... | 46 |
| Obrázek 9: Spektrofotometr NanoDrop 100 .....                   | 49 |

## SEZNAM TABULEK

|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1: Deskriptivní statistika naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů .....         | 50 |
| Tabulka 2: Deskriptivní statistika naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů .....         | 50 |
| Tabulka 3: Anova test – porovnání koncentrací izolované RNA u jednotlivých skupin odběrů .....           | 50 |
| Tabulka 4: Deskriptivní statistika čistoty naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů ..... | 51 |
| Tabulka 5: Deskriptivní statistika čistoty naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů ..... | 51 |
| Tabulka 6: Analýza rozptylu – rozdíl čistoty mezi jednotlivými náběry .....                              | 51 |

## SEZNAM ZKRATEK

|                           |  |
|---------------------------|--|
| 3`UTR.....                | 3` nepřekládaná oblast   |
| APC .....                 | Adenomatosis polyposis coli  |
| BCC .....                 | basal cell carcinoma, bazocelulární karcinom                                 |
| Bp .....                  | base pair, komplementární pár bází   |
| BRCA .....                | breast cancer, rakovina prsu   |
| CAMs.....                 | cell adhesion molecules, molekuly buněčné adheze                             |
| CDKN2A.....               | cyclin-dependent kinase inhibitor 2A   |
| cDNA.....                 | complementary DNA, komplementární DNA  |
| cfDNA .....               | circulating free DNA, cirkulující volná DNA                                  |
| ctDNA.....                | circulating tumor DNA, cirkulující nádorová DNA                              |
| DNA.....                  | deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina                            |
| E2F.....                  | E2F transkripční faktor  |
| ECM.....                  | extracelulární matrix  |
| EGFR .....                | Epidermal Growth Factor Receptor   |
| FFPE .....                | formalin-fixed, paraffin-embedded, formalínem fixované, v<br>parafínu zalité |
| HER2 .....                | Humánní epidermální receptor 2   |
| K <sub>3</sub> EDTA ..... | draselná sůl etylendiaminotetraoctové kyseliny                               |
| lncRNA.....               | Long non-coding RNA, dlouhá nekódující RNA                                   |
| MCC .....                 | Merkel cell carcinoma, karcinom Merkelových buněk                            |
| MCV .....                 | Merkel cell polyomavirus, lidský polyomavirus Merkelových<br>buněk           |
| miRNA.....                | mikroRNA   |

mRNA..... messengerová RNA

ncRNA..... non-coding RNA, nekódující RNA

NK ..... nucleic acid, nukleová kyselina

NRAS..... neuroblastoma RAS

PCR..... polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

pre-miRNA ..... precursor-miRNA, prekurzorová mikroRNA

PTEN ..... phosphatase and tensin homolog, homolog fosfatázy a tenzinu

PTPRD..... receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta

qPCR..... kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RB..... retinoblastom

RISC ..... RNA-induced silencing complex

RNA..... ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

RNáza ..... ribonukleáza

RT-PCR ..... Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SCC..... squamous cell carcinomas, spinocelulární karcinom

SDS..... dodecylsírán sodný

siRNA..... short interfering RNA, krátká interferující RNA

snoRNA ..... small nucleolar RNA, malá nukleolární RNA

snRNA ..... small nuclear RNA, malá jaderná RNA

TERT ..... telomerase reverse transcriptase, telomerázová reverzní transkriptáza

TP53..... tumor protein p53

tRNA..... transfererová RNA



TSG..... tumor suppressor Genes, tumor supresorové geny

TSP-1 ..... Trombospondin 1

UV ..... ultra violet, ultrafialový

VEGF..... vaskulární endoteliální růstový faktor

VEGFR ..... receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

## ÚVOD

Od roku 2003, kdy byla publikována kompletní sekvence lidského genomu došlo k pochopení funkce stovek nově objevených genů a zároveň k pokroku v pochopení etiologie řady onemocnění včetně onemocnění onkologických. Porozumění patogeneze onkologických onemocnění umožňuje využívat nově identifikované aberantně exprimované geny jako markery pro účely prevence, diagnostiky, stanovení prognózy a predikce a také pro časný záchyt recidivy řady onkologických onemocnění.

Jednou z diskutovaných otázek je snadnost v provedení detekce zmiňovaných markerů a z tohoto pohledu se jako nejvhodnější jeví periferní krev. Řadu desetiletí jsou v periferní krvi stanovovány proteinové nádorové markery. V posledních dvaceti letech se pozornost obrací na možnost stanovení cirkulujících nukleových kyselin, a to jednak DNA ctDNA a molekul RNA. Molekuly DNA vynikají vyšší stabilitou v periferní krvi oproti molekulám RNA, a proto se většina pozornosti upínala právě k uplatnění stanovení ctDNA jako zejména prediktivních a prognostických markerů u onkologických onemocnění. V současnosti se ukazuje velký význam i malých nekódujících RNA, kdy bylo postupně v našem genomu identifikováno více než 2500 genů pro tyto molekuly. Z hlediska diagnostiky je nespornou výhodou vysoká stabilita těchto molekul, a tudíž se nabízejí jako biomarkery v onkologii.

Touto problematikou se zabývám ve své bakalářské práci, a to u pacientů léčených pro melanom. Stanovení předoperačních, pooperačních hladin vybraných miRNA a zároveň jejich sledování v čase by umožnilo včasnou detekci recidivy onemocnění. Právě izolace celkové RNA pro tyto účely je obsahem této práce. Bakalářská práce obsahuje teoretický úvod zabývající se aspekty karcinogeneze včetně úlohy molekul miRNA. Dále obsahuje popis použitých metodik, naměřené hodnoty koncentrace a čistoty RNA, zhodnocení těchto hodnot a možnosti jejich využití jako diagnostických a prognostických markerů.

# TEORETICKÁ ČÁST

Tématem této bakalářské práce je izolace RNA pro účely stanovení markerů u pacientů léčených pro melanom, proto teoretická část obsahuje popis mechanismů nádorové patogeneze, část věnovanou melanomu, popis role molekul mikroRNA a vysvětlení koncepce tekuté biopsie zahrnující analýzu cirkulujících molekul RNA.

## 1 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

### 1.1 Obecná definice nádoru

Nádor je nová abnormální tkáň v organismu, která roste neregulovaným způsobem a nemá fyziologickou funkci. Maligní nádor roste invazivně do okolí a vytváří vzdálená ložiska – metastáze (Adam, 2003). Ne všechny nádory ale nabývají schopnosti metastazování. Používá se též termín novotvar, což je tkáň s abnormálním růstem buněk, které rostou rychleji než buňky normální. Svým růstem mohou novotvary být limitovány sousedními strukturami nebo je přímo destruovat. Termín novotvar může označovat benigní nebo maligní (metastazující) tkáň (Hruban, 2013).

V roce 2000 definovali Douglas Hanahan a Robert A. Weinberg charakteristické vlastnosti, které získává normální buňka v procesu karcinogeneze, a díky kterým se transformuje v buňku nádorovou. V roce 2011 tyto definované vlastnosti autoři dále doplnili. Právě mutace onkogenu, tumor supresoru a dalších genů účastnících se například metabolismu, umožňuje získání těchto vlastností. V dalším textu se věnuji definování těchto charakteristických vlastností nádorové tkáně, kterými jsou soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujících buněčný cyklus, poškozená aktivace apoptózy, neomezený replikační potenciál, posílení angiogeneze, invazivita a tvorba metastáz. V roce 2011 byly tyto definované vlastnosti nádorové tkáně doplněny o schopnost zabránění destrukci imunitním systémem, deregulaci epigenetických změn a podporu nádorových buněk zánětu (Hanahan, 2011).

### 1.2 Charakteristické znaky maligně transformovaných buněk

Charakteristické znaky maligně transformovaných buněk zahrnují biologické vlastnosti získané během vícestupňové transformace. Jsou to významné a doplňkové schopnosti, které umožňují růst nádorů a metastatické šíření. Základem těchto

charakteristických znaků je nestabilita genomu, která utváří genetickou rozmanitost, a ta následně urychluje jejich získávání (Hanahan, 2000).

### **1.2.1 Soběstačnost v produkci růstových signálů**

Jedním ze základních znaků nádorových buněk je schopnost si udržet neustálou proliferaci. Normální buňky vyžadují mitogenní růstové signály, díky kterým mohou přecházet z klidového stádia ( $G_0$  fáze) do stádia aktivní proliferace ( $G_1$  fáze). Tím je zároveň zajištěna homeostáza buněk, jejich počet a udržení normální tkáňové struktury a funkce. Tyto signály jsou přenášeny do buňky prostřednictvím transmembránových receptorů (nebo intracelulárních receptorů) vázajících různé signální molekuly jako jsou růstové faktory, komponenty extracelulární matrix nebo adhezní molekuly (Hanahan, 2000).

Nádorové buňky se umí stát na těchto signálech nezávislé permanentní aktivací některé z molekul signální dráhy (prostřednictvím mutace/cí), čímž se stávají nezávislymi na jejich okolním prostředí a značně tak narušují tkáňovou homeostázu. Většina těchto nádorových buněk má tudíž schopnost si produkovat růstové signály, což vede ke stimulaci proliferace. Případně nádorové buňky vysílají signály ke stimulaci normálních buňkám stromy (podpurný nádorový útvar), která je následně zásobuje růstovými faktory (Hanahan, 2011).

### **1.2.2 Necitlivost k signálům zastavujících buněčný cyklus**

V normální tkáni působí antiproliferační signály k udržení klidového stavu buňky ( $G_0$  fáze nebo postmitotické fáze) a homeostázy tkáně. Jedná se o signály inhibující růst, které jsou stejně jako růstové signály přijímány pomocí transmembránových buněčných receptorů s intracelulárními signálními drahami. Aby si neoplastické buňky zachovaly proliferaci, musí být méně citlivé na tyto signály nebo jejich působení přímo obejít (Hanahan, 2000).

Signální dráhy antiproliferačních signálů souvisejí s buněčným cyklem, konkrétně s  $G_1$  fází a následným přechodem do S fáze. Právě během  $G_1$  fáze normální buňky monitorují své okolí a na základě snímaných signálů se rozhodují, zda začnou proliferovat (přechod do S fáze), zůstanou v klidové fázi ( $G_0$  fázi) nebo vstoupí do postmitotického stavu ( $G_1$  fáze). Kromě toho antiproliferační signály ve většině případů zasáhnou v buňkách signální dráhu obsahující protein retinoblastom (pRb) a jemu dva příbuzné proteiny p107 a p130. V defosforylovaném stavu Rb protein blokuje transkripční faktor E2F. Narušením dráhy a inaktivací Rb proteinu fosforylací dochází k uvolnění E2F, který aktivuje expresi genů

nezbytných pro postup z G<sub>1</sub> do S fáze. Buňky se tak stávají necitlivými na antiproliferační faktory, které normálně blokují postup buněčným cyklem (Hanahan, 2000, 2011).

Neodpovídavost na antiproliferační signály není jediný faktor ovlivňující buněčnou proliferaci. Počet buněk je omezován instrukcemi tkáně, které aktivují vstup do postmitotické fáze (diferencovaných stavů) spojené s nemožností opětovného vstupu do buněčného cyklu. Tomu se musí nádorová buňka vyhnout, aby nedošlo k její terminální diferenciaci. Jedním ze způsobů, jak uvedeného stavu docílit je využití onkoproteinu Myc. Během normálního vývoje jsou signály indukující diferenciaci zprostředkovávány komplexem transkripčních faktorů Mad-Max. Ovšem nadměrná exprese onkoproteinu Myc vytěsňuje protein Mad z komplexu, čímž vznikne komplex Myc-Max s odlišným účinkem na transkripci cílových genů. Utlumí se tak diferenciaci a podpoří se růst (Hanahan, 2011).

### **1.2.3 Poškozená aktivace apoptózy**

Apoptóza, tedy programovaná (řízená) buněčná smrt je nezbytná pro vývoj organismu a udržení tkáňové homeostázy. Zároveň je aktivována v případě nevratného poškození buňky, například vlivem mutací, což je proces spjatý s nádorovou transformací. Nádorové buňky získávají schopnost rezistence vůči aktivaci apoptózy, aby mohly přežít, proliferovat a expandovat (Hanahan, 2000).

Prostřednictvím fyziologických signálů, jimiž může být hypoxie, poškození DNA či přítomnost signálů smrti je proces apoptózy spuštěn a vždy se odehrává dle předem daného scénáře. Ten zahrnuje narušení buněčné membrány a cytoskeletu, degradaci chromozomů, fragmentaci jádra. Nakonec vznikají apoptotická tělíska a mrtvá buňka. Ta je fagocyty pohlcena spolu s apoptotickými tělísky. Celý proces apoptózy trvá zhruba 30-120 minut (Hanahan, 2000).

Iniciační prokaspázy přijímají signály z extracelulárního a intracelulárního prostředí, pro aktivaci apoptózy. Nádorová buňka vyvíjí řadu strategií k dosažení neodpovídavosti k těmto signálům, a tedy rezistenci k apoptóze. Jednou z nich je ztráta funkce tumor supresorového genu TP53, jakožto molekuly podílející se na aktivaci. Sníženou citlivost nádorů k aktivaci apoptózy může způsobovat i snížená exprese, mutace nebo jiná inaktivace Fas receptoru, který spadá do dráhy vnější aktivace apoptického programu a je tzv. receptorem smrti. Po navázání ligandu spouští apoptózu (Hanahan, 2000, 2011).

#### **1.2.4 Neomezený replikační potenciál**

Normální buňky obsahují vnitřní mechanismus omezující replikační potenciál (počet dělení), který musí nádorové buňky být schopné překonat. Pro generování makroskopických nádorů, je nutné, aby nádorové buňky získaly již kromě uvedených vlastností také schopnost neomezeného replikačního potenciálu, který je nezbytný pro jejich růst a šíření (Hanahan, 2000, 2011).

Experimentální pozorování normálních lidských buněk v kultuře prokázalo, že tyto normální buňky mají omezený replikační potenciál a jsou schopné pouze omezeného počtu buněčných cyklů – růstu a dělení. Tento počet udává zhruba 60-70 cyklů. Po překročení tohoto počtu cyklů přestávají buňky růst a zahajují proces stárnutí (senescence) (Hanahan, 2000).

Limitní počet dělení buněk a jeho regulace úzce souvisí s existencí telomer, což jsou repetitivní sekvence na koncích chromozomů (chromozomální DNA). V normálních buňkách dochází k progresivnímu zkracování telomer během každého buněčného cyklu, které odpovídá zkrácení o 50 až 200 párů bází. Tím telomery ztrácejí schopnost chránit konce chromozomů. Délka telomerické DNA určuje, kolik dělení může daná buňka absolvovat, než jsou telomery zkráceny natolik, že ztratí své ochranné funkce. Jak již bylo zmíněno výše, po zhruba 60-70 děleních jsou telomery zkrácené tak, že buňka tento signál vyhodnotí jako poškození DNA a dojde k zastavení buněčného cyklu a zahájení procesu senescence (Hanahan, 2011).

V buňkách existuje enzym telomeráza, tvořený RNA a proteinem TERT (telomerázová reverzní transkriptáza), schopná prodlužovat konce chromozomů. Její TERT podjednotka není exprimována ve většině somatických buňkách, tzn. telomeráza není aktivní. Nádorové buňky získávají schopnost udržovat délku telomer díky expresi podjednotky TERT, která aktivuje telomerázu. Tím nedochází ke zkracování telomer a buňky získávají neomezený replikační potenciál (Hanahan, 2011).

#### **1.2.5 Posílení angiogeneze**

Angiogeneze je označení pro novotvorbu cév, které se tvoří při organogenezi nebo například během procesu hojení ran. Zajišťuje přístup kyslíku a živin ke všem buňkám tkáně. Po dokončení vývoje tkání je proces angiogeneze omezen a přísně regulován. Angiogeneze je však aktivována nádorovou tkání, protože stejně jako normální tkáně, tak i nádor vyžaduje přísun živin a kyslíku, zároveň se jedná o zásadní faktor růstu nádoru (Hanahan, 2011).

Během progresu nádoru je aktivován tzv. angiogenní spínač (angiogenic switch), jehož zapnutí způsobí novotvorbu cév, které pomáhají udržovat a rozšiřovat neoplastickou transformaci. Tento spínač je ovlivňován například hypoxií, zánětem či expresí onkogenů. Zároveň je ovlivněn vzájemnou rovnováhou faktorů, které angiogenezi indukují (aktivátory), nebo naopak potlačují (inhibitory). Mezi aktivátory řadíme vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a mezi inhibitory trombospodin-1 (TSP-1) (Hanahan, 2011).

V minulosti se předpokládalo, že angiogeneze bude důležitá pouze tehdy, když se budou tvořit rychle rostoucí makroskopické nádory. Novější údaje naznačují, že angiogeneze přispívá také v mikroskopické premaligní fázi neoplastické progresu, což dále upevňuje její status jako nedílného znaku nádorové transformace (Hanahan, 2011).

### **1.2.6 Invazivita a tvorba metastáz**

Proces invazivity a tvorby metastáz je víceetapový a označovaný jako tzv. metastatická kaskáda. U většiny nádorů dojde během jejich vývoje a růstu k uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru. Tyto buňky následně putují krevními nebo lymfatickými cévami do vzdálenějších míst organismu, kde zakládají kolonii, tzv. sekundární nádor – metastázu. Pro vznik takové metastázy i všeobecně primárního nádoru musí být dodrženy výše zmíněné charakteristické znaky nádorové tkáně. (Hanahan, 2000).

Buňky s invazivními nebo metastatickými schopnostmi mají změněno několik tříd proteinů podílejících se na ukotvení buněk v rámci tkáně. Mezi tyto proteiny patří molekuly adheze (CAMs), zejména imunoglobuliny, kadheriny, které zajišťují kontakt mezi buňkami a integriny, jež zajišťují vazbu k extracelulární matrix (ECM) (Hanahan, 2000; Hofmanová, 2013).

Kadheriny jsou transmembránové glykoproteiny umožňující homotypické mezibuněčné interakce, přičemž nejdůležitější z nich, E-kadherin, je exprimován na buňkách epitelu. Napomáhá vazbě mezi sousedními buňkami a přenosu antiproliferativních signálů mezi nimi. Změna v expresi či funkci této molekuly souvisí s invazí a tvorbou metastáz. Zvýšená exprese E-kadherinu působí jako antagonist invaze a metastáz, naopak snížení její exprese tyto schopnosti zesiluje (Hanahan, 2000, 2011).

### 1.3 Onkogeny a tumorsupresory

V současnosti panuje shoda, že kvalitativní a kvantitativní změny ve skupinách genů, které označujeme jako protoonkogeny a tumor supresorové geny, vedou k vzniku nekontrolované proliferace a následně k vzniku nádoru. Vrozené mutace těchto genů zvyšují riziko vzniku onkologického onemocnění (Chial, 2008).

Jako protoonkogeny označujeme geny nesoucí informaci pro růstové faktory a receptory růstových faktorů, přenašeče signálu, transkripční faktory a funkční RNA, které následně kontrolují buněčný růst, dělení, regulaci apoptózy a další důležité buněčné procesy ve směru proliferace (Wyant et al., 2014). Ke zvýšené transkripci protoonkogenů dochází během embryogeneze, stimulace buněčné mitózy růstovými faktory a regenerace tkáně. Poruchy exprese proteinů způsobené nevhodnou aktivací protoonkogenu nebo zvýšenou expresí by mohly vést ke změnám růstu a diferenciaci, a tak přispět ke vzniku karcinomů (Haschek, 2010).

Jakýmsi prototypem protoonkogenů je skupina Ras genů, jejichž mutace vedou k jejich aberantní aktivaci a podpoře nekontrolovatelné proliferace. Dalším protoonkogenem je HER2, tvořící transmembránové receptory, které se podílejí na růstu a dělení buněk v prsu. Transkripční faktor Myc je spojován se vznikem Burkittova lymfomu. Mezi další příklady protoonkogenních receptorů patří EGFR, receptor epidermálního růstového faktoru (EGF), který se účastní signalizace zprostředkované růstovými faktory a také VEGFR, receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který se účastní podpory angiogeneze. Pokud dojde u protoonkogenů k jejich nadměrné aktivaci nebo mutaci, mění se v geny, které označujeme jako onkogeny (Chial, 2008).

Klíčovým rysem aktivace onkogenů je, že stačí pouze jediná změněná alela a protoonkogen se mění na onkogen. Mezi aktivační mechanismy patří retrovirová transdukce, transkripční aktivace inzerčních mutagenéz, somatická mutace v kódující oblasti, chromozomální translokace, amplifikace a další (Shiel Jr., 2017).

Tumor supresorové geny (TSG) jsou takové, které naopak kontrolují buněčné dělení inhibičním způsobem nebo geny podílející se na opravách DNA a dále geny aktivující apoptózu. Zásadní rozdíl mezi onkogeny a tumor supresory je, že onkogeny jsou výsledkem aktivace protoonkogenů a tumor supresorové geny přispívají k nádorové transformaci, pokud jsou inaktivovány, tzn. obě alely nefunkční.



U více než poloviny lidských nádorů byla nalezena mutace alel genu TP53 (kóduje protein p53), spektrum nádorů zahrnuje leukémie, lymfomy, mozkové nádory, rakovina prsu či tlustého střeva a plic (Wyant et al., 2014). Prvním popsáním tumor supresorovým genem byl retinoblastomový gen (Rb), jehož inaktivace způsobuje retinoblastom. Dalšími významnými TSG jsou BRCA-1, BRCA-2 a APC gen (Cooper, 2000)

## 2 RAKOVINA KŮŽE

Rakovina kůže vzniká nekontrolovaným růstem buněk epidermis (pokožky) způsobeným mutacemi onkogenů a tumor-supresorů nejčastěji v důsledku ultrafialového záření. Hlavními typy rakoviny kůže jsou bazocelulární karcinom (BCC), spinocelulární karcinom (SCC), melanom a karcinom Merkelových buněk (MCC) (Sarnoff, 2020).

Pod pojmem rakovina kůže se většinou myslí zhoubné (maligní) nádory, ač na kůži vzniká velké množství různých druhů nádorů, které mohou být zhoubné nebo naopak mohou představovat pouze kosmetickou vadu. Toto onemocnění nevzniká pouze v horních vrstvách kůže, ale může prorůstat i do hlubších částí či metastazovat do jiných orgánů. Jindy působí destruktivně i na své okolí a poškozuje i okolní sliznice, svalovinu, kosti a chrupavky nebo samotné orgány (Arenberger, 2006).

### 2.1 Melanom

Jedná se o zhoubný nádor vznikající z melanocytů, tedy kožních buněk produkujících melaninový pigment, který dodává pokožce barvu. Melanom se může nacházet na jakékoliv části těla, a to i na té, která není přímo vystavena slunečnímu záření, nejčastěji však na kůži, pod nehty, v oční sítnici. Způsobuje jej intenzivní, přerušované sluneční záření (zejména UVB složka), které vede ke spálení (Sarnoff, 2020). Právě expozice UV záření patří mezi hlavní rizikové faktory, které ovlivňují nárůst tohoto závažného onkologického onemocnění. Dále pak značně se měnící životní styl a jiné vnější faktory. Značnou část rizikových faktorů také tvoří faktory genetické. K rozvoji maligní transformace přispívá mutace příslušných genů, konkrétně pak TP53, PTEN, CDKN2A, PTPRD, NRAS a BRAF (Slabý et al., 2012).

*Obrázek 1: Melanom kůže*



Zdroj: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/>

Jde o jednu z nejzhubnějších form rakoviny z důvodu schopnosti časněho tvoření metastáz, které se vyskytují nejprve v lymfatických uzlinách, později i v jiných orgánech (Masarykův onkologický ústav, nedatováno).

Incidence celosvětově neustále roste, v České republice vzrostla od 70. let 20. století do roku 2009 více než trojnásobně. Maligní melanom je zodpovědný za 80 % úmrtí na nádory kůže, ačkoliv představuje pouze 4 % všech maligních onemocnění. Diagnostikován bývá nejčastěji u osob mezi 65-69 lety, ale výskyt tohoto onemocnění neustále stoupá i u mladší populace v produktivním věku. Náleží mezi nádory s vysokou chemo- i radioresistencí. Důležitá je léčba časněho stádia, kdy lze pomocí chirurgické resekce nádorového ložiska s širokým bezpečnostním lemem dosáhnout výborných léčebných výsledků. Prognóza v pozdějších stádiích s metastázami bývá nepříznivá a přežití pacientů je v období šesti až devíti měsíců od stanovení diagnózy. Pro stanovení prognózy se v praxi využívají znaky počátečního stádia onemocnění, mezi které řadíme velikost tumoru, hloubku invaze, ulceraci (tvorbu vředů), mitotickou aktivitu a stupeň postižení spádových uzlin. Nejedná se ale o parametry pro včasné a dostačující určení diagnózy a prognózy (Slabý et al., 2012).

Právě včasnou detekcí recidivy tohoto onemocnění nejen po chirurgickém odstranění melanomu se zabývá tato bakalářská práce. Konkrétně izolací RNA z periferní krve pro účely stanovení markerů.

### **Expresní profily mikroRNA v tkáni maligního melanomu**

Grignol et al. ve studii zaměřené na identifikaci rozdílů v expresním profilu nádorové a nenádorové tkáně prověřovali ve FFPE melanomových a shodujících nenádorových tkáních expresi 7 miRNA (miR-17-5p, miR-21, miR-107, miR-130, miR-155, miR-1816 a miR-221) s cílem potvrdit jejich diagnostický potenciál. Jejich výsledky prokázaly, že miR-21 a miR-155 byly ze všech zkoumaných miRNA nejvíce exprimovány v maligní tkáni v porovnání s benigními névy. Taktéž zvýšená exprese byla prokázána u dalších čtyř miRNA (miR-107, miR-130a, miR-181b a miR-17-5p) v melanomových tkáních. MiR-211 naopak vykazovala expresi v tumoru sníženou (Slabý et al., 2012).

Zvýšenou expresi miR-21 v melanomové tkáni potvrdila nezávislá studie Jiang et al. u 10 primárních a 10 metastatických melanomů v porovnání s její expresí u 10 dysplastických névů. Výsledkem bylo zvýšení exprese u primárních i metastatických

melanomů v porovnání s nenádorovou tkání. Výrazně rozdílná byla exprese miR-21 mezi oběma testovanými skupinami melanomů (Slabý et al., 2012).

Další studií rozdílných hladin exprese miRNA se zabývali Segura et al. Pozorovali výrazně zvýšenou hladinu miR-497, miR-155, miR-150, miR-342-3p a miR-145 u metastatických melanomů, zvýšenou hladinu miR-150 a miR-155 u primárních melanomů v porovnání s benigními névy. Exprese miR-455-3p byla jako jediná výrazně snižená u pacientů s primárním i metastatickým melanomem (Slabý et al., 2012).

Jucki et al. hodnotili rozdíly v expresních profilech miRNA u 10 dětských a mladých dospělých pacientů mladších 30 let a 10 starších pacientů nad 60 let s maligním melanomem. Obě tyto skupiny byly porovnávány s melanocytickými névy, které byly taktéž rozděleny do identických věkových podskupin. V nádorové tkáni vykazovaly zvýšenou expresi miR-223, miR-382, miR-409-3p, miR-424, miR-604, miR-650. MiR-211 vykazovala expresi sniženou. Výsledky byly v porovnání s nenádorovými vzorky v případě analýz obou věkově rozdělených souborů (Slabý et al., 2012).

Chen et al. analyzovali 8 metastatických vzorků melanomu a 8 vzorků benigních névů, které byly konzervovány v parafínových blocích. Porovnání expresních analýz miRNA obou skupin vedlo k identifikaci 13 miRNA (miR-16, miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-22, miR-93, miR-106b, miR-130b, miR-132, miR-143, miR-146b, miR-185 a miR-425-5p) se významně zvýšenou expresí a 18 miRNA (miR-7a, miR-7b, miR-23b, miR-27b, miR-125a, miR-125b, miR-141, miR-149, miR-193b, miR-197, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-204, miR-205, miR-211, miR-214, miR-768-3p) se sniženou expresí v nádorové tkáni (Slabý et al., 2012).

Schultz et al. porovnávali 10 primárních melanomů a 10 benigních névů a identifikovali tak 12 rozdílně exprimovaných miRNA. Nejvýznamnější je deregulace téměř celé rodiny let-7 (let-7a, let-7b, let-7d, let-7e, let-7g) a dále miR-15a, miR-17, miR-28, miR-106a a miR-144, které byly již dříve popsány u jiných nádorových onemocnění (Slabý et al., 2012).

### **2.1.1 Povrchově se šířící melanom**

Nejběžnější forma, která tvoří cca 65-70 % kožních melanomů. Vzniká již z existujícího kožního znaménka nebo se objevuje jako nová léze. Nejprve roste povrchově (chová se jako *carcinom in situ*) a nemetastazuje, v pozdější fázi začne pronikat také do

hlubších vrstev kůže. Lze ho najít kdekoli na těle, avšak u mužů se nejčastěji objevuje na trupu a u žen na nohou. Může vypadat jako plochá nebo mírně vyvýšená asymetrická skvrna hnědých až černých barev s nerovnými okraji (Halpern et al. 2020; Zdraví Euro, 2019).

### **2.1.2 Nodulární melanom**

Představuje nejagresivnější typ, tvoří zhruba 20 % všech melanomů. Již od počátku vzniku je pro něj charakteristický patrný hrbol vyvýšený nad okolní pokožku. Roste hlouběji a rychleji do kůže než jiné typy. Nejčastěji se vyskytuje na trupu, nohou, pažích a na pokožce hlavy u starších mužů. Může být bez pigmentu, snadno ulceruje a krvácí (Halpern et al. 2020; Zdraví Euro, 2019)

### **2.1.3 Lentigo maligna melanom**

Postihuje především starší pacienty a místa na těle s patrnými známkami poškození slunečním zářením (hlava, krk, paže). Lentigo maligna nemá sklony k metastazování. Léze jsou větší (1–3 mm) a jsou to spíše ploché skvrny s nerovnými okraji. Mají tmavohnědou až černou barvu. V tomto stádiu může zůstat až 15 let, poté však dochází právě ke vzniku lentigo maligna melanomu, který vytváří vyvýšený modročerný hrbolek (Halpern et al. 2020; Zdraví Euro, 2019)

### **2.1.4 Akrolentiginózní melanom**

Jedná se o nejméně častý subtyp melanomu u bílé populace, jde tedy o nejběžnější formu melanomu vyskytující se u populace tmavé pleti (Afroameričané, Hispánci, Asiaté). Vzniká především na periferních partiích lidského těla, typicky na ploskách či dlaních, pod nehtem se pak označuje jako subunguální melanom. Zpočátku působí jako bradavice, modřina nebo mozol, díky čemuž unikne pozornosti jedince (Halpern et al. 2020; Zdraví Euro, 2019).

## **2.2 Bazocelulární karcinom**

Též bazaliom, jsou abnormální, nekontrolované výrůstky, které vznikají z bazálních buněk kůže v nejspodnější vrstvě kůže. Je řazen mezi zhoubné nádory, roste však velice pomalu a nezakládá metastázy. Nejčastěji se vyskytuje v oblastech pokožky vystavených slunci, zejména na obličeji, uších, krku, pokožce hlavy, ramen a zad. Léčba je chirurgická nebo zmrazení (tekutým dusíkem).

Dědičné onemocnění tímto karcinomem se označuje Gorlin-Goltzův syndrom (Česká onkologická společnost ČLS JEP; Sarnoff, 2020).

*Obrázek 2: Bazocelulární karcinom*



*Zdroj: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/>*

### **2.3 Spinocelulární karcinom**

Jinak také spinaliom, vzniká z dlaždicových buněk v epidermis, je podobný bazaliomu, ovšem roste agresivněji a také častěji metastazuje, proto je nutné jej včas odstranit. Objevuje se taktéž na místech vystavených slunci. Spinaliom může být rohovějící (keratinizující) nebo nerohovějící (nekeratinizující) (Česká onkologická společnost ČLS JEP; Sarnoff, 2020).

*Obrázek 3: Spinocelulární karcinom*



*Zdroj: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/>*

### **2.4 Karcinom Merkelových buněk**

Označován i jako trabekulární karcinom. Jedná se o vzácné a vysoce agresivní nádorové onemocnění, které se řadí mezi neuroendokrinní nádory. Objevují se jako pevné, bezbolestné léze nebo uzlíky na sluncem exponovaném místě, častěji u starších mužů, bělochů.

Asi v 80 % případů je v buňkách nádoru virus polyomavirus z Merkelových buněk (MCV) (Česká onkologická společnost ČLS JEP; Sarnoff, 2020).

*Obrázek 4: Karcinom Merkelových buněk*



*Zdroj: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/>*

### 3 MIKRORNA

Do 90. let minulého století převažoval názor, že nekódující oblasti lidského genomu nemají význam z hlediska fungování buňky, neboť neobsahují informace pro syntézu proteinů a jejich funkce tak nebyla známa. Dnes se již ví, že většina eukaryotického transkriptomu je tvořena nekódujícími RNA molekulami. Ty jsou klasifikovány jako funkční a regulační. Do skupiny funkční RNA náleží transferová RNA (tRNA), malá jaderná RNA (snRNA) a malá nukleolární RNA (snoRNA). Hlavní třídy regulátorů RNA jsou mikroRNA (miRNA), malé interferující RNA (siRNA), piwiRNA (piRNA) a dlouhé nekódující RNA (lncRNA) (Silva et al., 2018).

Hladiny exprese těchto RNA jsou nižší než u kódujících genů. Některé z nich jsou tkáňově specifické a jsou asociovány s biologickými procesy, jako například epigenetické regulace, alternativní sestřih, jaderný transport a jiné strukturní funkce (Slabý et al., 2012).

MikroRNA (miRNA) jsou malé, jednovláknové, nekódující molekuly RNA o 20-22 nukleotidech (nt), které zprostředkovávají genovou expresi na posttranskripčních a translačních úrovních (Howell et al., 2010). Přestože jsou miRNA regulátory, samy podléhají regulaci jak na úrovni genové exprese, tak i v oblasti jejich regulační funkce. Předpokládá se, že miRNA regulují více než polovinu genů v lidském genomu, přičemž každá miRNA může regulovat řádově stovky cílových mRNA. Jejich význam spočívá zejména v procesech vývoje, diferenciaci, proliferaci, apoptózy, ale i v oblastech imunitního systému či nádorové transformaci. Regulují fyziologické (vývoj) i patologické (maligní transformace) procesy v organismu (Slabý et al., 2012).

MiRNA a siRNA jsou biochemicky a funkčně nerozeznatelné. Obě mají délku 19–22 nt s 5'-fosfátovými a 3'-hydroxylovými konci, rozlišují se na základě jejich příslušných původů. MiRNA je odvozena z dvouvláknové oblasti 60-70 nt RNA vlásenkového prekurzoru, zatímco siRNA je generována z dlouhé dvouvláknové RNA (dsRNA). Biogeneze miRNA je dvoustupňový proces, při kterém dochází k jadernému i cytoplazmatickému štěpení (MacFarlane et al., 2010).

#### 3.1 Biogeneze mikroRNA

Převládá tzv. kanonická cesta biogeneze. Začíná prepisem genu pro miRNA z DNA pomocí transkripce RNA-polymerázou II za vzniku dlouhé jednovláknové pri-miRNA (primární miRNA), která je ještě v jádře štěpena komplexem nukleárních proteinů (enzym



Drosha a jeho kofaktor DGCR8). Vzniká tak krátká struktura nazývaná pre-miRNA (prekurzorová miRNA) mající tvar vlásenky. Jedná se o jednovláčkovou RNA, kdy díky vzájemné komplementaritě dochází ke spojení 3`konce s 5`koncem. Pre-miRNA se uvolňuje do cytoplazmy nukleárním exportním proteinem Exportin 5, kde se štěpí enzymem Dicer na přibližně 22 nukleotidových zralých miRNA. Tato zralá miRNA je dvouvláčková – vlákno pocházející z 3`konce se označuje jako 3p, vlákno z konce 5` označované jako 5p. Obě tyto vlákna se začleňují do tzv. miRNA-indukovaného tlumícího komplexu (miRISC). Tento komplex tvoří zralá miRNA, proteiny TRBP a argonaut protein. Prostřednictvím RISC se mikroRNA váže na 3`UTR molekul mRNA. Výsledek vazby záleží na komplementaritě bází – pokud je úplná, vazba způsobí degradaci mRNA. Naopak neúplná komplementarita má za následek zabránění translace. V obou případech ale dojde ke snížení hladiny proteinu, který daná miRNA kóduje, což označujeme jako negativní posttranskripční regulaci (O'Brien, 2018; Novák, 2016).

### **3.2 MikroRNA a karcinogeneze**

Transformace normální buňky v nádorovou je mnohastupňový proces, při kterém v důsledku kumulace mutací a epigenetických změn dochází přes řadu premaligních stavů (iniciace) až k vzniku maligní buňky (progrese), která se může šířit a zakládat vzdálená ložiska (metastázy) (MacFarlane et al., 2010).

Nádorové buňky jsou schopné proliferovat nezávisle na růstových signálech, nereagují na inhibiční růstové signály, vyhýbají se cestám programované buněčné smrti (apoptózy), překonávají limity replikace vnitřní buňky, indukují a udržují angiogenezi a vytvářejí nové kolonie diskontinuální s primárním nádorem (MacFarlane et al., 2010).

Velká část procesů probíhajících v buňce je regulována prostřednictvím miRNA, včetně těch procesů, které vedou k nádorové transformaci. To znamená, že i geny pro miRNA z tohoto hlediska můžeme klasifikovat jako onkogeny a supresory nádorů. Ty miRNA, které inhibují expresi onkogenů lze označit za tumor supresorové. Naopak miRNA které regulují expresi tumor supresorů, lze označit za protoonkogeny. Při jejich deregulaci příslušným způsobem se spolupodílí na nádorové transformaci (Chen, 2010).

## 4 TEKUTÁ BIOPSIE

Každá buňka, včetně nádorové, komunikuje se svým okolím. To znamená, že do svého okolí uvolňuje různé typy molekul, včetně molekul RNA. V případě destrukce buňky, a to ať již nekrozou nebo některým typem programované buněčné smrti, se do okolí buňky uvolňuje většina typů molekul buňky včetně DNA a RNA. Tyto molekuly se následně dostávají i do krevní cirkulace. V případě nádorových buněk, tak vhodně vybrané molekuly mohou sloužit jako markery přítomnosti nádorové tkáně a mohou být využity v diagnostice. Právě vzorek periferní krve analyzovaný za tímto účelem získání informací o nádorové tkáni, označujeme jako tekutá biopsie (Polívka et al., 2015).

Molekulární profil nádoru je závislý na čase a místě odběru nádorové tkáně. K zachycení celého takového molekulárního profilu by bylo potřeba provést více klasických biopsií z primárních a metastatických míst v různém čase, což není možné ani z etických ani z ekonomických důvodů. Proto byla zavedena molekulární analýza cirkulující bezbuněčné DNA, která je uvolňována do krevního oběhu. Jedná se tak o minimálně invazivní metodu, díky které lze získat kvalitní molekulární profil, a hlavně je možné ji provádět častěji. Kromě toho také lze lépe monitorovat průběh onemocnění, stanovovat prognózu a predikovat léčbu u onkologických pacientů (Polívka et al., 2015).

Mezi standardní vyšetření molekulárního testování vzorků rakoviny patří chirurgický zákrok či biopsie. Tyto metody ale mají určitá omezení. Vzhledem k časově prostorové heterogenitě nádoru je potřeba více biopsií v několika časových intervalech, ať už z primárních či metastatických míst. Biopsii nelze provádět s menším časovým rozestupem, hlavně z důvodu zdravotního stavu pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním, u nichž je tkáň často špatně dostupná a zároveň se vyskytují se velká rizika komplikací (Polívka et al., 2015).

Kvůli těmto omezením se vyvíjejí nové minimálně invazivní metody pro detekci příslušných molekulárních změn v nádorech. V roce 1948 si Mandel a Métais všimli přítomnosti bezbuněčných nukleových kyselin (cfDNA) v lidské krvi a až o několik desetiletí později se objevily zprávy o onkogenních mutacích v bezbuněčné DNA z krve (cfDNA) pacientů s rakovinou nebo fetální cfDNA u těhotných žen. Stejně tak byla zjištěna přítomnost molekul RNA v periferní krvi. Později se pro analýzu nukleových kyselin (cfDNA, RNA) začal používat termín tekutá biopsie, jehož principem je monitorování

molekulárního profilu rakoviny v reálném čase s minimální invazivitou (Polívka et al., 2015).

## **4.1 cfDNA**

Fragmenty cfDNA, jako je DNA, mRNA nebo miRNA se nachází v plazmě, moči, mozkomíšním moku a u pacientů s rakovinou, u nichž se mohou tyto fragmenty použít k detekci základních molekulárních abnormalit souvisejících právě s nádorovým onemocněním. Zvýšené hladiny cfDNA mohou být spojeny s nepříznivým výsledkem. Pacienti s pokročilým stádiem rakoviny mají mnohdy vyšší hladiny cfDNA, než pacienti s lokalizovaným karcinomem nebo jedinci bez rakoviny. Předpokládá se, že cfDNA je uvolňována do krevní cirkulace z různých nádorových míst a možná lépe představují převládající molekulární abnormality než biopsie o odpovědi na terapii, progresi či recidivy onemocnění (Polívka et al., 2015).

Strukturní charakteristiky cfDNA se liší podle typu mechanismu uvolňování. DNA může být do oběhu uvolňována ve formě jaderné nebo mitochondriální DNA z buněk podstupujících apoptózu nebo nekrózu, dále také při autofagii nebo nekroptóze. Apoptóza je vysoce kontrolovaný programovaný proces buněčné smrti a fragmenty DNA uvolněné z těchto apoptotických buněk mají průměrnou délku přibližně 160–180 bp. Naopak nekróza je proces patologický, při kterém jsou fragmenty DNA generovány náhodněji a také jsou obvykle delší. Průměrné délky fragmentů cfDNA z apoptotických a nekrotických procesů a jejich poměr lze hodnotit jako důležitý prvek indexu integrity DNA, u něhož byl zaznamenán prognostický význam (Polívka et al., 2015).

### **4.1.1 Analýza cfDNA a RNA**

Nejčastěji se cirkulující DNA a RNA extrahují z plazmy. Sérum není tak vhodné oproti plazmě, protože má vyšší hladiny non-tumor cfDNA a RNA v důsledku lýzy normálních leukocytů. Pro odběr vzorků krve určených k analýze cfDNA a RNA jsou stále populárnější zkumavky s různými stabilizátory, které umožňují odložení zpracování vzorků o několik dní. Jiné materiály, jako je moč nebo mozkomíšní mok, obsahují méně buněk a měly by tak být méně náchylné k degradaci DNA a RNA (Polívka et al., 2015).

Vzorky krve je nutné odebírat opatrně a je třeba se vyhnout míchání, aby se zabránilo hemolýze. Uchovávat vzorek lze při pokojové teplotě nebo +4 °C a musí být zpracován do 4 hodin, aby se zabránilo změnám koncentrace nukleových kyselin a rozpadu. Pro zpracování cfDNA se doporučuje dvoukroková centrifugace pro vyloučení všech buněk

z plazmy. Plazma musí být skladována při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu maximálně devíti měsíců před konečnou analýzou cfDNA. Extrakty cfDNA musí být skladovány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu až tří měsíců pro analýzu koncentrace a fragmentace nebo až devět měsíců pro analýzu specifických mutací. RNA i cfDNA extrakty jsou citlivé na cykly zmrazení a rozmrazení (Polívka et al., 2015).

Mezi techniky kvantifikace celkového množství cfDNA a RNA řadíme metody založené na fluorescenci (barvení Hoechst a PicoGreen), metody založené na spektrofotometrii (ultrafialová spektrometrie) nebo metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase (SYBR Green a TaqMan) (Polívka et al., 2015).

## 4.2 Cirkulující mikroRNA

Cirkulující miRNA v krvi včetně jejích složek jsou popisovány u mnoha nádorů jako možné diagnostické a prognostické biomarkery, ovšem v případě maligního melanomu byly tyto cirkulující miRNA zkoumány pouze dvakrát (Slabý et al., 2012).

Leidinger et al. zkoumali ve své studii expresní profily miRNA leukocytů ve 35 vzorcích periferní krve pacientů s melanomem a ve 20 vzorcích krve zdravých dárců. Výsledkem bylo zastoupení 51 miRNA ve značně rozdílné míře mezi oběma testovanými soubory. Z toho bylo 21 miRNA zastoupeno v menším množství a zbytek, 30 miRNA ve větším množství u pacientů s melanomem. Pro následnou separaci pacientů s melanomem od zdravých dárců s 97,4% přesností (specifická 95,0 %, senzitivita 98,9 %) bylo vybráno 16 miRNA (miR-186, let-7d, miR-18a, miR-145, miR-99a, miR-664, miR-501-5p, miR-3787, miR-29c, miR-1280, miR-365, miR-1249, miR-328, miR-422a, miR-30d a miR-17) (Slabý et al., 2012).

Druhou studií, kterou se zabýval Kanemaru et al., bylo měření zastoupení cirkulující miR-221 v séru od 94 pacientů s maligním melanomem a od 20 zdravých dárců. Následným porovnáním bylo zjištěno, že hladina této miRNA je značně vyšší u pacientů s melanomem, a kromě toho byla více zastoupena i u pacientů s již diagnostikovaným melanomem ve stádiu I-IV. Exprese miR-221 také závisela na tloušťce tumoru. U pacientů s tumorem tlustějším než 1 mm byla hladina této miRNA mnohem vyšší, než u pacientů s tumorem  $\geq 1\text{ mm}$  (Slabý et al., 2012)

## 5 METODY IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN (MIRNA)

Molekula RNA je poměrně nestabilní a po jejím extrahování z buňky či tkáně má velmi krátký poločas rozpadu. Nestabilitu způsobují zejména ribonukleázy (RNázy), enzymy přítomné v krvi, ve všech tkáních, ve většině bakteriích. Přirozeně se vyskytuje ribozomální RNA (80 % až 90 %), messengerové RNA (2,5 % až 5 %) a transferová RNA (Tan, 2009).

Metody izolace nukleových kyselin lze rozdělit dle techniky procesu na: metody organické extrakce, metody s využitím kolonek (obsahují silikátovou membránu), metody s magnetickými částicemi a metody přímé lýzy buněk (Wilfinger et al., 1997).

Výběr metody vždy záleží na následné analýze. Purifikaci NK ovlivňují určité faktory, například dostupnost vstupního materiálu, který by měl být vždy čerstvý, zmražený či lyofilizovaný. Tím dochází k zamezení degradaci NK enzymy, které jsou přítomné v buněčném extraktu. Dále je pro izolaci NK důležité uvolnění vnitřního obsahu (DNA, RNA, proteiny, lipidy apod.) čehož docílíme pomocí lýzy buněk (Šmarda et al., 2005).

Proteiny uvolněné spolu s DNA a RNA molekulami po lýze buňky je třeba odstranit. K tomu se využívá extrakční metoda za použití směsi fenol-chloroform. Jelikož se jedná o látky nemísitelné s vodou, po jejich přidání do buněčného vodného lyzátu způsobí denaturaci a následné vysrážení proteinů. Po centrifugaci vznikají tři fáze, kdy sraženina denaturovaných proteinů uprostřed odděluje spodní organickou fázi obsahující DNA a vrchní vodní fázi, ve které se nachází molekuly RNA. Zbytky fenolu a chloroformu mohou způsobovat denaturaci dalších enzymů při následných postupech, proto je důležité jejich odstranění. K tomu se využívá ethanol (Šmarda et al., 2005).

K čištění RNA se využívají činidla inhibující RNázy, což jsou obvykle silné denaturanty guanidinových solí, dodecylsulfátu sodného nebo sloučeniny na bázi fenolu snižující riziko degradace RNA ve vzorku (Wilfinger et al., 1997).

Pro získání molekul RNA v této práci byl zvolen způsob izolace kolonkovou metodou. Jde o extrakci na pevné fázi, která využívá skutečnosti, kdy se cílové molekuly vážou na imobilizovaný oxid křemičitý v koloně. Buňky se nejprve rozloží v lyzačním pufru a lyzát se nechá vázat na zmíněný oxid křemičitý v koloně. Pomocí centrifugace lyzát prochází přes membránu. Následují promývací kroky pomocí pufrů, které odstraní všechny nečistoty. Požadované molekuly jsou nakonec eluovány vhodným roztokem, kterým je

v případě RNA voda volná na RNázy (Die Hombrechtikon Systems Engineering, nedatováno).

## 5.1 Izolace mikroRNA z plazmy

V této práci byla pro izolaci miRNA z plazmy využita sada miRNeasy Serum/Plasma Kit od značky QIAGEN, která účinně filtruje RNA z 200  $\mu$ l séra nebo plazmy. RNA připravená pomocí tohoto kitu je vysoce čistá a připravená k použití v následných citlivých aplikacích, neboť postupy minimalizují možnost kontaminace solemi nebo fenolem, což by mohlo při následujících analýzách způsobovat nežádoucí interference (Qiagen, 2016)

Vzorky séra nebo plazmy se lyzují v lyzačním činidle QIAzol, který je součástí sady. Jedná se o jednofázový roztok fenolu a guanidin thiokyanátu usnadňující lýzu tkání, napomáhá k inhibici RNáz a k odstranění většiny buněčné DNA a proteinů z lyzátu organickou extrakcí. Po přidání chloroformu se lyzát rozdělí na vodnou a organickou fázi odstředěním. RNA se dělí na horní, vodnou fázi, zatímco DNA se dělí na mezifázi a proteiny na nižší, organickou fázi nebo mezifázi. Horní vodná fáze se extrahuje a přidá se ethanol, aby se zajistily vhodné vazebné podmínky pro všechny molekuly RNA od přibližně 18 nt výše. Vzorek se poté aplikuje na rotační kolonku, kde se celková RNA váže na membránu a fenol a další kontaminující látky se účinně odplavují. Vysoce kvalitní RNA se poté eluuje v malém objemu vody bez RNázy (Qiagen, 2016).

## 5.2 Hodnocení výtěžku a čistoty RNA

Tradiční metodou pro hodnocení koncentrace a čistoty RNA je UV spektroskopie. Absorbance zředěného vzorku RNA se měří při 260 a 280 nm. Koncentrace nukleové kyseliny se počítá pomocí Lambert-Beerova zákona, který předpokládá lineární změnu absorbance s koncentrací (Wilfinger et al., 1997). V současnosti jsou dostupné specifitější, a tudíž i přesnější metody stanovení koncentrace a kvality RNA, například přístroj Qubit 4 Fluorometer (Wilfinger et al., 1997).

Znění Lambert-Beerova zákona:  $A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$

Kde A ... absorbance dané látky  
 $\varepsilon$  ... molární absorpční koeficient dané látky při vlnové délce  $\lambda$  ( $1 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ )  
l ... tloušťka absorpční vrstvy (cm)  
c ... látková koncentrace dané látky ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )

## 6 METODY STANOVENÍ MOLEKUL MIKRORNA

Vzhledem k tomu, že molekuly miRNA jsou malé a krátké, je potřeba pro jejich stanovení využít velice citlivé metody. V současnosti je nejvhodnější metodou RT-PCR. V této kapitole se věnuji principu PCR a jeho modifikacemi.

### 6.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR je metoda enzymatického zmnožení (amplifikace) daného úseku DNA *in vitro*. Syntéza probíhá cyklickou reakcí ve třech teplotních fázích. Princip metody je postaven na základě zachování pravidla komplementarity bází a schopnosti dvojvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a při následném snížení teploty naopak znovu renaturovat. Pro průběh celé reakce jsou nezbytné oligonukleotidové sondy, které specificky hybridizují na obou koncích cílového úseku DNA a zároveň slouží i jako základ pro tvorbu nových vláken (Bartůňková, 2011).

Mezi výše zmíněné cyklické opakování teplotních fází řadíme:

1. Teplotní denaturace – dochází k oddělování vláken dvojšroubovice za použití vysoké teploty (94-96 °C)
2. Annealing – připojení primerů k jejich komplementárním úsekům DNA (50-65 °C)
3. Polymerace (syntéza, elongace) – syntéza primery vymezeného úseku za přítomnosti DNA polymerázy, vytvoření dvouřetězce (72 °C)

Jedná se o poměrně rychlou techniku, která trvá přibližně 45 minut až hodinu, přičemž se za tento čas dokončí 40 cyklů, v závislosti na konkrétním použitém protokolu a použitém nástroji. Kromě univerzální denaturační teploty (95 °C) a času polymerace (90 s) je rychlost PCR závislá i na tzv. rampových rychlostech, které vyjadřují rychlost přístroje měnit jednu teplotu na druhou, a také jak rychle funguje proces chlazení (Bustin, 2017).

#### 6.1.1 RT real-time PCR

Modifikace PCR, při které je zpětným přepisem (reverzní transkripce) výchozí celková RNA nebo mRNA přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymové reverzní transkriptázy. Vzniklá cDNA se následně použije jako templát pro amplifikaci a detekci specifických cílů této cDNA pomocí kvantitativní PCR (qPCR). RT-qPCR lze

aplikovat v analýzách genové exprese, validaci microarray, genetickém testování, při výzkumu nemocí (Bustin, 2004).

V každém cyklu se měří množství DNA v reálném čase. Kvantifikace je možná díky použití fluorescenčních barviv (Kralik, 2017). Ve výsledku je detekován nárůst fluorescence (přičemž vzniklá fluorescence je přímo úměrná množství PCR produktů), z níž je možno při porovnání s hladinou mRNA tzv. housekeeping genomu (genu se stabilní transkripcí) vyhodnotit původní množství miRNA ve vzorku (Bartošík, 2018).

Stanovení miRNA pomocí RT-PCR je již běžnou záležitostí, ovšem pro měření intenzity fluorescence v průběhu amplifikace je potřeba speciálního přístrojového vybavení, kterým je LightCycler (Bartošík, 2018).

RT-qPCR lze provádět v jednokrokovém nebo dvoustupňovém testu. Jednostupňové testy kombinují reverzní transkripci a PCR v jedné zkumavce a pufru za použití reverzní transkriptázy spolu s DNA polymerázou. Navíc využívá pouze primery specifické pro sekvenci. Ve dvoustupňových testech se kroky reverzní transkripce a PCR provádějí v oddělených zkumavkách s různými pufrů a reakčními podmínkami (Bustin, 2004).

## 6.2 Microarrays

DNA čipy nacházejí v posledních letech své uplatnění zejména v onkologii. Kromě možnosti paralelního stanovení míry exprese tisíců genů lze detekovat změny v expresi těchto genů mezi vzorky nádorové a zdravé tkáně. Principem metody je alelově specifická hybridizace, kdy se RNA analyzovaného vzorku na základě zachování komplementarity bází nukleotidů specificky hybridizuje se sondami nukleotidových kyselin, které jsou již navázány na nosiči. Nosičem může být skleněná či silikonová destička a jako sondy se využívají oligonukleotidy nebo cDNA. Navázané množství RNA se měří díky fluorescenčnímu značení (Pospíšilová et al., 2004).

Nevýhodou této metody je nutnost pořízení vysokorozlišovací kamery, drahých fluorescenčních značek a vyšší náchylnost k chybám (Bartošík, 2018).

## 6.3 Next generation sequences

Sekvenování nové generace je metodou, která byla původně nazývána jako „masivně paralelním sekvenováním“ neboť byla zavedena a umožňovala sekvenování mnoha řetězců



DNA současně, místo jednoho po druhém, jako u tradičního Sangerova sekvenování kapilární elektroforézou (Thermo Fisher Scientific, nedatováno).

Vzorek DNA (nebo cDNA vzniklá reverzní transkripcí z RNA) je rozdělen na krátké fragmenty, na jejichž konce se navážou adaptorové sekvence (oligonukleotidové sekvence) a společně tak vytváří tzv. sekvenační knihovnu. Následně dochází k amplifikaci a paralelnímu sekvenování, které dnes probíhá nejčastěji pomocí syntézy. DNA polymeráza postupně syntetizuje komplementární vlákno k sekvenovanému fragmentu jednovláknového templátu. Připojování nukleotidů je spojeno s emisí pokaždé jiného signálu, který zachycuje detektor. Tyto sekvence jsou postupně analyzovány a přiřazovány k referenčnímu genomu (Slabý, 2018).

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 7.1 Hlavní cíl

Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné využít skupiny mikroRNA jako diagnostické a prognostické biomarkery pro pacienty s melanomem. MiRNA byla stanovena pomocí RT real-time PCR po izolaci nukleových kyselin (RNA) na silikátovou membránu z plazmy získané z plné krve pacientů odebrané do zkumavky s K<sub>3</sub>EDTA.

Pro izolaci byla použita souprava značky Qiagen a parametry izolované RNA (koncentrace a čistota) byly měřeny na přístroji Nanodrop 1000.

Výsledné naměřené hodnoty jsou porovnávány v jednotlivých časových intervalech: před operací, po operaci, 1. až 4. den po operaci, první ambulantní návštěva.

### 7.2 Dílčí cíle

1. Izolovat celkovou RNA z plazmy plné krve pacientů s melanomem.
2. Změřit koncentraci získané celkové RNA.
3. Vyhodnotit čistotu izolované RNA.

## 8 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Cílem bakalářské práce bylo zvládnutí metodiky izolace RNA z periferní krve (plazmy) pacientů léčených pro melanom pro stanovení markerů z rodiny mikroRNA zodpovězení následujících otázek:

1. V jaké průměrné koncentraci se molekuly RNA v plazmě pacientů léčených pro melanom nacházejí?
2. Jsou rozdíly v koncentraci izolované RNA mezi dny předoperačního a pooperačních odběrů?
3. Je možné z takto izolované RNA standardním postupem stanovit jednotlivé miRNA?

## 9 METODIKA PRÁCE

Pro výzkum bylo použito 732 vzorků plazmy anonymizovaných pacientů s maligním melanomem. Ze všech těchto 732 vzorků byla provedena izolace RNA, a to kolonkovou metodou. Následně byla změřena koncentrace a čistota získané RNA spektrofotometricky při 260 a 280 nm přístrojem Nanodrop 1000.

Izolace miRNA byla prováděna v laboratoři vybavené pro izolaci nukleových kyselin s využitím kolonkové metody QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Kit. Veškeré úkony byly prováděny na pracovním stole očištěném roztokem 70% alkoholu v ochranných bezpudrových rukavicích a v ochranném plášti.

### 9.1 Přístrojové vybavení

Pro izolaci miRNA v rámci této práce bylo použito na Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni toto přístrojové vybavení:

- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Německo): 1000  $\mu$ l, 2000  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l
- software NanoDrop 1000 3.7 (NanoDrop Technologies, USA)
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA) (viz Obr. 9)
- centrifuga Micro Star 17 (VWR International, USA) (viz Obr. 5)
- centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Německo) (viz Obr. 6)
- centrifuga Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific, USA) (viz Obr. 7)
- vortex Digital vortex mixer with IR sensors TX4 (Velp Scientifica, Itálie) (viz Obr. 8)

Obrázek 5: Centrifuga Micro Star 17



Zdroj: Vlastní

Obrázek 6: Centrifuga MiniSpin®



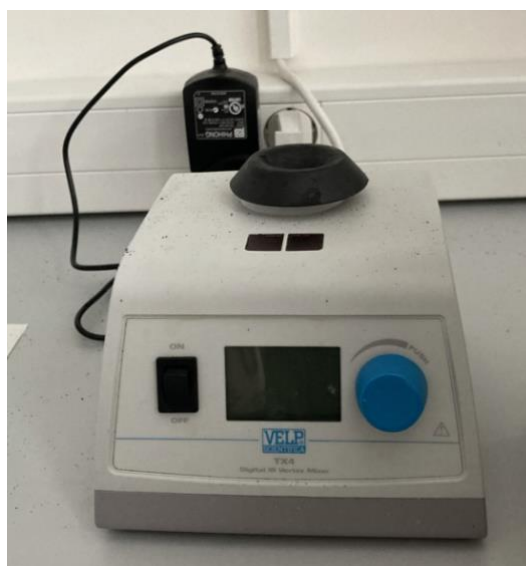
Zdroj: Vlastní

Obrázek 7: Centrifuga Fresco 2



Zdroj: Vlastní

Obrázek 8: Vortex Digital vortex mixer with IR sensors TX4

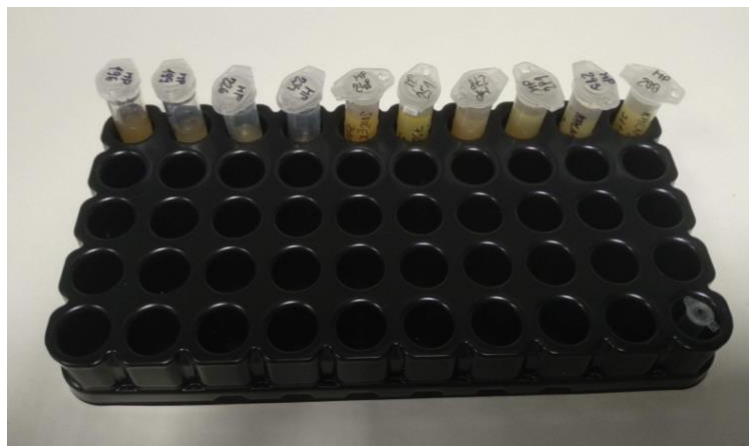


Zdroj: Vlastní

## 9.2 Postup izolace miRNA z plazmy

1. Hluboce zmraženou plazmu vyndáme z mrazícího boxu (-70 °C) a při pokojové teplotě necháme rozmrazit. Před použitím řádně protřepeme, zvortexujeme a krátce stočíme (10 s).

Obrázek 9: Rozmrazující se vzorky plazmy



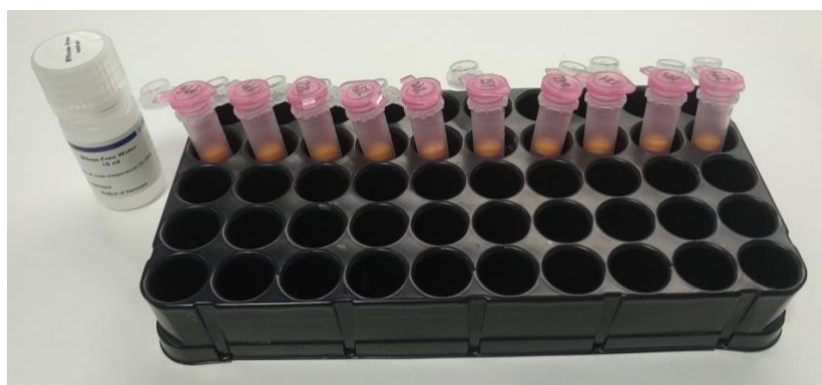
Zdroj: Vlastní

2. Do čisté 1,5 ml epe napipetujeme 200  $\mu$ l plazmy a přidáme 1000  $\mu$ l QIAzol Lysis Reagent. Následně celou směs krátce zvortexujeme.
3. Přidáme 3,5  $\mu$ l miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control a 200  $\mu$ l chloroformu.
4. Epe se směsí uzavřeme, prudce a důkladně protřepeme, zvortexujeme (20 s).
5. Centrifugujeme 15 min. při 14 tis. otáčkách při teplotě 4 °C.
6. Horní fázi (650  $\mu$ l) přeneseme do nové 2 ml epe, přidáme 975  $\mu$ l 100% ethanolu a řádně promícháme.
7. Z této směsi odebereme cca 550  $\mu$ l, přeneseme na kolonku umístěnou ve 2 ml epe bez víčka a centrifugujeme 30 s při 8 tis. otáčkách.
8. Po centrifugaci odpad vylijeme, epe bez víčka usušíme a znovu použijeme.
9. Bod 8. a 9. opakujeme 3 $\times$ , dokud celý vzorek nefiltrujeme přes kolonku.
10. Na kolonku napipetujeme 700  $\mu$ l RWT (součást kitu), centrifugujeme 30 s při 10 tis. otáčkách. Odpad vylijeme, epe osušíme a znovu použijeme.

11. Napipetujeme 500  $\mu$ l RPE (součást kitu), centrifugujeme 30 s při 10 tis. otáčkách. Odpad vylijeme, epe osušíme, znovu použijeme.
12. Přidáme 500  $\mu$ l 80% ethanolu, centrifugujeme 2 min. při 10 tis. otáčkách. Po centrifugaci epe s odpadem vyhodíme (odpad nesmí přijít do kontaktu s membránou).
13. Kolonku umístíme do nové 2 ml epe a centrifugujeme 5 min. při max. otáčkách (13400 ot.).
14. Kolonku přesuneme do nové 1,5 ml epe s víčkem, přímo na střed membrány napipetujeme 25  $\mu$ l RNase-free water a centrifugujeme 75 s při max. otáčkách. Následně tento bod zopakujeme ještě jednou se stejným eluátem.

*(Zdroj: miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit Handbook 2390-002, Qiagen, 2016)*

*Obrázek 10: Kolonky při posledním kroku izolace*



*Zdroj: Vlastní*

### **9.3 Postup měření koncentrace a čistoty miRNA na přístroji Nanodrop 1000**

1. V notebooku spustíme program Nanodrop 1000.
2. Iniciujeme přístroj pomocí 1  $\mu$ l RNA free water.
3. Jako možnost měření v programu navolíme NUCLEIC ACID a dále pak zvolíme RNA-40.
4. Změříme BLANK – na čidlo Nanodropu napipetujeme 1  $\mu$ l RNA free water a klikneme na tlačítko BLANK.



5. Dále měříme naše vzorky podobným stylem – vždy pipetujeme 1  $\mu$ l vzorku na čidlo, do okénka SAMPLE ID napíšeme číslo vzorku a pro spuštění měření klikneme na MEASURE. Před nanesením dalšího vzorku čidlo vždy otřeme.
6. Výsledky nakonec ukládáme: SHOW REPORT  $\rightarrow$  REPORTS  $\rightarrow$  SAVE REPORTS  $\rightarrow$  EXPORT REPORTS AND STANDARTS TABLES.

*Zdroj: miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit Quick-Start Protocol, Qiagen, 2016*

*Obrázek 9: Spektrofotometr NanoDrop 100*



*Zdroj: Vlastní*

## 10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Tabulka 1: Deskriptivní statistika naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů

(tabulka pokračuje níže viz Tab. 2)

| Časové podskupiny | RNA (ng/μl) průměr | Interval spolehlivosti -95,00 % | Interval spolehlivosti +95,00 % | RNA (ng/μl) Počet pacientů | RNA (ng/μl) Sm. odch. |
|-------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| před operací      | 20,87              | 19,17                           | 22,57                           | 103,00                     | 8,69                  |
| po operaci        | 22,21              | 19,91                           | 24,51                           | 100,00                     | 11,58                 |
| 1.- 4. den po     | 21,40              | 20,01                           | 22,78                           | 188,00                     | 9,61                  |
| 1. amb.           | 22,50              | 20,03                           | 24,97                           | 90,00                      | 11,79                 |
| Vš.skup.          | 21,66              | 20,74                           | 22,58                           | 481,00                     | 10,29                 |

Zdroj: Vlastní

Tabulka 2: Deskriptivní statistika naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů

| Časové podskupiny | RNA (ng/μl) Sm. chyba | RNA (ng/μl) Min. | RNA (ng/μl) Max. | RNA (ng/μl) 25.kvartil | RNA (ng/μl) medián | RNA (ng/μl) 75.kvartil |
|-------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| před operací      | 0,86                  | 6,50             | 46,40            | 13,50                  | 18,90              | 25,00                  |
| po operaci        | 1,16                  | 6,10             | 65,70            | 14,40                  | 19,65              | 25,95                  |
| 1.- 4. den po     | 0,70                  | 5,30             | 71,70            | 14,95                  | 19,55              | 25,80                  |
| 1. amb.           | 1,24                  | 6,30             | 71,30            | 13,50                  | 20,75              | 27,90                  |
| Vš.skup.          | 0,47                  | 5,30             | 71,70            | 14,50                  | 19,50              | 25,70                  |

Zdroj: Vlastní

Tabulka 3: Anova test – porovnání koncentrací izolované RNA u jednotlivých skupin odběrů

|             | SČ efekt | SV efekt | PČ efekt | SČ chyba | SV chyba | PČ chyba | F    | p           |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|-------------|
| RNA (ng/μl) | 171,30   | 3,00     | 57,10    | 50640,12 | 477,00   | 106,16   | 0,54 | <b>0,66</b> |

Zdroj: Vlastní

Tabulka 4: Deskriptivní statistika čistoty naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů

(tabulka pokračuje níže viz Tab. 5)

| Časové podskupiny | Čistota 260/280 Průměr | Interval Spolehlivosti -95,00 % | Interval Spolehlivosti +95,00 % | Čistota 260/280 Počet pacientů | Čistota 260/280 Sm. odch. |
|-------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| před operací      | 1,48                   | 1,45                            | 1,51                            | 103,00                         | 0,16                      |
| po operaci        | 1,46                   | 1,43                            | 1,50                            | 100,00                         | 0,16                      |
| 1.- 4. den po     | 1,47                   | 1,45                            | 1,49                            | 188,00                         | 0,17                      |
| 1. amb.           | 1,49                   | 1,46                            | 1,52                            | 90,00                          | 0,14                      |
| Vš.skup.          | 1,48                   | 1,46                            | 1,49                            | 481,00                         | 0,16                      |

Zdroj: Vlastní

Tabulka 5: Deskriptivní statistika čistoty naměřených koncentrací RNA u jednotlivých skupin odběrů

| Časové podskupiny | Čistota 260/280 Sm. chyba | Čistota 260/280 Min. | Čistota 260/280 Max. | Čistota 260/280 25.kvartil | Čistota 260/280 medián | Čistota 260/280 75.kvartil |
|-------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| před operací      | 0,02                      | 0,81                 | 2,37                 | 1,41                       | 1,46                   | 1,55                       |
| po operaci        | 0,02                      | 0,63                 | 2,10                 | 1,41                       | 1,45                   | 1,53                       |
| 1.- 4. den po     | 0,01                      | 0,63                 | 2,05                 | 1,39                       | 1,48                   | 1,56                       |
| 1. amb.           | 0,02                      | 0,78                 | 1,88                 | 1,41                       | 1,48                   | 1,56                       |
| Vš.skup.          | 0,01                      | 0,63                 | 2,37                 | 1,40                       | 1,48                   | 1,55                       |

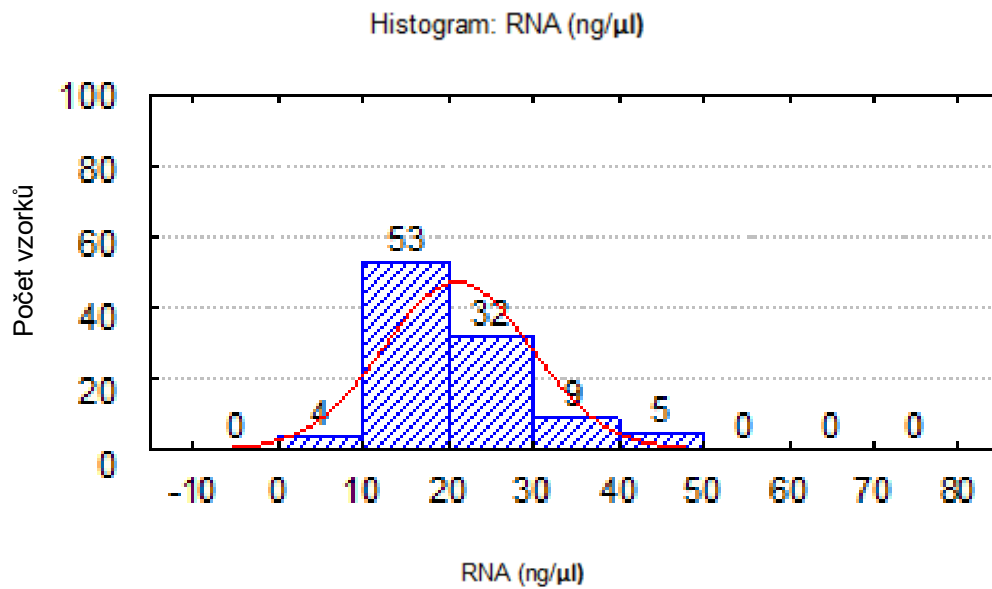
Zdroj: Vlastní

Tabulka 6: Analýza rozptylu – rozdíl čistoty mezi jednotlivými náběry

|                  | SČ efekt | SV efekt | PČ efekt | SČ chyba | SV chyba | PČ chyba | F    | p           |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|-------------|
| čistota -260/280 | 0,04     | 3,00     | 0,01     | 12,62    | 477,00   | 0,03     | 0,55 | <b>0,65</b> |

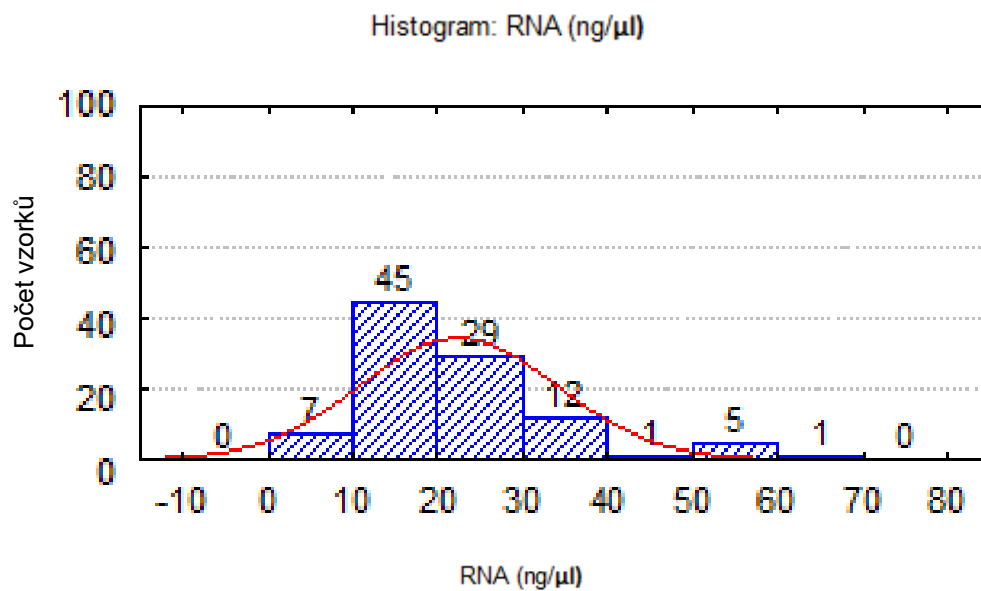
Zdroj: Vlastní

Graf 1: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy získaných před operací



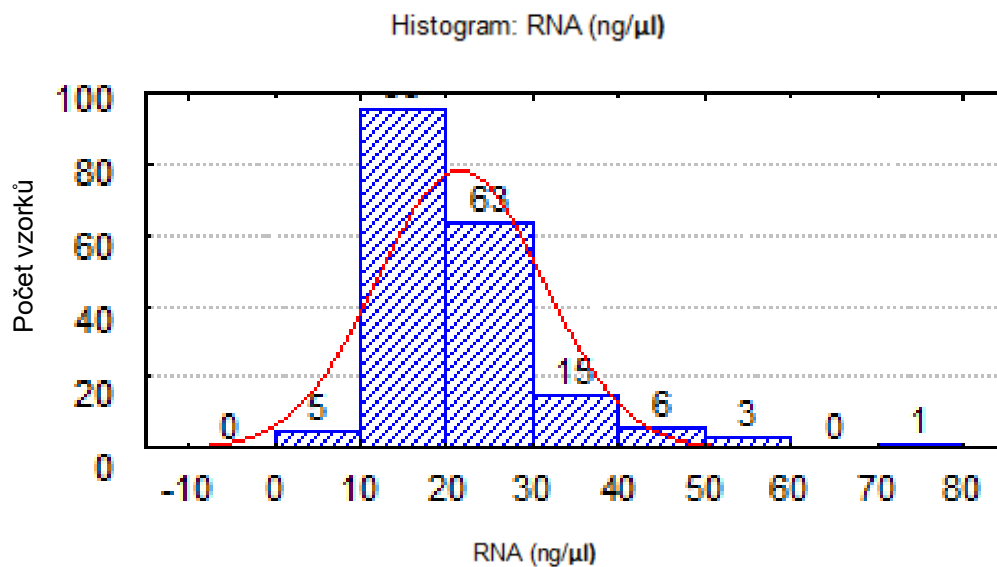
Zdroj: Vlastní

Graf 2: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy získaných po operaci



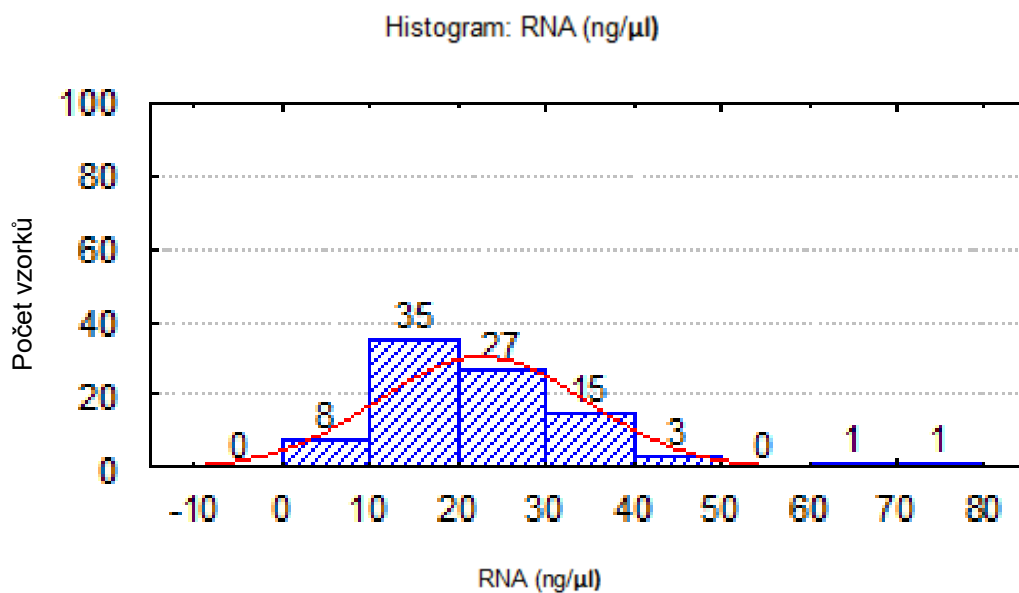
Zdroj: Vlastní

Graf 3: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy získaných 1.-4. den po operaci



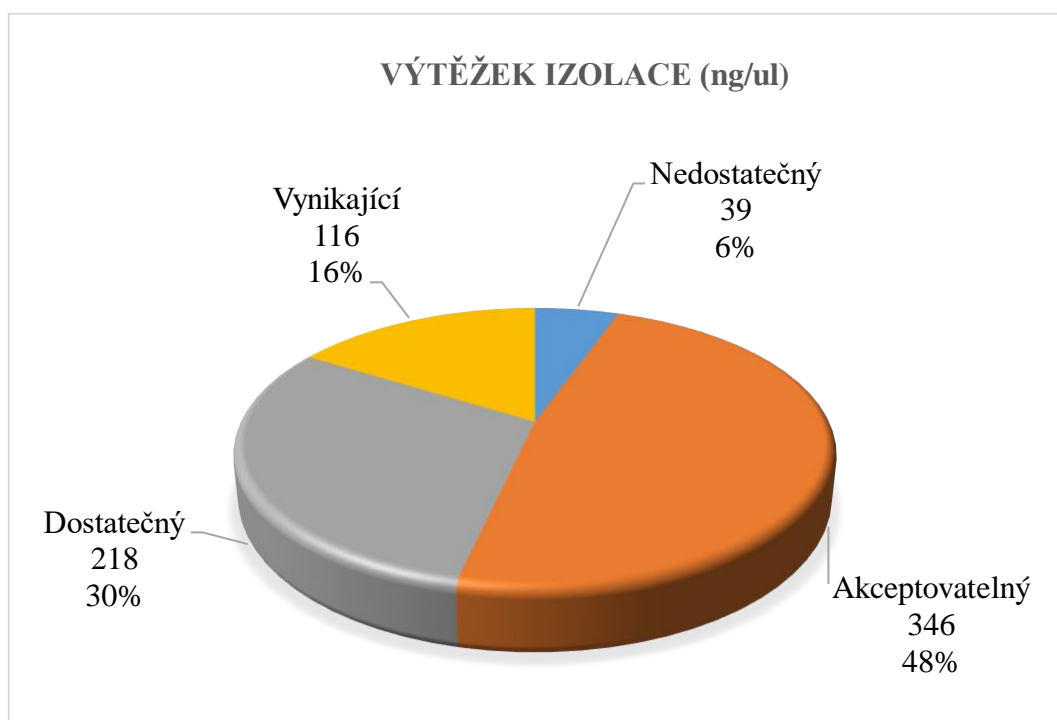
Zdroj: Vlastní

Graf 4: Distribuce naměřených koncentrací RNA ze vzorků plazmy odebraných při první návštěvě ambulance



Zdroj: Vlastní

Graf 5: Celkový výtěžek izolované RNA, všechny vzorky dohromady



Zdroj: Vlastní

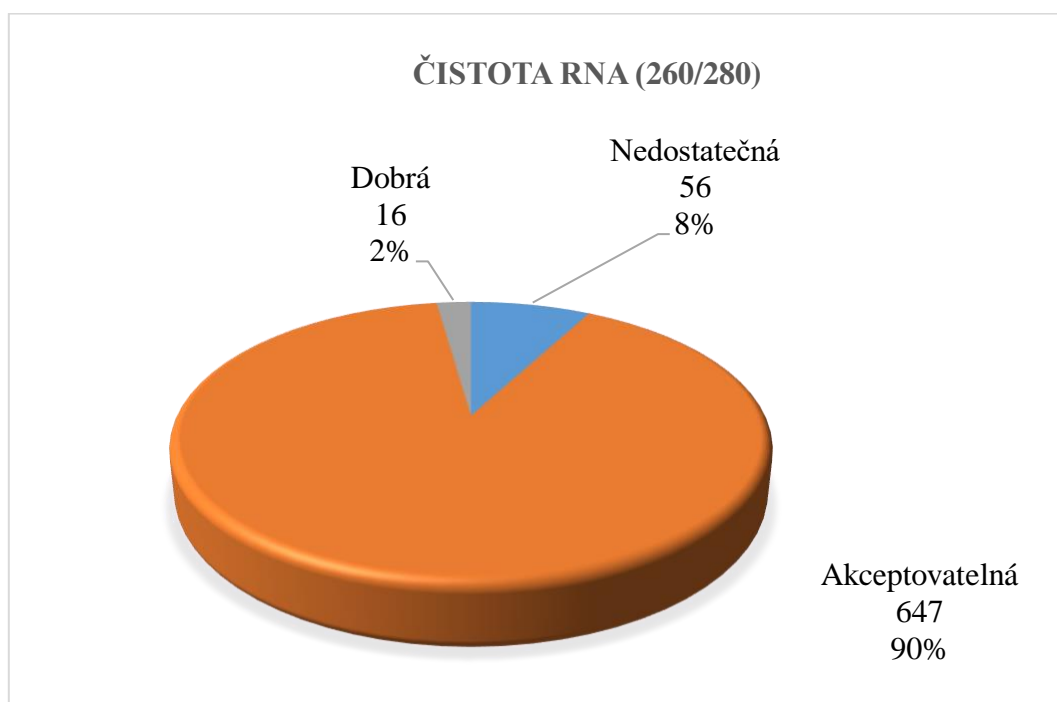
Výtěžek RNA ... nedostatečný: do 10 ng/μl

akceptovatelný: 10-20 ng/μl

dostatečný: 20-30 ng/μl

vynikající: více než 30 ng/μl

Graf 6: Čistota izolované RNA, všechny vzorky dohromady



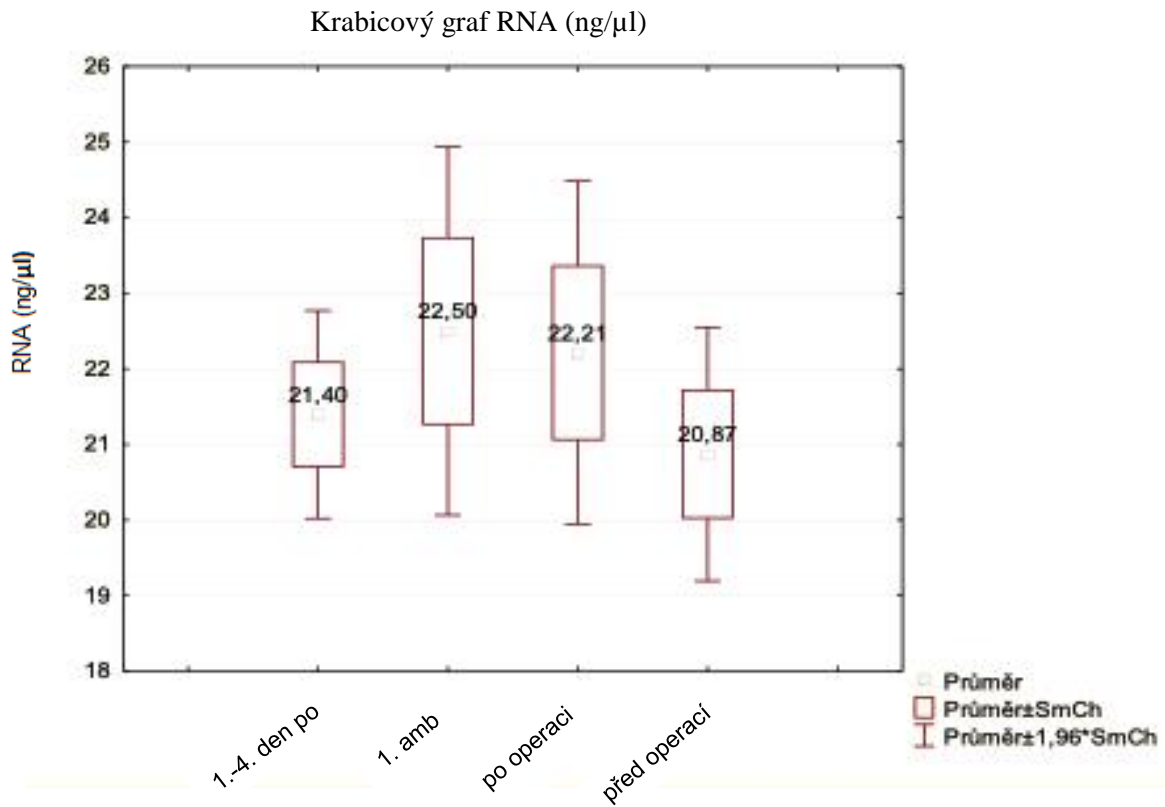
Zdroj: Vlastní

Čistota RNA ... nedostatečná: do 1,3

akceptovatelná: 1,3-1,8

dobrá: 1,8 a více

Graf 7: Box plot porovnání koncentrací izolované RNA u jednotlivých skupin odběrů



Zdroj: Vlastní



## DISKUZE

Cílem bakalářské práce bylo zvládnutí metodiky izolace RNA z periferní krve (plazmy) pacientů léčených pro melanom. Následně v další části projektu, který není součástí bakalářské práce, probíhá na pracovišti Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni stanovení vybraných miRNA pro nalezení vhodného panelu pro časnou detekci recidivy.

Pro zdárný průběh vlastního stanovení vybraných miRNA jsem potřebovala odpověď na následující otázku: „V jaké průměrné koncentraci se molekuly RNA v plazmě pacientů léčených pro melanom nacházejí?“. Znalost koncentrace poskytuje odpověď, zda stanovení miRNA metodou RT real-time PCR bude probíhat správně. Zjistila jsem, že nejnižší průměrná koncentrace (předoperační odběry) je 20,87 ng/μl a dolní kvartil 13,5 ng/μl. To jsou hodnoty vhodné pro provedení stanovení panelu miRNA metodou RT real-time PCR. Výrobce souprav TaqMan™ MicroRNA Assay doporučuje množství RNA pro provedení reverzní transkripce 1-10 ng. Empiricky bylo zjištěno, že reakce velice dobře fungují při vstupním množství 50 ng do RT. Při množství 1 ng RNA v RT již stanovení real-time PCR vykazuje vysoké hodnoty Ct (nad 35), které už nejsou vhodné pro vyhodnocení.

Dále jsem zjišťovala, zda jsou rozdíly v koncentraci izolované RNA mezi dny předoperačních a pooperačních odběrů. Statistická analýza ukázala, že tyto rozdíly na hladině významnosti 0,05 nejsou. To znamená, že ke všem odběrům můžeme přistupovat stejně z hlediska způsobu stanovení jednotlivých miRNA. Analýzy hladin vybraných miRNA u těchto vzorků již na Ústavu biologie probíhají, tudíž odpověď na otázku „Je možné z takto izolované RNA standardním postupem stanovit jednotlivé miRNA?“ je kladná.

Obecné nároky na čistotu izolované RNA jsou poměr absorbance 260 nm/280 nm mezi 1,8-2. V praxi se ukazuje, že pro kvantitativní stanovení miRNA metodou RT real-time PCR tyto hodnoty nejsou kritické, stanovení zdárně proběhne i při nižší čistotě. Nedostatečná čistota ( $260/280 < 1,3$ ) byla zaznamenána u 8 % vzorků a jak se projeví na vlastním stanovení miRNA, ukáží vlastní výsledky RT real-time PCR. Pouze 6 % izolovaných vzorků mělo nedostatečný výtěžek izolace, tzn. do 10 ng/μl. V takovém případě je potřeba izolaci opakovat.

Příznivým výsledkem celého projektu, jehož součástí je izolace RNA z plazmy – náplň této bakalářské práce, by bylo nalezení konkrétní miRNA nebo panelu max. 3 miRNA

který by umožnil zachycení návratu onemocnění u pacientů s maligním melanomem, a to pouze na základě odběru periferní krve.

Důležitá pro stanovení molekul miRNA je také časová náročnost izolace. Současná izolace celkové RNA patnácti vzorků plazmy trvá přibližně 150 minut.

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabývala izolací nukleových kyselin, konkrétně molekul miRNA, které by mohly sloužit jako diagnostické a prognostické markery pacientů s melanomem.

Izolace RNA metodou kolonek se silikátovou membránou, se ukázala vhodná pro stanovení molekul miRNA u pacientů léčených pro melanom, a to potenciálně i v klinické praxi. Stanovení konkrétní miRNA se provádí pomocí RT real-time PCR. Izolace celkové RNA patnácti vzorků plazmy trvá přibližně 150 minut.

Izolovaná RNA 732 vzorků plazmy pacientů léčených pro melanom bude využita pro studii s cílem zjistit, zda je možné tyto markery v klinické diagnostice využívat a určit panel miRNA pro časný záchyt recidivy onemocněním.

## SEZNAM LITERATURY

ADAM, Zdeněk, Jana KOPTÍKOVÁ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Praha: Grada, 2003. ISBN 8024706776.

ARENBERGER, Petr. Maligní melanom a ostatní nádory kůže. *Linkos – Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně* [online]. © 2021, 6. 6. 2006, 10. 9. 2014 [cit. 2020-12-07]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/maligni-melanom-spinaliom-bazaliom-c43-44-d03/maligni-melanom-a-ostatni-nadory-kuze/>

BARTOŠÍK, Martin a Ludmila JIRÁKOVÁ. Current Methods of microRNA Analysis. *Klinická onkologie* [online]. 2018, 31(Suppl2) [cit. 2021-02-21]. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20182S93

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 9788024735337

BUSTIN, S. A. (2004). *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla, CA, International University Line.

BUSTIN, Stephen A. How to speed up the polymerase chain reaction. *Biomolecular Detection and Quantification* [online]. 2017, 12, 10-14 [cit. 2021-02-21]. ISSN 22147535. Dostupné z: doi:10.1016/j.bdq.2017.05.002

COOPER, Geoffrey M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates, 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6.

HALPERN, Allan C., Ashfaq A. MARGHOOB a Ofer REITER. Melanoma Overview: A Dangerous Skin Cancer. *The Skin Cancer Foundation* [online]. New York, ©2021, January 2020 [cit. 2020-12-07]. Dostupné z: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/#four>

HANAHAN, Douglas a Robert A WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 2000, 100(1), 57-70 [cit. 2021-02-07]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9

HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, 144(5), 646-674 [cit. 2021-01-12]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

HASCHEK, Wanda M., Colin G. ROUSSEAU a Matthew A. WALLIG. Manifestations of Toxic Cell Injury. *Fundamentals of Toxicologic Pathology* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 9-42 [cit. 2021-02-08]. ISBN 9780123704696. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-370469-6.00002-7

HOFMANOVÁ, Jiřina. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2021-03-26]. Elportál. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=1126513>. ISSN 1802-128X.

HOWELL, JR, Paul M., Xiaobo LI, Adam I. RIKER a Yaguang XI. MicroRNA in Melanoma. *The Ochsner Journal*. Summer, 2010, 10(2), 83-92. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3096202/>

HRUBAN, Ralph. Types of Tumors. *Johns Hopkins Pathology* [online]. Baltimore, © 2021, 2013 [cit. 2021-03-13]. Dostupné z: <https://pathology.jhu.edu/pancreas/types-of-tumors>

CHEN, TAO. The Role of MicroRNA in Chemical Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* [online]. 2010, 28(2), 89-124 [cit. 2021-02-21]. ISSN 1059-0501. Dostupné z: doi:10.1080/10590501.2010.481477

CHIAL, Heidi. Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer. *Nature Education*. 2008, 1(1), 33. Dostupné také z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/proto-oncogenes-to-oncogenes-to-cancer-883/>

KRALIK, Petr a Matteo RICCHI. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 8 [cit. 2021-02-21]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00108

MACFARLANE, Leigh-Ann a Paul R. MURPHY. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov., 11(7), 537–561. ISSN 13892029. PMID: 21532838. Dostupné z: doi:10.2174/138920210793175895

Melanom je nejagresivnější kožní nádor. Jaké jsou jeho příznaky? *Zdravotnictví a medicína* [online]. Praha 4, 2021, 2020 [cit. 2021-02-08]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/leky/melanom-priznaky-lecba/>

Melanom kůže. *Masarykův onkologický ústav* [online]. Brno, © 2009 — 2021 [cit. 2020-12-07]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/c43-d03-melanom-kuze/di63>

Nádory kůže. Linkos.cz. Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Linkos.cz [online]. Copyright © 2021 ČOS ČLS JEP [cit. 18.03.2021]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/bazocelularni-karcinom-bazaliom/>

NOVÁK, J. MikroRNA v kardiologii: přehled pro klinickou praxi. *Kardiologická revue: Interní medicína*. 2016, 2016(4), 258. ISSN 2336-2898.

O'BRIEN, Jacob, Heyam HAYDER, Yara ZAYED a Chun PENG. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* [online]. 2018, 9 [cit. 2021-02-20]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2018.00402

POLIVKA, Jiri, Martin PESTA a Filip JANKU. Testing for oncogenic molecular aberrations in cell-free DNA-based liquid biopsies in the clinic: are 61 there yet? *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2015, 15(12), 1631-1644 [cit. 2021-01-12]. ISSN 1473-7159. Dostupné z: doi:10.1586/14737159.2015.1110021

POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Romana BORSKÁ, Boris TICHÝ, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER. DNA čipy (microarrays) - účinný nástroj v onkologickém výzkumu a diagnostice. In XVIII. Olomoucké hematologické dny, Olomouc. 2004.

QIAGEN – miRNeasy Serum/Plasma Advanced Handbook 1/2020 (uživatelská příručka)

SARNOFF, Deborah S. Skin Cancer 101: Knowledge is Your Best Defense. *The Skin Cancer Foundation* [online]. New York, ©2021, January 2020 [cit. 2020-12-07]. Dostupné z: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/>

SHIEL JR., William C. Medical Definition of Proto-oncogene. *MedicineNet* [online]. California: WebMD, LLC., ©1996-2021, 25. 1. 2017 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: [https://www.medicinenet.com/cancer\\_101\\_pictures\\_slideshow/article.htm](https://www.medicinenet.com/cancer_101_pictures_slideshow/article.htm)

SILVA, Debora Cristina Pereira da, Felipe Demani CARNEIRO, Kelly Costa de ALMEIDA a Caroline FERNANDES-SANTOS. Role of miRNAs on the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [online]. [cit. 2021-02-08]. ISSN 0066-782X. Dostupné z: doi:10.5935/abc.20180215

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

SLABÝ, Ondřej. Technologie sekvenování nové generace: celogenomové, celoexomové a cílené – hotspot – sekvenování. *ProLékaře* [online]. Praha: MeDitorial, © 2008-2021, 2018 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/tema/precizni-medicina/detail/technologie-sekvenovani-nove-generace-celogenomove-celoexomove-a-cilene-hotspot-sekvenovani-105628>

Spin-Column Extraction: Fast and Efficient Purification – HSE.AG. HSE.AG: Where science and technology evolve [online]. Copyright © 2018 Hombrechtikon Systems Engineering AG [cit. 21.02.2021]. Dostupné z: <https://www.hseag.com/our-references/spin-column-extraction/>

ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 9788021038417.

TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, 2009, 1-10 [cit. 2021-02-21]. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398

What is Next-Generation Sequencing. *ThermoFisher Scientific* [online]. Thermo Fisher Scientific, © 2020 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/what-is-next-generation-sequencing.html>

WILFINGER, William W., Karol MACKAY a Piotr CHOMCZYNSKI. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* [online]. 1997, 22(3), 474-481 [cit. 2021-03-26]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/97223st01

WYANT, Tracy, William G. CANCE a Robert SMITH. Oncogenes and tumor suppressor genes. *American Cancer Society* [online]. © 2021, June 25, 2014 [cit. 2021-02-08].

Dostupné z: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>

## **SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha A – Veškerá naměřená data všech izolovaných vzorků



## PŘÍLOHY

### Příloha A – Veškerá naměřená data všech izolovaných vzorků

Tabulka 7: Data 732 naměřených vzorků, která byla získána izolací a měřením.

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 272          | 465725        | 1. amb.           | 1. amb.           | 16,7        | 1,65            |
| 273          | 540730        | 1. amb.           | 1. amb.           | 24,7        | 1,67            |
| 9            | 325308        | 1. amb.           | 1. amb.           | 32,1        | 1,73            |
| 10           | 886013        | 1. amb.           | 1. amb.           | 29          | 1,51            |
| 19           | 415104        | 1. amb.           | 1. amb.           | 27,2        | 1,48            |
| 43           | 481004        | 1. amb.           | 1. amb.           | 21,5        | 1,52            |
| 44           | 350428        | 1. amb.           | 1. amb.           | 35,5        | 1,35            |
| 53           | 480524        | 1. amb.           | 1. amb.           | 68,4        | 1,67            |
| 58           | 505329        | 1. amb.           | 1. amb.           | 21,2        | 1,45            |
| 63           | 700919        | 1. amb.           | 1. amb.           | 9,7         | 1,54            |
| 77           | 445123        | 1. amb.           | 1. amb.           | 13,3        | 1,57            |
| 78           | 615630        | 1. amb.           | 1. amb.           | 13          | 1,7             |
| 89           | 820811        | 1. amb.           | 1. amb.           | 21,2        | 1,5             |
| 92           | 480404        | 1. amb.           | 1. amb.           | 17,4        | 1,49            |
| 103          | 461120        | 1. amb.           | 1. amb.           | 71,3        | 1,45            |
| 106          | 471104        | 1. amb.           | 1. amb.           | 20,3        | 1,57            |
| 113          | 700506        | 1. amb.           | 1. amb.           | 23,8        | 1,55            |
| 119          | 506120        | 1. amb.           | 1. amb.           | 17          | 1,5             |
| 132          | 750526        | 1. amb.           | 1. amb.           | 27,9        | 1,43            |
| 133          | 825811        | 1. amb.           | 1. amb.           | 20,3        | 1,65            |
| 137          | 385309        | 1. amb.           | 1. amb.           | 34,3        | 1,64            |
| 155          | 545531        | 1. amb.           | 1. amb.           | 9,8         | 1,52            |
| 156          | 420315        | 1. amb.           | 1. amb.           | 11,8        | 1,56            |
| 160          | 680930        | 1. amb.           | 1. amb.           | 23,9        | 1,43            |
| 166          | 686020        | 1. amb.           | 1. amb.           | 16,05       | 1,37            |
| 171          | 520424        | 1. amb.           | 1. amb.           | 17,71       | 1,52            |
| 174          | 611104        | 1. amb.           | 1. amb.           | 13,1        | 1,37            |
| 184          | 496105        | 1. amb.           | 1. amb.           | 10,5        | 1,82            |
| 194          | 735131        | 1. amb.           | 1. amb.           | 18,2        | 1,48            |
| 195          | 605924        | 1. amb.           | 1. amb.           | 15,2        | 1,48            |
| 199          | 495711        | 1. amb.           | 1. amb.           | 23,2        | 1,59            |
| 220          | 755621        | 1. amb.           | 1. amb.           | 21,9        | 1,35            |
| 225          | 616130        | 1. amb.           | 1. amb.           | 18          | 1,67            |
| 236          | 460121        | 1. amb.           | 1. amb.           | 11,5        | 1,54            |
| 238          | 650521        | 1. amb.           | 1. amb.           | 22,2        | 1,53            |
| 253          | 730603        | 1. amb.           | 1. amb.           | 10          | 1,53            |
| 271          | 785728        | 1. amb.           | 1. amb.           | 39,6        | 1,53            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 274          | 655267        | 1. amb.           | 1. amb.           | 11,5        | 1,75            |
| 285          | 560927        | 1. amb.           | 1. amb.           | 22,9        | 1,88            |
| 301          | 871008        | 1. amb.           | 1. amb.           | 32,7        | 1,33            |
| 309          | 741217        | 1. amb.           | 1. amb.           | 15,7        | 1,44            |
| 310          | 456008        | 1. amb.           | 1. amb.           | 10,2        | 1,47            |
| 316          | 581231        | 1. amb.           | 1. amb.           | 30,08       | 1,44            |
| 317          | 515512        | 1. amb.           | 1. amb.           | 31,46       | 1,57            |
| 330          | 580417        | 1. amb.           | 1. amb.           | 19,4        | 1,48            |
| 3            | 325308        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 26          | 1,49            |
| 7            | 886013        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 45,6        | 1,57            |
| 15           | 415104        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 25,8        | 1,5             |
| 23           | 876030        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 21,7        | 1,56            |
| 33           | 340103        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 39,1        | 1,35            |
| 36           | 481004        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 17,7        | 1,41            |
| 41           | 350428        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 20,1        | 1,24            |
| 50           | 480521        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 18,9        | 1,38            |
| 56           | 505329        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 56,7        | 1,56            |
| 61           | 700919        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 42,1        | 1,58            |
| 70           | 445123        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 12,7        | 1,48            |
| 71           | 615630        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 56,9        | 1,7             |
| 83           | 820811        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 20,9        | 1,66            |
| 97           | 461120        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 51,7        | 1,62            |
| 98           | 471104        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 27,7        | 1,5             |
| 110          | 700506        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 12,9        | 1,59            |
| 116          | 506120        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 20,3        | 1,54            |
| 125          | 750526        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 16,9        | 1,7             |
| 129          | 385309        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 20,2        | 1,49            |
| 143          | 565721        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 15,6        | 1,69            |
| 144          | 545531        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 16,2        | 1,44            |
| 148          | 680930        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 15,8        | 0,74            |
| 153          | 420315        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 10,7        | 1,42            |
| 159          | 686020        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 18,5        | 1,37            |
| 165          | 520424        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 20,81       | 1,54            |
| 181          | 496105        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 28,1        | 1,4             |
| 189          | 605924        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 15,3        | 1,6             |
| 190          | 735131        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 14          | 1,51            |
| 208          | 401109        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 26,2        | 1,49            |
| 215          | 755621        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 15,2        | 1,57            |
| 216          | 845709        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 10,8        | 1,55            |
| 231          | 460121        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 24,9        | 1,57            |
| 232          | 650521        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 19,6        | 1,46            |
| 242          | 620310        | 1. den po         | 1. - 4. den po    | 15,8        | 1,53            |

Zdroj: Vlastní

| <b>Číslo vzorku</b> | <b>Identifikátor</b> | <b>Časový bod odběru</b> | <b>Časové podskupiny</b> | <b>RNA (ng/μl)</b> | <b>Čistota 260/280</b> |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 250                 | 730603               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 16,45              | 1,41                   |
| 258                 | 465725               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 10,3               | 1,35                   |
| 264                 | 540730               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 14,2               | 1,73                   |
| 265                 | 785728               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 15,5               | 1,75                   |
| 289                 | 871008               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 20                 | 1,5                    |
| 296                 | 456008               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 24,2               | 1,34                   |
| 297                 | 741217               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 21,8               | 1,24                   |
| 307                 | 581231               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 13,6               | 1,55                   |
| 308                 | 515512               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 17,5               | 1,47                   |
| 323                 | 476204               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 22,62              | 1,55                   |
| 324                 | 580417               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 20,37              | 1,43                   |
| 84                  | 480404               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 20,9               | 1,48                   |
| 221                 | 616130               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 14,5               | 1,54                   |
| 280                 | 560927               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 10,1               | 1,34                   |
| 336                 | 780803               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 20,2               | 1,48                   |
| 337                 | 720509               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 21                 | 1,31                   |
| 365                 | 465720               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 28,5               | 1,39                   |
| 373                 | 575215               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 22,03              | 1,38                   |
| 377                 | 435819               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 19,31              | 1,48                   |
| 387                 | 565717               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 25,4               | 1,42                   |
| 398                 | 595211               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 40,1               | 1,5                    |
| 413                 | 700919               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 13                 | 0,63                   |
| 417                 | 571005               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 23,6               | 1,44                   |
| 422                 | 821202               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 9,1                | 1,47                   |
| 427                 | 881161               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 16                 | 1,53                   |
| 433                 | 641103               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 17,43              | 1,36                   |
| 442                 | 515630               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 18,5               | 1,49                   |
| 451                 | 715713               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 20,4               | 1,53                   |
| 454                 | 530717               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 30,3               | 1,53                   |
| 470                 | 935373               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 19,1               | 1,37                   |
| 476                 | 526008               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 27,9               | 1,25                   |
| 482                 | 706214               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 23,9               | 1,32                   |
| 486                 | 625409               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 12,4               | 1,37                   |
| 497                 | 430613               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 15,2               | 1,28                   |
| 505                 | 455525               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 14,4               | 1,27                   |
| 508                 | 485523               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 10,4               | 1,31                   |
| 516                 | 575126               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 27,5               | 1,41                   |
| 522                 | 451006               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 17,1               | 1,37                   |
| 532                 | 720706               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 26,4               | 1,54                   |
| 533                 | 470913               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 71,7               | 1,53                   |
| 539                 | 520615               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 48,63              | 1,41                   |
| 546                 | 585507               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 18,21              | 1,44                   |

Zdroj: Vlastní

| <b>Číslo vzorku</b> | <b>Identifikátor</b> | <b>Časový bod odběru</b> | <b>Časové podskupiny</b> | <b>RNA (ng/μl)</b> | <b>Čistota 260/280</b> |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 557                 | 915404               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 18,8               | 1,68                   |
| 558                 | 630601               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 21,9               | 1,53                   |
| 570                 | 750204               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 34,4               | 1,44                   |
| 577                 | 640507               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 14,5               | 1,67                   |
| 584                 | 460507               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 30,4               | 1,51                   |
| 585                 | 515906               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 19,1               | 1,53                   |
| 597                 | 610407               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 27,1               | 1,35                   |
| 608                 | 586213               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 16,7               | 1,35                   |
| 610                 | 740110               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 28,6               | 1,47                   |
| 615                 | 420503               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 10,6               | 1,6                    |
| 627                 | 760722               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 21,8               | 1,56                   |
| 635                 | 715922               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 27,7               | 1,55                   |
| 639                 | 450608               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 39,7               | 1,55                   |
| 647                 | 585115               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 23,7               | 1,47                   |
| 654                 | 555211               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 20,5               | 1,49                   |
| 658                 | 710531               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 10,1               | 1,54                   |
| 667                 | 550325               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 9,7                | 1,43                   |
| 672                 | 756128               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 10,8               | 1,38                   |
| 681                 | 480228               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 12,6               | 1,45                   |
| 697                 | 555809               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 9,6                | 1,63                   |
| 707                 | 545124               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 15                 | 0,89                   |
| 712                 | 556001               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 23,1               | 1,58                   |
| 716                 | 790407               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 16,9               | 1,48                   |
| 720                 | 555408               | 1. den po                | 1. - 4. den po           | 17,3               | 1,69                   |
| 343                 | 476204               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 30,4               | 1,4                    |
| 344                 | 780803               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 33                 | 1,35                   |
| 345                 | 720509               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 33,9               | 1,44                   |
| 358                 | 881023               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 19,8               | 1,54                   |
| 378                 | 575215               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 13,1               | 1,39                   |
| 381                 | 435819               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 10,9               | 1,41                   |
| 390                 | 565717               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 10,2               | 1,5                    |
| 419                 | 700919               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 8,9                | 1,49                   |
| 423                 | 571005               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 24,4               | 1,47                   |
| 437                 | 641103               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 36,56              | 1,49                   |
| 444                 | 515630               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 19,3               | 1,7                    |
| 471                 | 935373               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 23,4               | 1,36                   |
| 477                 | 526008               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 17,3               | 1,34                   |
| 488                 | 706214               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 16,7               | 1,28                   |
| 493                 | 625409               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 25,5               | 1,27                   |
| 501                 | 430613               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 30,7               | 1,33                   |
| 513                 | 455525               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 27,7               | 1,37                   |
| 519                 | 575126               | 1. amb.                  | 1. amb.                  | 16                 | 1,34                   |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 524          | 451006        | 1. amb.           | 1. amb.           | 27,7        | 1,4             |
| 541          | 720706        | 1. amb.           | 1. amb.           | 48,59       | 1,47            |
| 542          | 470913        | 1. amb.           | 1. amb.           | 22,29       | 1,44            |
| 551          | 585507        | 1. amb.           | 1. amb.           | 41,94       | 1,41            |
| 563          | 630601        | 1. amb.           | 1. amb.           | 21,4        | 1,42            |
| 573          | 915404        | 1. amb.           | 1. amb.           | 33,5        | 1,58            |
| 574          | 750204        | 1. amb.           | 1. amb.           | 16,5        | 1,57            |
| 586          | 640507        | 1. amb.           | 1. amb.           | 24,3        | 1,51            |
| 590          | 460507        | 1. amb.           | 1. amb.           | 49,8        | 1,47            |
| 591          | 515906        | 1. amb.           | 1. amb.           | 15,6        | 1,44            |
| 601          | 530717        | 1. amb.           | 1. amb.           | 34,2        | 1,38            |
| 603          | 610407        | 1. amb.           | 1. amb.           | 23,7        | 1,42            |
| 617          | 586213        | 1. amb.           | 1. amb.           | 9,5         | 1,34            |
| 618          | 586213        | 1. amb.           | 1. amb.           | 8,4         | 1,47            |
| 619          | 420503        | 1. amb.           | 1. amb.           | 9,2         | 1,47            |
| 631          | 760722        | 1. amb.           | 1. amb.           | 17,8        | 1,64            |
| 640          | 715922        | 1. amb.           | 1. amb.           | 23,6        | 1,55            |
| 643          | 450608        | 1. amb.           | 1. amb.           | 17          | 1,58            |
| 651          | 465720        | 1. amb.           | 1. amb.           | 23,3        | 1,39            |
| 659          | 555211        | 1. amb.           | 1. amb.           | 38,7        | 1,55            |
| 664          | 710531        | 1. amb.           | 1. amb.           | 6,3         | 1,36            |
| 674          | 550325        | 1. amb.           | 1. amb.           | 13,8        | 0,78            |
| 676          | 756128        | 1. amb.           | 1. amb.           | 11,3        | 1,4             |
| 686          | 480228        | 1. amb.           | 1. amb.           | 12,5        | 1,85            |
| 699          | 555809        | 1. amb.           | 1. amb.           | 13,5        | 1,65            |
| 722          | 790407        | 1. amb.           | 1. amb.           | 11,5        | 1,54            |
| 723          | 555408        | 1. amb.           | 1. amb.           | 29          | 1,48            |
| 11           | 325308        | 2. amb.           | 2. amb.           | 17,9        | 1,61            |
| 20           | 415104        | 2. amb.           | 2. amb.           | 14,6        | 1,42            |
| 28           | 876030        | 2. amb.           | 2. amb.           | 22,1        | 1,45            |
| 46           | 481004        | 2. amb.           | 2. amb.           | 17,5        | 1,22            |
| 47           | 350428        | 2. amb.           | 2. amb.           | 17,3        | 1,37            |
| 64           | 505329        | 2. amb.           | 2. amb.           | 9,7         | 1,41            |
| 65           | 700919        | 2. amb.           | 2. amb.           | 22          | 1,42            |
| 87           | 445123        | 2. amb.           | 2. amb.           | 38,6        | 1,46            |
| 88           | 615630        | 2. amb.           | 2. amb.           | 24,5        | 1,5             |
| 91           | 820811        | 2. amb.           | 2. amb.           | 23,2        | 1,45            |
| 102          | 480404        | 2. amb.           | 2. amb.           | 3,6         | 1,53            |
| 105          | 461120        | 2. amb.           | 2. amb.           | 28,1        | 1,46            |
| 111          | 471104        | 2. amb.           | 2. amb.           | 12,9        | 1,53            |
| 117          | 700506        | 2. amb.           | 2. amb.           | 13,2        | 1,49            |
| 134          | 750526        | 2. amb.           | 2. amb.           | 11,4        | 1,56            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 135          | 506120        | 2. amb.           | 2. amb.           | 36,4        | 1,5             |
| 145          | 385309        | 2. amb.           | 2. amb.           | 28,3        | 1,47            |
| 149          | 825811        | 2. amb.           | 2. amb.           | 26,4        | 1,6             |
| 161          | 545531        | 2. amb.           | 2. amb.           | 15,4        | 1,42            |
| 162          | 420315        | 2. amb.           | 2. amb.           | 22,4        | 1,53            |
| 167          | 680930        | 2. amb.           | 2. amb.           | 22,66       | 1,55            |
| 172          | 686020        | 2. amb.           | 2. amb.           | 25,81       | 1,57            |
| 173          | 520424        | 2. amb.           | 2. amb.           | 20,1        | 1,5             |
| 178          | 611104        | 2. amb.           | 2. amb.           | 16,7        | 1,33            |
| 198          | 496105        | 2. amb.           | 2. amb.           | 16,1        | 1,44            |
| 200          | 735131        | 2. amb.           | 2. amb.           | 17          | 1,44            |
| 201          | 605924        | 2. amb.           | 2. amb.           | 15,7        | 1,52            |
| 203          | 495711        | 2. amb.           | 2. amb.           | 23,7        | 1,58            |
| 223          | 755621        | 2. amb.           | 2. amb.           | 15,1        | 1,64            |
| 233          | 616130        | 2. amb.           | 2. amb.           | 14,1        | 1,5             |
| 237          | 460121        | 2. amb.           | 2. amb.           | 18,6        | 1,66            |
| 244          | 650521        | 2. amb.           | 2. amb.           | 11,2        | 1,56            |
| 255          | 730603        | 2. amb.           | 2. amb.           | 11          | 1,42            |
| 275          | 540730        | 2. amb.           | 2. amb.           | 33,4        | 1,51            |
| 276          | 785728        | 2. amb.           | 2. amb.           | 11,4        | 1,14            |
| 277          | 465725        | 2. amb.           | 2. amb.           | 14,7        | 1,44            |
| 291          | 560927        | 2. amb.           | 2. amb.           | 33,8        | 1,55            |
| 313          | 871008        | 2. amb.           | 2. amb.           | 21          | 1,49            |
| 314          | 741217        | 2. amb.           | 2. amb.           | 14,4        | 1,81            |
| 318          | 456008        | 2. amb.           | 2. amb.           | 67,41       | 1,47            |
| 327          | 515512        | 2. amb.           | 2. amb.           | 18,3        | 1,58            |
| 328          | 581231        | 2. amb.           | 2. amb.           | 41          | 1,6             |
| 4            | 325308        | 2. den po         | 1. - 4. den po    | 13,1        | 1,56            |
| 209          | 401109        | 2. den po         | 1. - 4. den po    | 17,7        | 1,48            |
| 222          | 616130        | 2. den po         | 1. - 4. den po    | 20,1        | 1,39            |
| 388          | 565717        | 2. den po         | 1. - 4. den po    | 19,4        | 1,41            |
| 517          | 575126        | 2. den po         | 1. - 4. den po    | 16,5        | 1,37            |
| 572          | 750204        | 2. den po         | 1. - 4. den po    | 21,3        | 1,48            |
| 12           | 886013        | 2. amb.           | 2. amb.           | 20,9        | 1,55            |
| 342          | 580417        | 2. amb.           | 2. amb.           | 28          | 1,46            |
| 346          | 720509        | 2. amb.           | 2. amb.           | 10,6        | 1,29            |
| 348          | 780803        | 2. amb.           | 2. amb.           | 14,9        | 1,44            |
| 350          | 476204        | 2. amb.           | 2. amb.           | 31,9        | 1,39            |
| 380          | 575215        | 2. amb.           | 2. amb.           | 13,5        | 1,43            |
| 384          | 435819        | 2. amb.           | 2. amb.           | 25,8        | 1,42            |
| 400          | 565717        | 2. amb.           | 2. amb.           | 70,33       | 1,42            |
| 428          | 571005        | 2. amb.           | 2. amb.           | 6           | 1,27            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 439          | 641103        | 2. amb.           | 2. amb.           | 4,89        | 1,56            |
| 448          | 515630        | 2. amb.           | 2. amb.           | 21,1        | 1,39            |
| 472          | 935373        | 2. amb.           | 2. amb.           | 12,8        | 1,35            |
| 489          | 526008        | 2. amb.           | 2. amb.           | 16,3        | 1,32            |
| 491          | 706214        | 2. amb.           | 2. amb.           | 14,2        | 1,34            |
| 499          | 625409        | 2. amb.           | 2. amb.           | 32,9        | 1,26            |
| 512          | 430613        | 2. amb.           | 2. amb.           | 11,2        | 1,38            |
| 518          | 455525        | 2. amb.           | 2. amb.           | 13,2        | 1,42            |
| 527          | 575126        | 2. amb.           | 2. amb.           | 16,9        | 1,39            |
| 548          | 720706        | 2. amb.           | 2. amb.           | 25,61       | 1,45            |
| 550          | 470913        | 2. amb.           | 2. amb.           | 63,24       | 1,42            |
| 552          | 585507        | 2. amb.           | 2. amb.           | 21,5        | 1,47            |
| 571          | 630601        | 2. amb.           | 2. amb.           | 44,9        | 1,47            |
| 579          | 750204        | 2. amb.           | 2. amb.           | 40,4        | 1,63            |
| 594          | 515906        | 2. amb.           | 2. amb.           | 21,1        | 1,25            |
| 599          | 460507        | 2. amb.           | 2. amb.           | 10,3        | 1,4             |
| 621          | 610407        | 2. amb.           | 2. amb.           | 9           | 1,77            |
| 622          | 740110        | 2. amb.           | 2. amb.           | 7,7         | 1,82            |
| 623          | 586213        | 2. amb.           | 2. amb.           | 34,7        | 1,76            |
| 624          | 420503        | 2. amb.           | 2. amb.           | 15,9        | 1,49            |
| 642          | 760722        | 2. amb.           | 2. amb.           | 21,4        | 1,59            |
| 644          | 450608        | 2. amb.           | 2. amb.           | 25,3        | 1,56            |
| 663          | 555211        | 2. amb.           | 2. amb.           | 17          | 1,42            |
| 669          | 710531        | 2. amb.           | 2. amb.           | 11,8        | 1,4             |
| 677          | 550325        | 2. amb.           | 2. amb.           | 20,1        | 0,79            |
| 685          | 756128        | 2. amb.           | 2. amb.           | 14,3        | 1,45            |
| 688          | 480228        | 2. amb.           | 2. amb.           | 9           | 1,63            |
| 704          | 555809        | 2. amb.           | 2. amb.           | 31          | 1,33            |
| 725          | 555408        | 2. amb.           | 2. amb.           | 16,3        | 1,58            |
| 731          | 790407        | 2. amb.           | 2. amb.           | 36,9        | 1,5             |
| 17           | 325308        | 3. amb.           | 3. amb.           | 21,2        | 1,49            |
| 18           | 886013        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18,7        | 1,32            |
| 26           | 415104        | 3. amb.           | 3. amb.           | 24          | 1,55            |
| 45           | 876030        | 3. amb.           | 3. amb.           | 17,7        | 1,33            |
| 52           | 481005        | 3. amb.           | 3. amb.           | 23,1        | 1,54            |
| 74           | 700919        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18          | 1,59            |
| 75           | 505329        | 3. amb.           | 3. amb.           | 37          | 1,67            |
| 90           | 445123        | 3. amb.           | 3. amb.           | 15,5        | 1,51            |
| 101          | 820811        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18,3        | 1,56            |
| 104          | 480404        | 3. amb.           | 3. amb.           | 54,1        | 1,65            |
| 107          | 461120        | 3. amb.           | 3. amb.           | 31,6        | 1,66            |
| 120          | 700506        | 3. amb.           | 3. amb.           | 19,3        | 1,56            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 154          | 506120        | 3. amb.           | 3. amb.           | 22,6        | 1,6             |
| 169          | 545531        | 3. amb.           | 3. amb.           | 23,69       | 1,46            |
| 170          | 420315        | 3. amb.           | 3. amb.           | 71,95       | 1,66            |
| 175          | 686020        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18,9        | 1,35            |
| 177          | 520424        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18,7        | 1,47            |
| 202          | 735131        | 3. amb.           | 3. amb.           | 13,1        | 1,5             |
| 210          | 385309        | 3. amb.           | 3. amb.           | 15,7        | 1,51            |
| 224          | 471104        | 3. amb.           | 3. amb.           | 11,8        | 1,54            |
| 230          | 755621        | 3. amb.           | 3. amb.           | 23,1        | 1,45            |
| 245          | 825811        | 3. amb.           | 3. amb.           | 26,18       | 1,44            |
| 247          | 650521        | 3. amb.           | 3. amb.           | 17,04       | 1,46            |
| 282          | 465725        | 3. amb.           | 3. amb.           | 14,4        | 1,35            |
| 283          | 785728        | 3. amb.           | 3. amb.           | 11          | 1,4             |
| 284          | 540730        | 3. amb.           | 3. amb.           | 8,4         | 1,87            |
| 286          | 460121        | 3. amb.           | 3. amb.           | 11,6        | 2,02            |
| 302          | 560927        | 3. amb.           | 3. amb.           | 31,7        | 1,22            |
| 329          | 741217        | 3. amb.           | 3. amb.           | 17,1        | 1,5             |
| 331          | 495711        | 3. amb.           | 3. amb.           | 20,5        | 1,41            |
| 8            | 886013        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 31,3        | 1,65            |
| 24           | 876030        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 33,7        | 1,58            |
| 37           | 340103        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19,5        | 1,4             |
| 38           | 481004        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 17,6        | 1,5             |
| 42           | 350428        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19,6        | 1,34            |
| 57           | 505329        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 10,9        | 1,44            |
| 72           | 445123        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 17,2        | 1,56            |
| 73           | 615630        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 17,1        | 1,73            |
| 85           | 820811        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 21,9        | 1,37            |
| 86           | 480404        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19,5        | 1,37            |
| 99           | 461120        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 34,6        | 1,63            |
| 100          | 471104        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 24,3        | 1,46            |
| 112          | 700506        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 13,8        | 1,42            |
| 128          | 825811        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 14,4        | 1,63            |
| 130          | 750526        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 31,7        | 1,62            |
| 131          | 385309        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 23,8        | 1,6             |
| 152          | 680930        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 12,4        | 1,6             |
| 168          | 520424        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19,44       | 1,42            |
| 183          | 496105        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 12,4        | 1,74            |
| 191          | 605924        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 14,4        | 1,58            |
| 192          | 735131        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 16,3        | 1,46            |
| 234          | 460121        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19,3        | 1,54            |
| 235          | 650521        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 12,9        | 1,62            |
| 243          | 620310        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 13,4        | 1,47            |

Zdroj: Vlastní



| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 251          | 730603        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 16,45       | 1,36            |
| 267          | 465725        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 12,2        | 1,69            |
| 268          | 540730        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 20          | 1,69            |
| 269          | 785728        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19          | 1,67            |
| 281          | 560927        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 15          | 1,49            |
| 290          | 871008        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 35,8        | 1,53            |
| 299          | 741217        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 15,7        | 1,52            |
| 311          | 581231        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 23,2        | 1,58            |
| 312          | 515512        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19,3        | 1,58            |
| 325          | 476204        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 20,92       | 1,47            |
| 326          | 580417        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 26,2        | 1,39            |
| 340          | 515512        | 3. amb.           | 3. amb.           | 34,3        | 1,3             |
| 349          | 871008        | 3. amb.           | 3. amb.           | 20,3        | 1,49            |
| 351          | 580417        | 3. amb.           | 3. amb.           | 14,5        | 1,35            |
| 354          | 720509        | 3. amb.           | 3. amb.           | 30,7        | 1,39            |
| 355          | 476204        | 3. amb.           | 3. amb.           | 17,6        | 1,41            |
| 356          | 780803        | 3. amb.           | 3. amb.           | 30,5        | 1,44            |
| 357          | 456008        | 3. amb.           | 3. amb.           | 15,5        | 1,46            |
| 383          | 575215        | 3. amb.           | 3. amb.           | 21,8        | 1,36            |
| 389          | 435819        | 3. amb.           | 3. amb.           | 11,1        | 1,4             |
| 403          | 565717        | 3. amb.           | 3. amb.           | 10,13       | 1,39            |
| 429          | 571005        | 3. amb.           | 3. amb.           | 17,7        | 1,15            |
| 445          | 641103        | 3. amb.           | 3. amb.           | 19,7        | 2,55            |
| 457          | 515630        | 3. amb.           | 3. amb.           | 22,1        | 1,43            |
| 475          | 935373        | 3. amb.           | 3. amb.           | 15,5        | 1,35            |
| 494          | 526008        | 3. amb.           | 3. amb.           | 13,6        | 1,22            |
| 500          | 706214        | 3. amb.           | 3. amb.           | 17,7        | 1,3             |
| 507          | 625409        | 3. amb.           | 3. amb.           | 20,9        | 1,32            |
| 525          | 455525        | 3. amb.           | 3. amb.           | 17          | 1,36            |
| 526          | 430613        | 3. amb.           | 3. amb.           | 39,2        | 1,32            |
| 549          | 720706        | 3. amb.           | 3. amb.           | 19,32       | 1,47            |
| 560          | 585507        | 3. amb.           | 3. amb.           | 37,8        | 1,5             |
| 561          | 470913        | 3. amb.           | 3. amb.           | 23,1        | 1,63            |
| 592          | 750204        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18,7        | 1,6             |
| 593          | 630601        | 3. amb.           | 3. amb.           | 9           | 1,59            |
| 600          | 515906        | 3. amb.           | 3. amb.           | 11,6        | 1,36            |
| 620          | 460507        | 3. amb.           | 3. amb.           | 10,4        | 1,67            |
| 629          | 610407        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18,1        | 1,63            |
| 630          | 420503        | 3. amb.           | 3. amb.           | 18,7        | 1,61            |
| 632          | 586213        | 3. amb.           | 3. amb.           | 23,1        | 1,62            |
| 636          | 740110        | 3. amb.           | 3. amb.           | 14,6        | 1,59            |
| 648          | 450608        | 3. amb.           | 3. amb.           | 14,6        | 1,46            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 649          | 760722        | 3. amb.           | 3. amb.           | 15,5        | 1,5             |
| 673          | 555211        | 3. amb.           | 3. amb.           | 16,2        | 1,34            |
| 682          | 550325        | 3. amb.           | 3. amb.           | 12,7        | 1,33            |
| 690          | 756128        | 3. amb.           | 3. amb.           | 11,5        | 1,53            |
| 692          | 480228        | 3. amb.           | 3. amb.           | 9,3         | 1,62            |
| 693          | 710531        | 3. amb.           | 3. amb.           | 9,2         | 1,3             |
| 16           | 415104        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 33,1        | 1,51            |
| 62           | 700919        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 11,6        | 1,49            |
| 217          | 845709        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 12,8        | 1,49            |
| 338          | 780803        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 30          | 1,43            |
| 339          | 720509        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 31,8        | 1,38            |
| 366          | 465720        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 21,7        | 1,46            |
| 374          | 575215        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 17,31       | 1,54            |
| 379          | 435819        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 26,1        | 1,34            |
| 399          | 595211        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 28,48       | 1,21            |
| 414          | 700919        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 24,9        | 0,74            |
| 418          | 571005        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 29,1        | 1,6             |
| 424          | 821202        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 5,3         | 1,49            |
| 434          | 641103        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 18,26       | 1,41            |
| 443          | 515630        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 17,7        | 1,44            |
| 455          | 715713        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 25,8        | 1,42            |
| 456          | 530717        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 21,1        | 1,54            |
| 483          | 706214        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 25,9        | 1,27            |
| 487          | 625409        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 11,4        | 1,18            |
| 498          | 430613        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 28          | 1,17            |
| 509          | 455525        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 29,2        | 1,39            |
| 510          | 485523        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 22,9        | 1,47            |
| 523          | 451006        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 11,4        | 1,43            |
| 534          | 720706        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 40,73       | 1,37            |
| 535          | 470913        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 22,41       | 1,36            |
| 540          | 520615        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 20          | 1,44            |
| 547          | 585507        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 32,71       | 1,46            |
| 559          | 630601        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 19,9        | 1,62            |
| 578          | 640507        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 32,3        | 1,56            |
| 587          | 460507        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 41,5        | 1,51            |
| 588          | 515906        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 20,5        | 1,6             |
| 598          | 610407        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 12,8        | 1,51            |
| 611          | 740110        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 14,9        | 1,35            |
| 612          | 586213        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 23          | 1,4             |
| 616          | 420503        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 11,1        | 1,41            |
| 628          | 760722        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 14,7        | 1,6             |
| 641          | 450608        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 29,9        | 1,65            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 655          | 555211        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 27,8        | 1,38            |
| 660          | 710531        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 24,7        | 1,39            |
| 668          | 550325        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 14,4        | 1,39            |
| 675          | 756128        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 12,3        | 0,89            |
| 684          | 480228        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 14,5        | 1,53            |
| 698          | 555809        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 8,5         | 1,67            |
| 709          | 545124        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 15,5        | 1,43            |
| 713          | 556001        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 11          | 2,05            |
| 717          | 790407        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 32,5        | 1,87            |
| 721          | 555408        | 3. den po         | 1. - 4. den po    | 14,3        | 1,55            |
| 27           | 886013        | 4. amb.           | 4. amb.           | 42,5        | 1,42            |
| 76           | 700919        | 4. amb.           | 4. amb.           | 14,4        | 1,72            |
| 118          | 415104        | 4. amb.           | 4. amb.           | 28,1        | 1,44            |
| 136          | 481004        | 4. amb.           | 4. amb.           | 11,2        | 1,64            |
| 138          | 325308        | 4. amb.           | 4. amb.           | 25,4        | 1,61            |
| 176          | 545531        | 4. amb.           | 4. amb.           | 17,2        | 1,4             |
| 205          | 506120        | 4. amb.           | 4. amb.           | 19,3        | 1,54            |
| 246          | 461120        | 4. amb.           | 4. amb.           | 17,82       | 1,47            |
| 252          | 420315        | 4. amb.           | 4. amb.           | 23,27       | 1,35            |
| 254          | 480404        | 4. amb.           | 4. amb.           | 14,26       | 1,45            |
| 266          | 520424        | 4. amb.           | 4. amb.           | 10,9        | 1,77            |
| 270          | 686020        | 4. amb.           | 4. amb.           | 15,5        | 1,74            |
| 300          | 735131        | 4. amb.           | 4. amb.           | 18,9        | 1,35            |
| 315          | 465725        | 4. amb.           | 4. amb.           | 17,3        | 1,51            |
| 370          | 825811        | 4. amb.           | 4. amb.           | 45,53       | 1,43            |
| 347          | 741217        | 4. amb.           | 4. amb.           | 13,5        | 1,4             |
| 359          | 720509        | 4. amb.           | 4. amb.           | 19,5        | 1,73            |
| 360          | 616130        | 4. amb.           | 4. amb.           | 16,9        | 1,42            |
| 364          | 460121        | 4. amb.           | 4. amb.           | 20,1        | 1,41            |
| 368          | 650521        | 4. amb.           | 4. amb.           | 22,82       | 1,44            |
| 392          | 581231        | 4. amb.           | 4. amb.           | 11,1        | 1,3             |
| 393          | 515512        | 4. amb.           | 4. amb.           | 44,5        | 1,5             |
| 394          | 495711        | 4. amb.           | 4. amb.           | 25,7        | 1,33            |
| 397          | 456008        | 4. amb.           | 4. amb.           | 17,9        | 1,4             |
| 402          | 560927        | 4. amb.           | 4. amb.           | 24,05       | 1,42            |
| 405          | 780803        | 4. amb.           | 4. amb.           | 21,52       | 1,44            |
| 406          | 476204        | 4. amb.           | 4. amb.           | 14,03       | 1,43            |
| 407          | 580417        | 4. amb.           | 4. amb.           | 22,61       | 1,61            |
| 409          | 616130        | 4. amb.           | 4. amb.           | 32,7        | 1,39            |
| 430          | 435819        | 4. amb.           | 4. amb.           | 18,65       | 1,2             |
| 438          | 871008        | 4. amb.           | 4. amb.           | 33,56       | 1,44            |
| 464          | 540730        | 4. amb.           | 4. amb.           | 20,1        | 1,29            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 466          | 785728        | 4. amb.           | 4. amb.           | 23,7        | 1,36            |
| 467          | 571005        | 4. amb.           | 4. amb.           | 45          | 1,33            |
| 479          | 641103        | 4. amb.           | 4. amb.           | 18          | 1,26            |
| 490          | 515630        | 4. amb.           | 4. amb.           | 19,8        | 1,45            |
| 511          | 565717        | 4. amb.           | 4. amb.           | 15,6        | 1,38            |
| 536          | 935373        | 4. amb.           | 4. amb.           | 57,35       | 2,11            |
| 562          | 526008        | 4. amb.           | 4. amb.           | 23          | 1,46            |
| 564          | 706214        | 4. amb.           | 4. amb.           | 16,3        | 1,43            |
| 589          | 455525        | 4. amb.           | 4. amb.           | 53,3        | 1,46            |
| 602          | 430613        | 4. amb.           | 4. amb.           | 31,3        | 1,45            |
| 606          | 630601        | 4. amb.           | 4. amb.           | 27          | 1,42            |
| 650          | 470913        | 4. amb.           | 4. amb.           | 17,9        | 1,5             |
| 661          | 585507        | 4. amb.           | 4. amb.           | 19,7        | 1,64            |
| 687          | 750204        | 4. amb.           | 4. amb.           | 10,4        | 1,59            |
| 694          | 515906        | 4. amb.           | 4. amb.           | 6,9         | 1,45            |
| 700          | 420503        | 4. amb.           | 4. amb.           | 11,9        | 1,29            |
| 701          | 586213        | 4. amb.           | 4. amb.           | 20,3        | 1,35            |
| 702          | 450608        | 4. amb.           | 4. amb.           | 9,2         | 1,66            |
| 703          | 760722        | 4. amb.           | 4. amb.           | 44,2        | 1,36            |
| 724          | 480228        | 4. amb.           | 4. amb.           | 17,2        | 1,49            |
| 726          | 756128        | 4. amb.           | 4. amb.           | 19,4        | 1,63            |
| 727          | 720706        | 4. amb.           | 4. amb.           | 31,1        | 1,63            |
| 728          | 460507        | 4. amb.           | 4. amb.           | 16,7        | 1,58            |
| 729          | 710531        | 4. amb.           | 4. amb.           | 17,7        | 1,47            |
| 25           | 876030        | 4.den po          | 1. - 4. den po    | 21,4        | 1,56            |
| 182          | 545531        | 5. amb.           | 5. amb.           | 14,5        | 1,24            |
| 204          | 700919        | 5. amb.           | 5. amb.           | 15,4        | 1,49            |
| 367          | 506120        | 5. amb.           | 5. amb.           | 27          | 1,37            |
| 382          | 735131        | 5. amb.           | 5. amb.           | 17,3        | 1,29            |
| 391          | 741217        | 5. amb.           | 5. amb.           | 9,2         | 1,43            |
| 401          | 686020        | 5. amb.           | 5. amb.           | 27,36       | 1,34            |
| 404          | 465725        | 5. amb.           | 5. amb.           | 24,49       | 1,41            |
| 408          | 560927        | 5. amb.           | 5. amb.           | 20,33       | 1,45            |
| 410          | 650521        | 5. amb.           | 5. amb.           | 21,1        | 1,37            |
| 446          | 581231        | 5. amb.           | 5. amb.           | 28          | 1,53            |
| 447          | 456008        | 5. amb.           | 5. amb.           | 19,3        | 1,53            |
| 458          | 515512        | 5. amb.           | 5. amb.           | 24,7        | 1,37            |
| 459          | 476204        | 5. amb.           | 5. amb.           | 21,6        | 1,4             |
| 460          | 780803        | 5. amb.           | 5. amb.           | 18,8        | 1,37            |
| 461          | 580417        | 5. amb.           | 5. amb.           | 20,3        | 1,32            |
| 462          | 460121        | 5. amb.           | 5. amb.           | 21,7        | 1,28            |
| 465          | 720509        | 5. amb.           | 5. amb.           | 23          | 1,36            |

Zdroj: Vlastní

| Číslo vzorku | Identifikátor | Časový bod odběru | Časové podskupiny | RNA (ng/μl) | Čistota 260/280 |
|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|
| 478          | 871008        | 5. amb.           | 5. amb.           | 26,5        | 1,39            |
| 543          | 571005        | 5. amb.           | 5. amb.           | 47,02       | 1,45            |
| 569          | 641103        | 5. amb.           | 5. amb.           | 24,4        | 1,51            |
| 580          | 515630        | 5. amb.           | 5. amb.           | 15,2        | 1,48            |
| 662          | 935373        | 5. amb.           | 5. amb.           | 22,9        | 1,55            |
| 678          | 526008        | 5. amb.           | 5. amb.           | 11,8        | 0,65            |
| 683          | 706214        | 5. amb.           | 5. amb.           | 9,6         | 1,42            |
| 689          | 470913        | 5. amb.           | 5. amb.           | 17,6        | 1,53            |
| 691          | 430613        | 5. amb.           | 5. amb.           | 10,5        | 1,53            |
| 730          | 750204        | 5. amb.           | 5. amb.           | 15,2        | 1,49            |
| 732          | 585507        | 5. amb.           | 5. amb.           | 12,9        | 1,53            |
| 193          | 545531        | 6. amb.           | 6. amb.           | 16,2        | 1,48            |
| 463          | 741217        | 6. amb.           | 6. amb.           | 21,5        | 1,35            |
| 708          | 470913        | 6. amb.           | 6. amb.           | 13,2        | 0,84            |
| 259          | 545531        | 7. amb.           | 7. amb.           | 11,6        | 1,4             |
| 369          | 545531        | 7. amb.           | 7. amb.           | 43,63       | 1,38            |
| 14           | 415104        | po operaci        | po operaci        | 21,1        | 1,43            |
| 22           | 876030        | po operaci        | po operaci        | 38,8        | 1,52            |
| 30           | 755421        | po operaci        | po operaci        | 16,3        | 1,59            |
| 32           | 340103        | po operaci        | po operaci        | 27,5        | 1,42            |
| 35           | 481004        | po operaci        | po operaci        | 23          | 1,42            |
| 40           | 350428        | po operaci        | po operaci        | 32          | 1,34            |
| 49           | 480521        | po operaci        | po operaci        | 23,6        | 1,42            |
| 55           | 505329        | po operaci        | po operaci        | 21,5        | 1,5             |
| 60           | 700919        | po operaci        | po operaci        | 50,5        | 1,46            |
| 68           | 445123        | po operaci        | po operaci        | 17,4        | 1,51            |
| 69           | 615630        | po operaci        | po operaci        | 39,1        | 1,5             |
| 81           | 820811        | po operaci        | po operaci        | 52,3        | 1,55            |
| 82           | 480404        | po operaci        | po operaci        | 19,4        | 1,6             |
| 95           | 461120        | po operaci        | po operaci        | 18,9        | 1,68            |
| 96           | 471104        | po operaci        | po operaci        | 50,4        | 1,53            |
| 109          | 700506        | po operaci        | po operaci        | 40,5        | 1,43            |
| 115          | 506120        | po operaci        | po operaci        | 18,2        | 1,41            |
| 122          | 825811        | po operaci        | po operaci        | 13,9        | 1,44            |
| 124          | 750526        | po operaci        | po operaci        | 17,5        | 1,58            |
| 127          | 385309        | po operaci        | po operaci        | 19,5        | 1,47            |
| 140          | 565721        | po operaci        | po operaci        | 59,7        | 1,51            |
| 142          | 545531        | po operaci        | po operaci        | 26,9        | 1,63            |
| 147          | 680930        | po operaci        | po operaci        | 16,8        | 0,63            |
| 151          | 420315        | po operaci        | po operaci        | 11,4        | 1,44            |
| 158          | 686020        | po operaci        | po operaci        | 20,3        | 1,47            |
| 164          | 520424        | po operaci        | po operaci        | 24,75       | 1,62            |

Zdroj: Vlastní

| <b>Číslo vzorku</b> | <b>Identifikátor</b> | <b>Časový bod odběru</b> | <b>Časové podskupiny</b> | <b>RNA (ng/μl)</b> | <b>Čistota 260/280</b> |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 180                 | 496105               | po operaci               | po operaci               | 13,5               | 1,41                   |
| 186                 | 605924               | po operaci               | po operaci               | 13,5               | 1,93                   |
| 188                 | 735131               | po operaci               | po operaci               | 12,1               | 1,69                   |
| 207                 | 401109               | po operaci               | po operaci               | 21,2               | 1,42                   |
| 212                 | 755621               | po operaci               | po operaci               | 24,4               | 1,48                   |
| 214                 | 845709               | po operaci               | po operaci               | 15,3               | 1,45                   |
| 219                 | 616130               | po operaci               | po operaci               | 15,4               | 1,41                   |
| 228                 | 460121               | po operaci               | po operaci               | 18,2               | 1,56                   |
| 229                 | 650521               | po operaci               | po operaci               | 12,8               | 1,44                   |
| 241                 | 620310               | po operaci               | po operaci               | 9,7                | 1,48                   |
| 249                 | 730603               | po operaci               | po operaci               | 25,1               | 1,36                   |
| 257                 | 465725               | po operaci               | po operaci               | 14,8               | 1,25                   |
| 262                 | 540730               | po operaci               | po operaci               | 19,8               | 1,33                   |
| 263                 | 785728               | po operaci               | po operaci               | 15,7               | 1,75                   |
| 279                 | 560927               | po operaci               | po operaci               | 11,9               | 1,35                   |
| 288                 | 871008               | po operaci               | po operaci               | 10,3               | 1,64                   |
| 294                 | 456008               | po operaci               | po operaci               | 23,4               | 1,48                   |
| 295                 | 741217               | po operaci               | po operaci               | 12,7               | 1,54                   |
| 306                 | 515512               | po operaci               | po operaci               | 65,7               | 1,38                   |
| 320                 | 476204               | po operaci               | po operaci               | 18,92              | 1,45                   |
| 322                 | 580417               | po operaci               | po operaci               | 16,18              | 1,54                   |
| 333                 | 780803               | po operaci               | po operaci               | 22,5               | 1,51                   |
| 335                 | 720509               | po operaci               | po operaci               | 15,6               | 1,5                    |
| 363                 | 465720               | po operaci               | po operaci               | 25,6               | 1,48                   |
| 372                 | 575215               | po operaci               | po operaci               | 15,15              | 1,59                   |
| 376                 | 435819               | po operaci               | po operaci               | 23,06              | 1,38                   |
| 396                 | 595211               | po operaci               | po operaci               | 12,7               | 1,41                   |
| 412                 | 700919               | po operaci               | po operaci               | 13,6               | 1,32                   |
| 416                 | 571005               | po operaci               | po operaci               | 29,4               | 1,6                    |
| 421                 | 821202               | po operaci               | po operaci               | 6,9                | 1,52                   |
| 426                 | 881161               | po operaci               | po operaci               | 24,4               | 1,51                   |
| 432                 | 641103               | po operaci               | po operaci               | 13,78              | 1,06                   |
| 441                 | 515630               | po operaci               | po operaci               | 15                 | 1,62                   |
| 450                 | 715713               | po operaci               | po operaci               | 20,5               | 1,44                   |
| 453                 | 530717               | po operaci               | po operaci               | 50,3               | 1,49                   |
| 469                 | 935373               | po operaci               | po operaci               | 31,4               | 1,4                    |
| 474                 | 526008               | po operaci               | po operaci               | 26,3               | 1,39                   |
| 481                 | 706214               | po operaci               | po operaci               | 14                 | 1,25                   |
| 485                 | 625409               | po operaci               | po operaci               | 15                 | 1,27                   |
| 496                 | 430613               | po operaci               | po operaci               | 30,9               | 1,42                   |
| 503                 | 455525               | po operaci               | po operaci               | 15,1               | 1,31                   |
| 506                 | 485523               | po operaci               | po operaci               | 24,2               | 1,26                   |

Zdroj: Vlastní

| <b>Číslo vzorku</b> | <b>Identifikátor</b> | <b>Časový bod odběru</b> | <b>Časové podskupiny</b> | <b>RNA (ng/μl)</b> | <b>Čistota 260/280</b> |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 515                 | 575126               | po operaci               | po operaci               | 21,5               | 1,44                   |
| 521                 | 451006               | po operaci               | po operaci               | 26,3               | 1,41                   |
| 529                 | 720706               | po operaci               | po operaci               | 39,6               | 1,34                   |
| 531                 | 470913               | po operaci               | po operaci               | 16,2               | 1,42                   |
| 538                 | 520615               | po operaci               | po operaci               | 19,82              | 1,39                   |
| 545                 | 585507               | po operaci               | po operaci               | 12,64              | 1,52                   |
| 554                 | 915404               | po operaci               | po operaci               | 31                 | 1,47                   |
| 556                 | 630601               | po operaci               | po operaci               | 36                 | 1,42                   |
| 566                 | 435119               | po operaci               | po operaci               | 23,1               | 1,48                   |
| 568                 | 750204               | po operaci               | po operaci               | 17,3               | 1,48                   |
| 576                 | 640507               | po operaci               | po operaci               | 31                 | 1,47                   |
| 582                 | 460507               | po operaci               | po operaci               | 33,6               | 1,58                   |
| 596                 | 610407               | po operaci               | po operaci               | 16,8               | 1,45                   |
| 607                 | 586213               | po operaci               | po operaci               | 39,8               | 1,38                   |
| 609                 | 740110               | po operaci               | po operaci               | 22,1               | 1,39                   |
| 614                 | 420503               | po operaci               | po operaci               | 8,5                | 1,23                   |
| 626                 | 760722               | po operaci               | po operaci               | 38,6               | 1,4                    |
| 634                 | 715922               | po operaci               | po operaci               | 22                 | 1,52                   |
| 638                 | 450608               | po operaci               | po operaci               | 29                 | 1,47                   |
| 646                 | 585115               | po operaci               | po operaci               | 25,1               | 1,42                   |
| 653                 | 555211               | po operaci               | po operaci               | 12,6               | 1,44                   |
| 657                 | 710531               | po operaci               | po operaci               | 9,6                | 1,56                   |
| 666                 | 550325               | po operaci               | po operaci               | 6,1                | 1,42                   |
| 671                 | 756128               | po operaci               | po operaci               | 10,7               | 1,4                    |
| 680                 | 480228               | po operaci               | po operaci               | 11,3               | 1,29                   |
| 696                 | 555809               | po operaci               | po operaci               | 6,4                | 1,44                   |
| 706                 | 545124               | po operaci               | po operaci               | 16,2               | 1,3                    |
| 711                 | 556001               | po operaci               | po operaci               | 17,4               | 1,83                   |
| 715                 | 790407               | po operaci               | po operaci               | 11,1               | 2,1                    |
| 719                 | 555408               | po operaci               | po operaci               | 10                 | 1,65                   |
| 2                   | 325308               | po operaci               | po operaci               | 21,2               | 1,6                    |
| 6                   | 886013               | po operaci               | po operaci               | 21,4               | 1,58                   |
| 29                  | 755421               | před operací             | před operací             | 17,8               | 1,55                   |
| 31                  | 340103               | před operací             | před operací             | 17,9               | 1,7                    |
| 34                  | 481004               | před operací             | před operací             | 17,8               | 1,41                   |
| 48                  | 480521               | před operací             | před operací             | 19,9               | 1,34                   |
| 54                  | 505329               | před operací             | před operací             | 25,7               | 1,45                   |
| 59                  | 700919               | před operací             | před operací             | 23,2               | 1,57                   |
| 66                  | 445123               | před operací             | před operací             | 12,7               | 1,49                   |
| 67                  | 615630               | před operací             | před operací             | 11,4               | 1,48                   |
| 79                  | 820811               | před operací             | před operací             | 26,5               | 1,69                   |
| 80                  | 480404               | před operací             | před operací             | 12,9               | 1,61                   |

Zdroj: Vlastní

| <b>Číslo vzorku</b> | <b>Identifikátor</b> | <b>Časový bod odběru</b> | <b>Časové podskupiny</b> | <b>RNA (ng/μl)</b> | <b>Čistota 260/280</b> |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 93                  | 461120               | před operací             | před operací             | 20,6               | 1,52                   |
| 94                  | 471104               | před operací             | před operací             | 17,8               | 1,52                   |
| 114                 | 506120               | před operací             | před operací             | 25,1               | 1,45                   |
| 121                 | 825811               | před operací             | před operací             | 46,4               | 1,56                   |
| 123                 | 750526               | před operací             | před operací             | 11,4               | 1,44                   |
| 139                 | 565721               | před operací             | před operací             | 45,3               | 1,5                    |
| 141                 | 545531               | před operací             | před operací             | 23,1               | 1,52                   |
| 146                 | 385309               | před operací             | před operací             | 13,1               | 1,48                   |
| 150                 | 420315               | před operací             | před operací             | 13,2               | 1,6                    |
| 179                 | 496105               | před operací             | před operací             | 12,5               | 1,37                   |
| 185                 | 605924               | před operací             | před operací             | 12,4               | 1,56                   |
| 187                 | 735131               | před operací             | před operací             | 24,6               | 1,55                   |
| 196                 | 495711               | před operací             | před operací             | 18,3               | 1,46                   |
| 206                 | 401109               | před operací             | před operací             | 21,3               | 1,41                   |
| 226                 | 460121               | před operací             | před operací             | 22,4               | 1,45                   |
| 227                 | 650521               | před operací             | před operací             | 16,8               | 1,5                    |
| 240                 | 620310               | před operací             | před operací             | 13,4               | 1,49                   |
| 248                 | 730603               | před operací             | před operací             | 17,37              | 1,48                   |
| 256                 | 465725               | před operací             | před operací             | 16                 | 1,45                   |
| 260                 | 540730               | před operací             | před operací             | 15,1               | 1,34                   |
| 261                 | 785728               | před operací             | před operací             | 16,6               | 1,44                   |
| 278                 | 560927               | před operací             | před operací             | 10                 | 1,34                   |
| 287                 | 871008               | před operací             | před operací             | 22,6               | 1,57                   |
| 292                 | 456008               | před operací             | před operací             | 18,9               | 1,45                   |
| 293                 | 741217               | před operací             | před operací             | 14,2               | 1,49                   |
| 303                 | 581231               | před operací             | před operací             | 32,9               | 1,37                   |
| 305                 | 515512               | před operací             | před operací             | 33,6               | 1,42                   |
| 319                 | 476204               | před operací             | před operací             | 18,14              | 1,61                   |
| 321                 | 580417               | před operací             | před operací             | 23,9               | 1,6                    |
| 332                 | 780803               | před operací             | před operací             | 12,1               | 2,37                   |
| 334                 | 720509               | před operací             | před operací             | 42,3               | 1,09                   |
| 352                 | 881023               | před operací             | před operací             | 33,2               | 1,46                   |
| 362                 | 465720               | před operací             | před operací             | 12,5               | 1,48                   |
| 371                 | 575215               | před operací             | před operací             | 14,41              | 1,46                   |
| 375                 | 435819               | před operací             | před operací             | 18,48              | 1,36                   |
| 385                 | 565717               | před operací             | před operací             | 40,8               | 1,35                   |
| 395                 | 595211               | před operací             | před operací             | 9,9                | 1,35                   |
| 411                 | 700919               | před operací             | před operací             | 14,8               | 1,43                   |
| 415                 | 571005               | před operací             | před operací             | 23                 | 1,6                    |
| 420                 | 821202               | před operací             | před operací             | 10,9               | 1,41                   |
| 425                 | 881161               | před operací             | před operací             | 13,2               | 1,45                   |
| 431                 | 641103               | před operací             | před operací             | 21,61              | 1,4                    |

Zdroj: Vlastní



| <b>Číslo vzorku</b> | <b>Identifikátor</b> | <b>Časový bod odběru</b> | <b>Časové podskupiny</b> | <b>RNA (ng/μl)</b> | <b>Čistota 260/280</b> |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 440                 | 515630               | před operací             | před operací             | 24,44              | 1,65                   |
| 449                 | 715713               | před operací             | před operací             | 20,8               | 1,48                   |
| 452                 | 530717               | před operací             | před operací             | 29,4               | 1,43                   |
| 468                 | 935373               | před operací             | před operací             | 22,5               | 1,29                   |
| 480                 | 706214               | před operací             | před operací             | 13                 | 1,37                   |
| 484                 | 625409               | před operací             | před operací             | 19,9               | 1,29                   |
| 495                 | 430613               | před operací             | před operací             | 25,6               | 1,18                   |
| 502                 | 455525               | před operací             | před operací             | 25,7               | 1,29                   |
| 504                 | 485523               | před operací             | před operací             | 12                 | 1,22                   |
| 514                 | 575126               | před operací             | před operací             | 23,7               | 1,55                   |
| 520                 | 451006               | před operací             | před operací             | 11,1               | 1,34                   |
| 528                 | 720706               | před operací             | před operací             | 13,2               | 1,39                   |
| 530                 | 470913               | před operací             | před operací             | 25                 | 1,37                   |
| 537                 | 520615               | před operací             | před operací             | 43,14              | 1,34                   |
| 544                 | 585507               | před operací             | před operací             | 23,14              | 1,44                   |
| 553                 | 915404               | před operací             | před operací             | 13,5               | 1,35                   |
| 555                 | 630601               | před operací             | před operací             | 23                 | 1,46                   |
| 565                 | 435119               | před operací             | před operací             | 17,3               | 1,41                   |
| 567                 | 750204               | před operací             | před operací             | 34,4               | 1,39                   |
| 575                 | 640507               | před operací             | před operací             | 17                 | 1,4                    |
| 581                 | 460507               | před operací             | před operací             | 27,9               | 1,72                   |
| 583                 | 515906               | před operací             | před operací             | 17,4               | 1,79                   |
| 595                 | 610407               | před operací             | před operací             | 22,2               | 1,41                   |
| 604                 | 740110               | před operací             | před operací             | 29                 | 1,43                   |
| 605                 | 586213               | před operací             | před operací             | 32                 | 1,45                   |
| 613                 | 420503               | před operací             | před operací             | 12,1               | 1,43                   |
| 625                 | 760722               | před operací             | před operací             | 16,8               | 1,76                   |
| 633                 | 715922               | před operací             | před operací             | 29,3               | 1,5                    |
| 637                 | 450608               | před operací             | před operací             | 18,6               | 1,66                   |
| 645                 | 585115               | před operací             | před operací             | 15,5               | 1,51                   |
| 652                 | 555211               | před operací             | před operací             | 38,4               | 1,44                   |
| 656                 | 710531               | před operací             | před operací             | 17,4               | 1,46                   |
| 665                 | 550325               | před operací             | před operací             | 6,7                | 1,5                    |
| 670                 | 756128               | před operací             | před operací             | 6,5                | 1,36                   |
| 679                 | 480228               | před operací             | před operací             | 19,1               | 1,47                   |
| 695                 | 555809               | před operací             | před operací             | 19,5               | 1,51                   |
| 705                 | 545124               | před operací             | před operací             | 14,1               | 0,81                   |
| 710                 | 556001               | před operací             | před operací             | 15,7               | 1,82                   |
| 714                 | 790407               | před operací             | před operací             | 12,3               | 1,69                   |
| 718                 | 555408               | před operací             | před operací             | 11,1               | 1,48                   |
| 13                  | 415104               | před operací             | před operací             | 39,2               | 1,52                   |
| 21                  | 876030               | před operací             | před operací             | 22,4               | 1,67                   |

Zdroj: Vlastní

| <b>Číslo vzorku</b> | <b>Identifikátor</b> | <b>Časový bod odběru</b> | <b>Časové podskupiny</b> | <b>RNA (ng/μl)</b> | <b>Čistota 260/280</b> |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------------------------|
| 39                  | 350428               | před operací             | před operací             | 24,4               | 1,43                   |
| 108                 | 700506               | před operací             | před operací             | 33,9               | 1,64                   |
| 157                 | 686020               | před operací             | před operací             | 25,5               | 1,57                   |
| 163                 | 520424               | před operací             | před operací             | 34,66              | 1,63                   |
| 211                 | 755621               | před operací             | před operací             | 24,4               | 1,5                    |
| 213                 | 845709               | před operací             | před operací             | 16                 | 1,55                   |
| 218                 | 616130               | před operací             | před operací             | 11,9               | 1,52                   |
| 1                   | 325308               | před operací             | před operací             | 28,8               | 1,62                   |
| 5                   | 886013               | před operací             | před operací             | 19,2               | 1,52                   |
| 341                 | 581231               |                          |                          | 24,2               | 1,36                   |

*Zdroj: Vlastní*