

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Andrea Fenderlová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Andrea Fenderlová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**VOLNÁ CIRKULUJÍCÍ DNA V LABORATORNÍ
DIAGNOSTICE**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Robin Klieber

PLZEŇ 2024

Zde se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Zde se v tištěné verzi nachází zadání bakalářské práce.

Prohlášení

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

V Plzni dne

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Fenderlová Andrea

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Volná cirkulující DNA v laboratorní diagnostice

Vedoucí práce: Mgr. Robin Klieber

Počet stran – číslované: 42

Počet stran – nečíslované: 33

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 116

Klíčová slova: volná cirkulující DNA, tekutá biopsie, diagnostika, biomarker, lymfoproliferace

Souhrn:

Tato práce se zabývá tématem volné cirkulující DNA (cfDNA) v laboratorní diagnostice tekutých biopsií s důrazem na nádorová onemocnění. Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část této bakalářské práce se zaměřuje na systematický přehled aktuální literatury a výzkumných studií, které se především zabývají koncentrací cfDNA v časné diagnostice, sledování průběhu onemocnění a určování prognózy. V práci je také popsána struktura a funkce DNA, její vznik a uvolňování DNA do cirkulace. V rámci praktické části byly hodnoceny naměřené koncentrace cfDNA, izolované od pacientů s maligními lymfoproliferacemi a kvantifikované dvěma kvantifikačními metodami. Výsledky byly porovnány s klinickými daty pacientů, kteří byli léčeni na Hematologicko-onkologickém oddělení Fakultní nemocnice Plzeň. Byl prokázán vztah koncentrace cfDNA s klinickými parametry, jako je stádium onemocnění a odpověď na léčbu. Nebyla prokázána spojitost koncentrace cfDNA s věkem a pohlavím pacientů.

Abstract

Surname and name: Fenderlová Andrea

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

Title of thesis: Circulating cell-free DNA in laboratory diagnostics

Consultant: Mgr. Robin Klieber

Number of pages – numbered: 42

Number of pages – unnumbered: 33

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 116

Keywords: circulating free DNA, liquid biopsy, diagnostics, biomarker, lymphoproliferation

Summary:

This thesis focuses on circulating free DNA (cfDNA) in the laboratory diagnosis of liquid biopsies with an emphasis on cancer diseases. The work is divided into a theoretical and a practical part. The theoretical part focuses on a systematic overview of current literature and research studies, which mainly deal with the concentration of cfDNA in early diagnosis, monitoring and prognosis of the diseases. The thesis also describes the structure and function of DNA, its formation and DNA release into the circulation. As the practical part, the measured concentrations of cfDNA, isolated from patients with malignant lymphoproliferations, were evaluated using two quantification methods, and the results were compared with the patient's clinical data who were treated at the Haematology-Oncology Department of the University Hospital in Pilsen. The concentration of cfDNA has been shown to correlate with clinical parameters such as disease stage and response to treatment. The relationship of the cfDNA concentration with the patient's age and sex was not observed.

Předmluva

Onkologická onemocnění představují významný celosvětový problém, a proto se v průběhu posledních několika let stala volná cirkulující DNA (cfDNA) předmětem intenzivního výzkumu. Tato pozornost je zejména zdůrazněna v kontextu cfDNA jako potencionálního biomarkeru pro nádorová onemocnění, s cílem zlepšit diagnostiku, sledování a prognózu těchto onemocnění. Cílem této práce bylo poukázat na souvislost koncentrací cfDNA s různými typy hemato-onkologických onemocnění.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Robinu Klieberovi za vynikající odborné vedení mé bakalářské práce včetně poskytování cenných rad a materiálních podkladů, které výrazně přispěly k celkovému rozvoji této práce. Dále mé poděkování směřuje k Hematologicko-onkologickému oddělení Fakultní nemocnice Plzeň za poskytnutí nezbytných dat, která byla v této práci využita. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Skálové za odborný dohled a pomoc při měření dat do praktické části této bakalářské práce.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ.....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	12
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM ZKRATEK.....	14
ÚVOD	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 NUKLEOVÉ KYSELINY.....	18
1.1 Mutace DNA	19
2 TEKUTÉ BIOPSIE	21
2.1 Volná cirkulující DNA.....	21
2.1.1 Historie.....	21
2.1.2 Charakteristika cfDNA	22
2.1.3 Původ cfDNA v organismu.....	22
2.2 Extracelulární váčky	24
3 VYUŽITÍ VOLNÉ CIRKULUJÍCÍ DNA V KLINICKÉ PRAXI.....	26
3.1 Cirkulující nádorová DNA	27
3.2 Prenatální diagnostika	27
3.3 cfDNA a civilizační nenádorová onemocnění.....	28
3.3.1 Obezita	28
3.3.2 Kardiovaskulární onemocnění.....	28
3.3.3 Diabetes mellitus 2. typu.....	29
3.3.4 Cévní mozková příhoda	29
3.4 cfDNA a nádorová onemocnění	30
3.4.1 ctDNA jako nástroj sledování účinku léčby.....	30
3.5 Solidní nádory	31
3.5.1 Kolorektální karcinom	31
3.5.2 Nemalobuněčný karcinom plic.....	31
3.5.3 Karcinom prsu	32
3.5.4 Karcinom prostaty	32
3.5.5 Karcinom pankreatu.....	32
3.5.6 Karcinom močového měchýře.....	32
3.6 Hematologické nádory.....	33
3.6.1 Leukémie.....	33
3.6.2 Mnohočetný myelom	34
3.6.3 Lymfomy.....	34

4	METODY ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZY VOLNÉ CÍRKULUJÍCÍ DNA	36
4.1	Izolace cfDNA.....	36
4.2	Kvantifikace cfDNA	36
4.3	Molekulárně genetická analýza ctDNA.....	36
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	38
5	CÍL PRÁCE	38
5.1	Hlavní cíl.....	38
5.2	Dílčí cíle	38
6	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	39
7	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU.....	40
8	METODIKA	41
8.1	Zpracování vzorků plné krve.....	41
8.2	Izolace cfDNA.....	41
8.2.1	Postup izolování cfDNA z alikvotů plazmy.....	41
8.3	Metody kvantifikace cfDNA	43
8.3.1	Kvantifikace na přístroji Qubit™ 3.0	43
8.3.2	Kvantifikace na přístroji TapeStation 2200	44
9	VÝSLEDKY	46
9.1	Koncentrace izolovaných vzorků cfDNA	46
9.2	Fragmentační analýza izolovaných vzorků cfDNA.....	47
9.3	Spojitosť koncentrace cfDNA s klinickým stádiem nemoci.....	48
9.3.1	Chronická lymfocytární leukémie	48
9.3.2	Difúzní velkobuněčný B-lymfom.....	49
9.3.3	Folikulární lymfom	50
9.4	Spojitosť koncentrací cfDNA s odpovědí na léčbu.....	50
9.5	Spojitosť koncentrací cfDNA s pohlavím pacientů	52
9.6	Spojitosť koncentrací cfDNA s věkem pacientů.....	53
	DISKUZE.....	55
	ZÁVĚR	58
	SEZNAM LITERATURY	59
	SEZNAM PŘÍLOH.....	75

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Porovnání průměrných koncentrací cfDNA z Qubit™ 3.0 a TapeStation 2200	47
Graf 2 Průměrné zastoupení fragmentů cfDNA v jednotlivých skupinách vzorků.....	48
Graf 3 Hodnoty koncentrací cfDNA v čase diagnózy s klinickým stádiem CLL	49
Graf 4 Hodnoty koncentrací cfDNA v čase diagnózy s klinickým stádiem DLBCL.....	49
Graf 5 Hodnoty koncentrací cfDNA v čase diagnózy s klinickým stádiem FL.....	50
Graf 6 Průměrná koncentrace cfDNA naměřená metodou Qubit™ 3.0 skupiny vzorků v čase diagnózy, po prvním a druhém cyklu léčby s ohledem na odpovědi na léčbu	51
Graf 7 Průměrná koncentrace cfDNA naměřená metodou TapeStation 2200 skupiny vzorků v čase diagnózy, po prvním a druhém cyklu léčby s ohledem na odpovědi na léčbu	51
Graf 8 Průměrná koncentrace cfDNA z Qubit™ 3.0 vzorků v době diagnózy v rámci pohlaví	52
Graf 9 Průměrná koncentrace cfDNA z TapeStation 2200 vzorků v době diagnózy v rámci pohlaví.....	52
Graf 10 Porovnání koncentrací cfDNA z Qubit™ 3.0 skupiny vzorků v době diagnózy v jednotlivých věkových skupinách.....	53
Graf 11 Porovnání koncentrací cfDNA z TapeStation 2200 skupiny vzorků v době diagnózy v jednotlivých věkových skupinách.....	54

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Různé úrovně sbalení DNA v chromozomech	19
Obrázek 2 Biomarkery uvolňované do krve z nádoru	25
Obrázek 3 Počátek inkubace plazmy s magnetickými kuličkami a pufrem v magnetickém stojánku; separované magnetické kuličky po inkubaci v magnetickém stojánku	42
Obrázek 4 Fluorimetr Qubit TM 3.0 s výsledkem měření koncentrace	43
Obrázek 5 TapeStation 2200 připravený ke spuštění	44
Obrázek 6 Ukázka výsledku fragmentační analýzy vzorku P66-1 s průměrnou délkou fragmentů cfDNA 200 párů bází	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Informace o pacientech zařazených do praktické části	40
Tabulka 2 Skupiny vzorků	41
Tabulka 3 Hodnoty koncentrací cfDNA	46
Tabulka 4 Průměrná velikost fragmentů cfDNA v časových bodech jednotlivých vzorků.	47
Tabulka 5 Četnost pacientů jednotlivých věkových skupin.....	53

SEZNAM ZKRATEK

μl	Mikrolitr
A	Adenin
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
BEAMing	Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics
bp	Páry bází
C	Cytosin
CA 15-3	Cancer antigen 153
CA 19-9	Karcinomový antigen
CA-125	Karcinomový antigen
CAE	Karcinoembryonální antigen
CEA	Karcioembryonální antigen
cfDNA	Volná cirkulující DNA
cffDNA	Volná cirkulující fetální DNA
cfRNA	Volná cirkulující RNA
CLL	Chronická lymfocytární leukémie
CNS	Centrální nervový systém
CR	Kompletní remise
CRC	Kolorektální karcinom
CRP	C-reaktivní protein
CTC	Cirkulující nádorové buňky
ctDNA	Cirkulující nádorová DNA
DAMP	Molekulární vzory spojené s poškozením
ddPCR	Kapčková digitální PCR
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-buněčný lymfom
dPCR	Digitální polymerázová řetězová reakce

eccDNA	Extrachromozomální cirkulární DNA
EGFR.....	Receptor epidermálního růstového faktoru
FL	Folikulární lymfom
G	Guanin
HbA1c.....	Glykovaný hemoglobin
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex
K3EDTA.....	Kyselina ethylendiamintetraoctová tridraselná sůl
miR-105	mikroRNA 105-1
miRNA.....	mikroRNA
ml.....	Mililitr
MM.....	Mnohočetný myelom
MRD	Minimální reziduální nemoc
mRNA.....	messengerová RNA
NETóza.....	Extracelulární pasti neutrofilních granulocytárních leukocytů
ng	Nanogram
NGS	Sekvenování nové generace
NIPT	Neinvazivní prenatální testování
nm	Nanometr
NSCLC	Nemalobuněčný karcinom plic
PCR.....	Polymerázová řetězová reakce
pg.....	Pikogram
PR.....	Parciální remise
PSA.....	Prostatický specifický antigen
rRNA	ribozomální RNA
RT-PCR	Kvantitativní polymerázové řetězové reakci v reálném čase
SD.....	Stabilní nemoc
SLE.....	Systémový lupus erythematoses

T Thymin

TP53 Tumor protein p53

U Uracil

ÚVOD

Volná cirkulující DNA (cfDNA) představuje krátké fragmenty DNA, které se nacházejí v krevní cirkulaci a jiných tělních tekutinách nezávisle na buňkách. Tato extracelulární DNA je uvolňována do tělních tekutin převážně procesy, mezi které patří zejména apoptóza, nekróza a procesy aktivního uvolňování. Od objevení cfDNA v roce 1948 neustále vzrůstá množství odborných publikací, zabývající se potenciálem cfDNA jako biomarkeru v souvislosti s různými onemocněními, především onkologickými.

Vzhledem k velmi nízkým koncentracím v periferní krvi, představuje tento typ materiálu výzvu pro jakýkoliv analytický systém. U zdravých osob se cfDNA pohybuje v rozmezí 0 až 100 ng/ml a je rychle odstraňována z oběhu činností ledvin, jater, sleziny nebo lymfatických uzlin. Stěžejním faktorem je, že se v krvi pacienta může nacházet jak zdravá, tak nádorová DNA (ctDNA). U patologických stavů bývá koncentrace cfDNA zvýšená, kdy u nádorových onemocnění může koncentrace dosáhnout i více než 1000 ng/ml. Dále jsou přítomny patrné rozdíly v hladinách ctDNA mezi pacienty s různými typy nádorů. Ke zvýšení koncentrace cfDNA může také dojít v průběhu těhotenství, po orgánové transplantaci či sepsi.

Incidence nádorových onemocnění celosvětově roste, proto je potřeba nalézt takové přístupy, které by mohly zlepšit časnou diagnostiku, sledování odpovědi na léčbu či monitoraci vývoje onemocnění. Klasickou metodou odběru vzorku tkáně je tkáňová biopsie, která pro pacienta představuje zátěž a může vést k po odběrovým komplikacím. Takovému invazivnímu postupu by se mohlo předejít analýzou ctDNA z tekutých biopsií, jakožto neinvazivního přístupu, díky kterému by mohlo dojít k překonání nedostatků v současné onkologické diagnostice.

TEORETICKÁ ČÁST

1 NUKLEOVÉ KYSELINY

Živý organismus je tvořený organickými biomolekulami, které se především skládají z atomů uhlíku, vodíku, kyslíku a draslíku. Mezi organické sloučeniny obecně náleží – bílkoviny, sacharidy, lipidy a nukleové kyseliny (Alberts, 2008).

Nukleové kyseliny jsou biomolekuly tvořící polymer, skládající se z nukleotidů. Nukleotid je molekula složená z dusíkaté báze a z pěti-uhlíkatého cukru (pentózy), kterým je ribóza nebo 2-deoxyribóza. Dle typu pentózy dělíme nukleotidy na ribonukleotidy a deoxyribonukleotidy. Jednotlivé nukleosidy (molekuly složené pouze z dusíkaté báze a pentózy) jsou kovalentně spojeny pomocí fosfodiesterové vazby (Alberts, 2008).

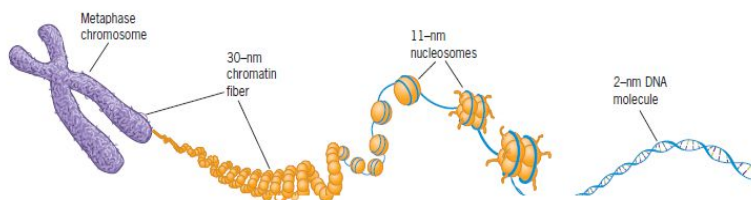
Rozeznáváme dva druhy nukleových kyselin: ribonukleovou kyselinu (RNA) skládající se z ribózy a nukleových bází adeninu (A), guaninu (G), cytosinu (C), uracilu (U) a deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), skládající se ze stejných bází jako RNA, avšak obsahuje místo uracilu thymín (T) a jako pentóza je zde 2-deoxyribóza. DNA je složena ze dvou komplementárních řetězců nukleotidů stočených do dvoušroubovice. Komplementaritou řetězců se rozumí pravidlo pro párování nukleotidů ve dvouvláknové struktuře DNA, kde A se páruje dvěma vodíkovými vazbami s T a G se páruje třemi vodíkovými vazbami s C (Alberts, 2008).

DNA se nachází v jádře a mitochondriích buňky, zatímco RNA v jadérku a cytoplazmě. Lineární pořadí nukleotidů v DNA kóduje genetickou informaci buňky. Funkce DNA spočívá v uchování genetické informace a u každého jedince je jedinečná a neměnná. RNA vzniká přepisem DNA procesem zvaným transkripce a slouží především jako předloha pro syntézu proteinů (procesem translace), potřebných pro zachování buněčné struktury a funkcí (Alberts, 2008).

V eukaryotních jádrech se nachází chromatin, který je tvořen DNA, histonovými proteiny a dalšími podpůrnými proteiny. Kolem histonových oktamerů se vine DNA a formuje tak nukleozom. Histony chrání segment DNA v nukleozomu od štěpení specializovanými enzymy, zvanými endonukleázy. Chromatinové vlákno se tedy skládá z DNA vláken, jež je v pravidelných intervalech otočeno okolo histonů. Nukleozomový řetězec je smotáván do závitů (solenoidů) a solenoidy jsou místy přichyceny na proteinové

lešení, což dává vzniknout záhybům. Tato struktura se následně stáčí a formuje chromozom (Snustad, Simmons, 2015).

Obrázek 1 Různé úrovně sbalení DNA v chromozomech



Zdroj: Snustad, Simmons, 2011

Genetická informace lidské somatické buňky je uložena ve 23 párech chromozomů. Pohlavní haploidní buňky obsahují pouze 23 chromozomů – obsahují jednu sadu chromozomů. Vajíčko a spermie po splynutí přispívají svou sadou chromozomů ke tvorbě nového diploidního jedince (Alberts, 2008; Snustad, Simmons, 2015).

1.1 Mutace DNA

Genetické změny akumulované během milionů let evoluce nám pomohly se přizpůsobit proměnlivým podmínkám, nicméně z krátkodobého hlediska jsou mutace především v kódujících oblastech DNA, kdy dochází ke změně ve struktuře výsledného proteinu. Změna i v jediném nukleotidu v řetězci DNA může mít katastrofální následky. Proto je důležitá genetická stabilita, která je docílena přesnou replikací DNA a opravou náhodných chyb. Mutace je tedy jakákoliv změna genetické informace, která je zapříčiněna různými vlivy. Mezi nejčastější vlivy, způsobující poškození DNA, patří: ionizující záření (fyzikální), radikálové iniciátory (chemické) nebo virové infekce (biologické). Mutace z dlouhodobého hlediska vlivem přirozené selekce napomáhají k evolučnímu vývoji daného organismu, ale mutace v genech, zapojených do zásadních buněčných procesů jako je buněčné dělení nebo diferenciací, mohou způsobit vážná onemocnění, zejména nádorová (Alberts, 2008).

Samotná mutace se týká jakékoliv nově vzniklé nebo dědičné změny v genotypu jedné buňky (nově vzniklá somatická mutace) nebo celého organismu (germinální dědičná mutace). Somatické, nově vzniklé (*de novo*), mutace se mohou vyskytnout v jakékoliv jaderné buňce a v jakékoliv fázi buněčného cyklu. Mutace se dělí na germinální, které jedinec dědí z buněk zárodečné linie od svých rodičů (vajíčka nebo spermie) a somatické mutace, týkající se somatických neboli nezárodečných buněk a vznikají

v průběhu života. Pokud dojde k mutaci v somatické buňce, výsledný mutagenní fenotyp se vyskytne pouze u potomků této buňky a nebude přenášena přes pohlavní buňky na potomstvo. Mutace může být i zpětná (reverzní), kdy dojde k obnově původního fenotypu díky druhotné mutaci. Mutace v genotypu organismu zahrnují také změny v počtu a struktuře chromozomů (chromozomální aberace). Mutace zahrnující změny ve specifických místech v genu na úrovni jednoho nukleotidu jsou označovány jako bodové mutace, jež zahrnují záměnu (substituci) jednoho nukleotidu za jiný, vložení nového nukleotidu (inzerci) nebo ztrátu (deleci) jednoho či několika nukleotidových párů (Snustad, Simmons, 2015).

2 TEKUTÉ BIOPSIE

Biopsie je proces odběru živé tkáně či buněk. Vzorek tkáně je následně vyhodnocen cytologickými, histologickými, histochemickými nebo molekulárně genetickými metodami. Tekutá biopsie je termín vytvořený k popisu takových diagnostických postupů, prováděných na tekutém biologickém materiálu, nejčastěji ze vzorku krve. Tekutá biopsie byla prvně zavedena pro účel analýzy cirkulujících nádorových buněk (CTC) a rychle se rozšířila na cirkulující nádorovou DNA (ctDNA) a další produkty odvozené od nádoru. Mezi ně patří cirkulující nádorové onkoproteiny, onkometabolity, cirkulující volná RNA (cfRNA – kódující i nekódující) nebo nádorové extracelulární váčky (například exosomy). Z cirkulujících váčků, jako jsou exosomy, mikrovezikuly nebo apoptotická tělíška lze analyzovat dále zmíněnou ctDNA, cfRNA a různé glykoproteiny a antigeny. Příkladem může být prostatický specifický antigen (PSA) nebo karcinoembryonální antigen (CEA) (Alix-Panabières, Pantel, 2021; Kustanovich et al., 2019; Salvi et al., 2016).

Problematika tekutých biopsií zaujímá velmi aktivní oblast výzkumu. Vzhledem k velmi nízkým koncentracím cirkulujících analytů, CTC i ctDNA v periferní krvi, představuje tento typ materiálu výzvu pro jakýkoliv analytický systém. Představuje však slibný neinvazivní přístup, díky kterému by mohlo dojít k překonání nedostatků v současné onkologické diagnostice. Nabízí se příklad užití tekutých biopsií k rychlé a časně detekci nádoru, který by vedl k brzkému léčebnému zákroku, zabraňující dalšímu nekontrolovatelnému dělení postižených buněk nebo jejich infiltraci do okolních tkání (Alix-Panabières, Pantel, 2021). Tekuté biopsie jsou přitažlivou variantou diagnostiky oproti klasické tkáňové biopsii. Často omezená dostupnost nádoru a s tím spojené invazivní postupy nezbytné pro získání tkáně vedou ke zvýšenému riziku komplikací spojených s výkonem odebrání tkáně. Tekuté biopsie však stále stojí na svém počátku, a aby se umožnilo rozšíření potenciálních aplikací tekutých biopsií v rutinní klinické praxi, je zapotřebí dalšího výzkumu jak na základní, tak aplikované úrovni (Ilić, Hofman, 2016).

2.1 Volná cirkulující DNA

2.1.1 Historie

Volná cirkulující DNA byla prvně objevena již v roce 1948 v lidské krvi (Mandel, Metais, 1948), nicméně roky nebylo tomuto tématu dávána větší pozornost. Později byla DNA detekována v séru a plazmě pacientů s onemocněním systémový *lupus erythematoses* (SLE) (Tan et al., 1966). Avšak až o něco déle byly objeveny zvýšené hladiny DNA v krvi

pacientů s rakovinou (Leon et al., 1977). V roce 1987 byla prokázána přítomnost specifických fragmentů DNA, které pocházely z krve pacientů s různými typy nádorů (Stroun et al., 1987). Tento objev podnítil řadu dalších výzkumů pro hledání DNA ukazatelů pro specifické typy rakoviny nejen z plazmy a séra, ale i z jiných tělesných tekutin (například ze slin, moči nebo sputa). Jako další důležité zjištění bylo prokázání fragmentů fetální DNA v krvi těhotných žen (Lo et al., 1997). Díky tomuto zjištění bylo možné vyvinout již běžně využívané neinvazivní prenatální testování (NIPT), které je bezpečnější na rozdíl od invazivního odběru plodové vody (amniocentézy), a které umožňuje genetické testování ještě nenarozeného plodu (Gahan et al., 2022).

2.1.2 Charakteristika cfDNA

Jedná se o extracelulární molekulu DNA, která byla uvolněna z buňky a vyskytuje se ve formě fragmentů. Délka fragmentů se velmi liší na základě mechanismu fragmentace a mechanismu uvolnění DNA do cirkulace. Délka fragmentů se pohybuje od 40–200 párů bází (bp), s vrcholem okolo 166 bp. Předpokládá se, že většina cfDNA, nalezená u zdravých a nemocných jedinců, je uvolňována během programované buněčné smrti – apoptózy. Některé fragmenty ale mohou být dlouhé až tisíce bp, což je považováno za důsledek nekrotické buněčné smrti. Vysoký podíl cfDNA pocházející z nádorů je však více fragmentovaný, s fragmenty menšími než 100 párů bází. Poločas cfDNA v cirkulující krvi se odhaduje od několika minut do 1–2 hodin a je závislý na několika faktorech. Jedná se o asociaci s molekulárními komplexy, které brání rychlé degradaci cfDNA (Kustanovich et al., 2019; Kubacková et al., 2015). Degradace je způsobena aktivitou cirkulujících enzymů, například DNázy I, která nepřímo koreluje s koncentrací cfDNA u pacientů s některými typy nádorových onemocnění (Tamkovich et al., 2006; Cherepanova et al., 2008).

2.1.3 Původ cfDNA v organismu

Za hlavní zdroje cfDNA v organismu jsou považovány: apoptóza, nekróza a aktivní sekrece (například vypuzení jader zráním erytroblastu nebo aktivní uvolňování extracelulárních váčků). Byly popsány další mechanismy uvolňování DNA, například fagocytóza a uvolňování extracelulární pasti neutrofilních granulocytárních leukocytů (NETóza) (Grabuschnig et al., 2020; Thierry et al., 2016). Mezi zdroje cfDNA však spadá i nenádorové patologické stavy, jako jsou lokální infekce, systémové infekce (septické stavy) ale i orgánové transplantace (Van der Vaart, Pretorius, 2008).

Studie prokázaly v krevní plazmě či séru také přítomnost malé extrachromozomální cirkulární DNA (eccDNA), mikroDNA, jednovláknové DNA, virové, bakteriální nebo přítomnost potravinové (rostlinné a masné) DNA (Kustanovich et al., 2019). Bylo též prokázáno, že ctDNA uvolněná z kultivovaných nádorových buněk koreluje s procentem buněk ve fázi G1 buněčného cyklu, nikoliv s úrovní buněčné apoptózy a nekrózy. Fáze G1 je nejdelší úsek buněčného cyklu a jedná se zejména o fázi buněčného růstu (Kong et al., 2017).

2.1.3.1 Apoptóza

Jedná se o fyziologickou programovanou buněčnou smrt, vyvolaný aktivací cysteinových proteáz (kaspáz) a poté jaderných endonukleáz. Studie naznačují, že hlavním zdrojem cfDNA v normálních i nemocných tkáních je apoptóza. Na začátku tohoto procesu se buňky zaokrouhlí, ztrácejí kontakt se svými sousedními buňkami a zmenšují se. Dochází ke zhroucení a puknutí jádra. Vytvářejí se apoptotická tělíška, což jsou fragmenty buňky obalené buněčnou membránou, které jsou následně pohlceny fagocytózou. Přítomnost apoptických buněk je krátkodobá. Účel tohoto procesu je odstranit nežádoucí buňky z důvodu udržení homeostázy (Vaux, Strasser, 1996; Aucamp et al., 2018; Suzuki et al., 2008; Orrenius, 2004).

2.1.3.2 Nekróza

Nekróza, též známá jako onkóza, je většinou patologický proces náhodné buněčné smrti, během které se ztrácí buněčný potenciál produkce a regenerace energie, což vede k otoku a rozpadu buněk a organel. Nekróza může být též jako alternativní proces odstranění nádorových buněk, které inaktivovaly apoptózu (Viorritto et al., 2007; Yang et al., 2015). Jedná se o nevratný proces, vyvolaný nejčastěji extrémními podmínkami vnějšího prostředí, vedoucí k rozsáhlému otoku tkáně, prasknutí buněčné membrány a vylití buněčného obsahu, způsobující zánětlivou reakci (Syntichaki, Tavernarakis, 2002). Nejčastější příčiny nekrózy jsou fyzikální vlivy a expozice chemickými látkami, dále pak ischemie, poruchy imunity a infekční agens. Nekróza nastává rychleji než apoptóza a výsledné odstranění nekrotických buněk je pomalejší (Syntichaki, Tavernarakis, 2002; Viorritto et al., 2007; Van der Vaart, Pretorius, 2008).

2.1.3.3 Aktivní uvolňování

Studiemi buněk v laboratorně navozených kultivačních podmínkách bylo zjištěno, že aktivně rostoucí zdravé a maligní buňky mohou vylučovat nukleové kyseliny do kultivačního média, zatímco mrtvé buňky tuto schopnost nemají (Aucamp et al., 2018;

Choi et al., 2004). Též bylo zjištěno, že některé lymfocyty a kultivované buněčné nádorové linie, včetně linie HL-60 (buňky lidské leukémie), nejen že jsou schopné spontánně uvolňovat nukleoproteinový komplex v rámci homeostázy, ale také přednostně uvolňovat nově syntetizovanou DNA (Stroun et al., 2001; Abolhassani et al., 1994). V současné době se nejvíce uvádí dva možné mechanismy aktivní sekrece – cfDNA je zapouzdřena v malých, buněčnou membránou obalených váčcích a uvolňována prostřednictvím exosomové dráhy (exosomy popisují nejmenší extracelulární vezikuly, vylučované většinou buněk a odpovědné za mezibuněčnou komunikaci). Druhým aktivním mechanismem je cfDNA uvolňována cestou závislou na amfizomech (amfizom je hybridní organela, která vzniká splnutím organely endozomu nebo multi-vezikulárního tělíska s autofagozomem) (Hu et al., 2021; Thakur et al., 2014; Jeppesen et al., 2019).

Rakovinné buňky jsou schopny uvolňovat exosomy aktivněji než normální buňky. Slouží ke komunikaci s dalšími rakovinnými buňkami, ovlivňují nádorové mikroprostředí a mají vliv na vznik metastáz (Chen et al., 2018; Ilkhani et al., 2020; Huang et al., 2018).

2.2 Extracelulární váčky

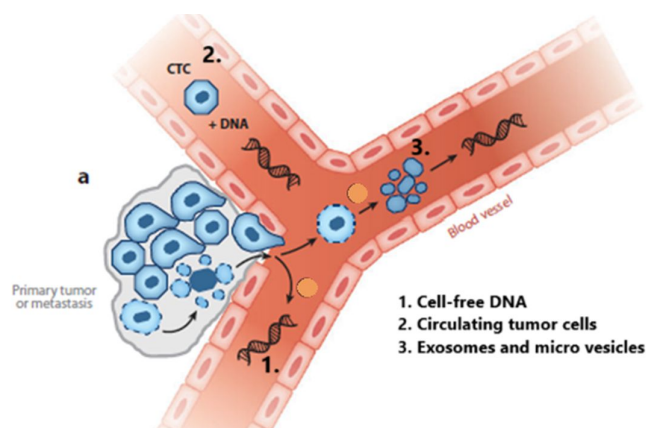
Jedná se o soubor váčků/vezikul aktivně uvolňovaných z buněk, které jsou ohraničeny lipidovou dvojrůstvou a nemohou se replikovat – neobsahují funkční jádro. Lze je nalézt v různých tělních tekutinách a jsou považovány za mediátory buněčné komunikace, schopné přenášet širokou škálu biologicky aktivních molekul, jako jsou například cytokiny, zánětlivé mediátory nebo mikro RNA (miRNA). Obsah těchto váčků může sloužit jako potenciální biomarkery pro různá nádorová onemocnění, procesy vznikajících metastáz, obezity, kardiometabolických onemocnění atd. Dnes jsou nazývány souhrnně extracelulárními vezikuly, nicméně na základě jejich velikosti je můžeme dělit na – exosomy s průměrem <100 nm, mikrovezikuly (mikročástice) s velikostí od 100–1000 nm a apoptotická tělíska >1000 nm (Bazzan et al., 2021; György et al., 2011).

Exosomy a mikrovezikuly byly z počátku chápány jako prostředek, díky kterým se buňka zbavila nežádoucích proteinů, lipidů a RNA (zejména miRNA a mRNA) (Théry, 2011). Na základě dnešních dat byla tato myšlenka zpochybněna a nyní se má za to, že je buňky používají jako takzvané posly k uplatnění specifických účinků na své prostředí (Kahlert, Kalluri, 2013). Exosomy se vytvářejí procesem vnitřního pučení v časných endozomech, později tvoří multi-vezikulární tělíska, která splynou s buněčnou membránou a uvolní se v podobě exosomů do extracelulárního prostředí. Ve většině případů

jsou exosomy produkovány a uvolňovány po aktivaci receptoru na buněčném povrchu (Cocucci et al., 2009). Jejich vnitřní složení není pouhou kopií cytosolického obsahu, ale mění se v reakci na různé podněty. Zdá se, že se zde uplatňuje molekulární heterogenita, kde vnitřní složení exosomů není závislé pouze na typu buňky, ale může se lišit na základě původu rodičovských buněk. Mikrovezikuly vznikají takzvaným uštípnutím z buněčné membrány (Bazzan et al., 2021; Laulagnier et al., 2005; Smith et al., 2015).

Na základě exprese specifických ukazatelů na povrchu exosomů, je možné detekovat tetraspaninové proteiny jako jako CD63, CD81 nebo CD9 (Bazzan et al., 2021; Pospichalova et al., 2015). Mikrovezikuly mají hlavní proteinové markery integriny, seriny a CD40 (Carnino et al., 2019).

Obrázek 2 Biomarkery uvolňované do krve z nádoru



Zdroj: Alix-Panabières et al., 2011; upraveno

3 VYUŽITÍ VOLNÉ CIRKULUJÍCÍ DNA V KLINICKÉ PRAXI

Stanovení hladiny cfDNA je poměrně složité vzhledem k její nízké koncentraci v tekuté biopsii. U zdravých osob se pohybuje v rozmezí 0 až 100 ng/ml. Apoptické buňky a cfDNA jsou u zdravých jedinců rychle odstraňovány. Eliminaci cfDNA zajišťují ledviny, játra, slezina nebo lymfatické uzliny. Stěžejní faktor je, že cfDNA je uvolňována do krevního řečiště z různorodých zdrojů, včetně CTC, primárního nádoru, mikrometastatických ložisek a zdravých buněk, mezi které náleží stromální a hematopoetické buňky. V krvi pacienta tedy cirkuluje jak zdravá, tak nádorová DNA (Kustanovich et al., 2019; Schwarzenbach, 2013; Schwarzenbach et al., 2011).

U patologických stavů bývá koncentrace cfDNA zvýšená, zejména u nádorových onemocnění. Zde může být hladina větší než 1000 ng/ml. Výrazné rozdíly jsou v hladinách cfDNA mezi pacienty s různými typy nádorů. Množství cfDNA v krvi může záviset na velikosti primárního nádoru nebo přítomnosti metastáz. Bylo také pozorováno, že pacienti s nádorem v raném stádiu či s benigními lézemi mají nižší hladinu cfDNA ve srovnání s pacienty s pokročilým nebo metastazujícím nádorem srovnatelné velikosti (Kustanovich et al., 2019; Zill et al., 2018; Bettegowda et al., 2014). Dále může být hladina cfDNA zvýšená v těhotenství, po orgánové transplantaci, při sepsi nebo při zánětlivých procesech (Swarup, Rajeswari, 2007). Dočasně vzrůstá hladina cfDNA i po vysoké fyzické zátěži, nicméně opět velmi rychle dochází k normalizaci (Hummel et al., 2018). Důležité se zdá být sledování kinetiky koncentrace cfDNA, jelikož její hladina není stabilní, ale kolísá (Fleischhacker, Schmidt, 2007; Stroun et al., 1987). Bylo zjištěno, že u pacientů, kteří neodpovídají na léčbu, není pozorována žádná změna hladiny cfDNA, zatímco u pacientů odpovídajících na léčbu hladina cfDNA klesá. Na základě studie došlo ke zjištění, že radiační terapie může vést ke snížení hladiny cfDNA (až o 90 %) v plazmě pacientů s nádory, i přes vznikající nekrózu (Leon et al., 1977; Kustanovich et al., 2019; Fleischhacker, Schmidt, 2007).

Krátký poločas cfDNA (15 minut až 2,5 hodiny) je vhodný pro analýzu cfDNA v „reálném čase“, což usnadňuje hodnocení léčebné odpovědi a dynamické hodnocení stavu postižené tkáně. Mezi metody, kterými lze stanovovat cfDNA patří zejména polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time PCR), a digitální kapková polymerázová řetězová reakce (digital droplet PCR, ddPCR). Dále lze uplatňovat pro

analýzy ctDNA sekvenování nové generace (NGS) (Gahan et al., 2022; Oberhofer et al., 2022).

3.1 Cirkulující nádorová DNA

Označuje část cfDNA, která pochází z rakovinných buněk a zpravidla se skládá z fragmentů o délce <145 párů bází. Je zodpovědná za podstatně vyšší koncentrace cfDNA v plazmě často pozorované u pacientů s rakovinou. Zároveň se hladiny ctDNA liší v závislosti na typu rakoviny. Bylo zjištěno, že nádory lokalizované v CNS uvolňují nejnižší hladiny ctDNA do krevního řečiště pravděpodobně díky hematoencefalické bariéře (Mouliere et al., 2011; Thierry et al., 2016; Tivey et al., 2022). Kromě nádorů CNS, je detekce ctDNA v krvi poměrně náročná u meduloblastomů a u nádorů ledvin, prostaty nebo štítné žlázy. Na druhou stranu lze ctDNA snadno detekovat ve vzorcích pacientů s pokročilou fází například rakoviny vaječníků, jater, tlustého střeva, plic a slinivky břišní (Bettegowda et al., 2014). Bylo také zjištěno, že existují variace v rámci stejného typu rakoviny v závislosti na histologii nádoru. Například u rakoviny plic bylo zjištěno vyšší procento detekce ctDNA u dlaždicových nádorů ve srovnání s adenokarcinomy (Zhang et al., 2019). Nádory s určitými změnami, jako jsou mutace TP53 (strážce genomu, senzor poškození DNA) a nárůst počtu kopií, mají zvýšené uvolňování ctDNA. Může to být způsobeno zvýšenou metabolickou aktivitou nebo buněčným obratem. V tomto ohledu se předpokládá, že poškození TP53 jsou markery agresivity a špatné prognózy (Lam et al., 2021; Sánchez-Herrero et al., 2022).

Cirkulující nádorová DNA se stále častěji používá jako biomarker pro vedení klinického rozhodování, což vede k lepší diagnóze, hodnocení nejlepší léčby a sledování onemocnění. Došlo díky ní ke zlepšení klinických výsledků u některých typů rakoviny, jako je nemalobuněčný karcinom plic a karcinom prsu (Pessoa et al., 2020).

3.2 Prenatální diagnostika

Díky studiím z roku 2008, analýza cfDNA získaná z mateřské plazmy náleží v současné době k široce používaným screeningovým testům pro detekci chromozomálních aneuploidií, mezi které nejčastěji patří trizomie chromozomu 21 (Downův syndrom), trizomie chromozomu 18 (Edwardsův syndrom) a trizomie chromozomu 13 (Patauův syndrom). Používá se též jako screeningový test pro určení pohlaví plodu a pro detekci aneuploidií pohlavních chromozomů (Chitty et al., 2018; Fan et al., 2008; Chiu et al., 2008).

Bez buněčná fetální DNA (cffDNA) je reprezentativní pro celý fetální genom. Testovací centra mají tak přístup k fetálnímu genomu prostřednictvím neinvazivního odběru žilní krve. cffDNA pochází z placentárních trofoblastických buněk, která je vylučována do mateřského krevního oběhu ve vysoce fragmentované formě a je detekovatelná již od 4. týdne těhotenství (Hanson et al., 2022; Gai et al., 2021). Kromě neinvazivního hlediska získávání cffDNA je další výhodou této metody stádium těhotenství, ve kterém lze vzorky získat. Většinou se invazivní metody provádějí od 11. týdne těhotenství, zatímco spolehlivé hladiny cffDNA pro neinvazivní klinické testování lze teoreticky získat zhruba od 7. týdne těhotenství, jako je tomu v případě stanovení fetálního pohlaví (Hanson et al., 2022; Hill et al., 2012). cffDNA je specifická pro probíhající těhotenství, jelikož dochází k jejímu odstranění z mateřského oběhu krátce po porodu (Lo et al., 1999).

3.3 cfdDNA a civilizační nenádorová onemocnění

3.3.1 Obezita

Obezita je charakterizována nadměrným tělesným tukem v důsledku kalorické nerovnováhy. Roli hrají také další faktory, a to genetické, dietní a socioekonomické faktory. Zvýšený tělesný tuk zvyšuje hladiny prozánětlivých cytokinů a následkem nastává chronický zánět, který vede k apoptóze buněk a nekróze tkání. Následkem tohoto procesu může dojít k negativnímu ovlivnění zdraví jedince a způsobit vysoké riziko rozvoje různých onemocnění. Proces systémového zánětu spojeného s metabolickou dysfunkcí vyskytující se u obézních jedinců, může přispívat ke zvýšenému uvolňování cfDNA do krevního řečiště (Camuzi Zovico et al., 2020; Weisberg et al., 2003; Schmidt et al., 2005).

3.3.2 Kardiovaskulární onemocnění

Koncentrace volné cirkulující DNA se zvyšuje v důsledku kardiovaskulárního onemocnění včetně hypertenze a infarktu myokardu (Polina et al., 2020).

Hypertenze je chronický stav spojený s vysokým rizikem úmrtnosti. Na základě studií je naznačována silná souvislost mezi zánětem a hypertenzí. Předmětem diskuse zůstává, zdali je zánět zdrojem nebo výsledkem zvýšení krevního tlaku. Zvýšené hladiny cfDNA jsou spojovány s mnoha kardiometabolickými rizikovými faktory, například zvýšené hladiny cholesterolu. Během hypertenze jsou tkáně a orgány dlouhodobě vystaveny škodlivým faktorům, jako je například oxidační stres (Polina et al., 2020; Jylhävä et al., 2014). Oxidační stres může způsobit poškození genomové DNA, což může vést k uvolnění cfDNA do krevního řečiště. Studie ukazují, že vyšší hladina cfDNA v krvi může být

známkou poškození cévního endotelu. To naznačuje, že cfDNA by mohla být použita jako nový způsob sledování progresu hypertenze na molekulární úrovni (Ermakov et al., 2013; Polina et al., 2020).

Studie ukazují, že hladina cfDNA v krvi se u pacientů s infarktem myokardu zvyšuje až 50krát ve srovnání se zdravými kontrolami. V plazmě pacientů s infarktem myokardu koreluje cfDNA s dobře zavedenými ukazateli nekrózy, jako jsou srdeční troponiny, enzym kreatinkináza a C-reaktivní protein (CRP). Vysoké hladiny cfDNA a nekrotických ukazatelů jsou často spojeny s vážnějším poškozením srdečního svalu. To naznačuje, že množství uvolněné cfDNA může být ukazatelem závažnosti poškození srdečního svalu (Polina et al., 2020; Zemmour et al., 2018).

3.3.3 Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu, nejběžnější typ diabetu, je chronické metabolické onemocnění, které je charakterizováno poruchou glukózové homeostázy. Tato porucha je způsobena kombinací faktorů, včetně nedostatečnou funkcí beta pankreatických buněk (β -buněk), inzulínové rezistence a chronického zánětu. Ke vzniku a progresi tohoto onemocnění přispívá zvýšená apoptóza β -buněk pankreatu a snížená funkční kapacita zbývajících buněk. Standardně zavedené ukazatele pro monitorování kompenzace diabetu mellitu 2. typu, jako je hladina glykovaného hemoglobinu (HbA1c), není schopný souhrnně a neinvazivně detekovat či monitorovat probíhající destrukci β -buněk v ostrůvcích pankreatu. Vzhledem k tomu, že počet lidí s tímto onemocněním celosvětově neustále roste, je potřeba vyvinout minimálně invazivní biologické ukazatele (Karaglani et al., 2022).

Bylo zjištěno, že hladiny cfDNA nejsou rozdílné mezi zdravými jedinci a pacienty s diabetem. Nicméně bylo zjištěno, že pacienti s více než 14 lety diabetu vykazují významně vyšší hladiny cfDNA než pacienti s kratší dobou diagnostikovaného diabetu (Karaglani et al., 2022).

3.3.4 Cévní mozková příhoda

Cévní mozková příhoda je celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí a hlavní příčinou invalidity. Ischemická cévní mozková příhoda je poranění tkáně způsobené okluzí tepny zásobující mozek. Toto poškození mozku vede k uvolnění cfDNA, molekulárního vzoru spojeného s poškozením, která se váže na receptory na imunitních buňkách. Molekulární vzory spojené s poškozením (Damage associated molecular patterns, DAMP) jsou hlavními spouštěči této systémové zánětlivé reakce na mrtvici. Pacienti se závažnější

mrtvicí mají větší imunitní odpověď na poraněnou tkáň, a to může zahrnovat zvýšené uvolňování cfDNA. Vzhledem k existenci velkého množství různých molekul DAMP uvolněných do oběhu po cévní mozkové příhodě, je využití jejich hodnoty jako neinvazivních biomarkerů k diagnostice cévní mozkové příhody stále cílem velkého množství prací v oblasti výzkumu biologických ukazatelů cévní mozkové příhody (Roth et al., 2023).

3.4 cfDNA a nádorová onemocnění

Laboratorní diagnostika nádorového onemocnění je obvykle prováděna řadou multidisciplinárních metod, mezi které náleží cytologické, histologické, imunohistochemické, cytogenetické, molekulárně genetické, imunoanalytické nebo biochemické metody.

V současné době jsou v klinické praxi z krevního séra často a široce stanovované hladiny biomarkerů jako karcinomový antigen 125 (CA-125), karcinoembryonální antigen (CAE), karcinomový antigen 19-9 (CA19-9) nebo prostatický specifický antigen (PSA). Tyto biomarkery mají obecně nízkou specifitu, a proto se neustále vyvíjejí nové neinvazivní biomarkery. Volná cirkulující DNA obsahuje specifické změny související s nádorem, jako jsou mutace a modifikace nukleových bází (například metylace nukleotidů, zejména cytosinu). Analýza ctDNA umožňuje v některých ohledech nahrazení tkáňové biopsie z důvodu snadného opakování její analýzy v čase, umožňující nenáročné sledování nádorové zátěže, odpovědi na léčbu a časnou identifikaci relapsu nemoci. Molekulárně biologická charakterizace ctDNA u nádorů s definovanou genetickou změnou má velký potenciál pro klinické laboratoře zejména pro časnou diagnostiku a sledování minimální reziduální nemoci (MRD) (Salvi et al., 2016).

3.4.1 ctDNA jako nástroj sledování účinku léčby

Mnohé studie popisují korelaci hladin ctDNA s nádorovou zátěží. Dynamika ctDNA tak může být použita jako nástroj pro sledování léčebné odpovědi. Zdá se, že cytotoxické terapie (chemoterapie), obecně zvyšují hladiny cfDNA v důsledku zvýšeného buněčného rozpadu. Naopak cytostatická léčba (zastavující dělení buněk) neovlivňuje tak zásadně hladiny ctDNA (Sánchez-Herrero et al., 2022). Pacienti s chirurgicky odstraněnými nádory vykazují po operaci prudký pokles hladiny ctDNA (Diehl et al., 2008). Avšak hladiny nespecifické cfDNA, v důsledku poranění okolní tkáně během operace při odstranění nádoru, se obecně zvyšují. Vystává tak otázka po potřebě stanovit vhodný

časový bod pro odběr tekuté biopsie po takovýchto zákrocích. U některých nádorových pacientů detekce ctDNA po resekci nádoru, chemoterapii nebo radioterapii umožňuje například sledování minimální reziduální nemoci (MRD). ctDNA představuje možnost detekovat volnou cirkulující DNA buněk nádoru, které v organismu přetrvávají po léčbě. Hodnocení přítomnosti takové DNA v krvi by přispívalo ke stanovení molekulární remise (Sánchez-Herrero et al., 2022; Szpechcinski et al., 2012; Parikh et al., 2021).

3.5 Solidní nádory

3.5.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (CRC) představuje třetí nejčastější typ diagnostikovaného zhoubného novotvaru. Přežití u této nemoci bývá špatné, zejména proto, že většina jedinců je diagnostikována v pozdních stádiích nemoci (Hao et al., 2014). Nádorové markery pro tuto nemoc jsou CA19-9 a CEA, nicméně ne u všech pacientů je stanovení na tyto biomarkery průkazné (Ludwig, Weinstein, 2005). Na základě studie došlo ke zjištění, že koncentrace cfDNA je u pacientů s primárním CRC významně vyšší než u zdravých kontrol a pacientů se střevními polypy. Zároveň hladiny cfDNA korelují s věkem, histologickou diferenciací tkáně a stádiem nádoru primárních CRC. Vyšší hladiny byly také naměřeny u pacientů s recidivou onemocnění než u operovaných pacientů. To naznačuje prognostický potenciál cfDNA u CRC. Hodnocení dynamiky koncentrací cfDNA ukázalo pokles po chirurgické resekci nádorového ložiska ve všech případech 20 až 120 dní po operaci (Hao et al., 2014).

3.5.2 Nemalobuněčný karcinom plic

Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) je celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtnosti v oblasti nádorových onemocnění a stále dochází k diagnostice v pokročilých stádiích, což vede ke špatné prognóze. Mutační analýza genu EGFR je v současné době běžně prováděným testem u NSCLC v případě terapie EGFR inhibitory (Čapková et al., 2018). Na základě mnoha studií se potvrdilo, že léčba EGFR inhibitory by měla být založena na mutačním stavu EGFR, nikoli na klinických charakteristikách. Jedná se o vysoce specifickou a neinvazivní metodu (Luo et al., 2014). Analýza ctDNA je slibnou metodou k detekci MRD, která je schopna detekovat relaps významně dříve než rutinní zobrazovací metody (Chaudhuri et al., 2017).

3.5.3 Karcinom prsu

Krevní biomarkery jako je CEA a CA 15-3 se používají v diagnostice rakoviny prsu, nicméně nedostatky těchto analytů jako nedostatečná citlivost a specifčnost, způsobují komplikace. Jelikož hladina ctDNA představuje míru nádorové zátěže, může screening ctDNA pomoci sledovat odpověď nádoru na léčbu. Detekované mutace v ctDNA mohou zjistit případnou rezistenci na léčbu nebo naopak senzitivitu nádoru na různá chemoterapeutika a pomoci tak identifikovat účinnou terapii. V současné době není pro hodnocení odpovědi během léčby schválena žádný test z tekuté biopsie, avšak kombinace zobrazovacích technik s ctDNA může přispět k lepšímu sledování onemocnění (Liu et al., 2022; Hu et al., 2018).

3.5.4 Karcinom prostaty

Jedná se o nejčastěji diagnostikovaný novotvar u mužů. Existují biomarkery o různé citlivosti a specifčnosti, které se rutinně používají pro diagnostiku a monitorování tohoto onemocnění. Na základě studie došlo ke zjištění, že využití cfDNA je u této nemoci omezené. Pacienti s pokročilým metastazovaným karcinomem mají vyšší koncentrace plazmatické cfDNA, než zdravé kontroly a muži s lokalizovaným onemocněním. Nicméně mezi zdravými kontrolami a pacienty s lokalizovaným onemocněním nebyl pozorován žádný rozdíl (Chen et al., 2021).

3.5.5 Karcinom pankreatu

Časná detekce karcinomu pankreatu může výrazně zlepšit míru přežití. U téměř všech pacientů jsou špatné výsledky přežití zapříčiněny pozdní diagnózou. Do nedávné doby neexistovala dostatečně citlivá a specifická molekulárně genetická metoda pro časnou detekci karcinomu pankreatu, avšak studie z roku 2023 uvádí test pro detekci 5-hydroxymethylcytosinu v cirkulující DNA. Bylo dosaženo 96,9% specifity a 66,7% senzitivity, dokonce i u pacientů s časným stádiem nemoci (Haan et al., 2023).

3.5.6 Karcinom močového měchýře

Většinu karcinomů z přechodných buněk je tvořeno karcinomy močového měchýře. Na rozdíl od vzorků krve, se pro vyšetření z tekutých biopsií nabízí moč, díky přímému kontaktu s buňkami (Koguchi et al., 2022). V současné době chybí biomarkery pro predikci relapsu po chirurgickém odnětí orgánu s léčebným záměrem. Prediktivní biomarker může pomoci vybrat takovou volbu terapie, která by se jevila jako nejvíce vhodná a snížit tak zbytečnou zátěž pacienta (Soave et al., 2017). cfDNA získaná z moče se jeví jako slibný biomarker. Ukazuje se, že množství cfDNA v moči je závislé na délce fyzického kontaktu

povrchu nádoru s močí. Byly prokázány vysoké koncentrace cfDNA u pacientů s nejmenšími objemy moči. Na základě analýzy byl nalezen významný rozdíl mezi zdravými kontrolami a pacienty se zhoubným nádorem. U skupiny pacientů s nezhoubnými nádory a skupiny pacientů se zhoubnými nádory však nebyl nalezen rozdíl. Nicméně, skupina nezhoubných nádorů se lišila od skupin s vyššími stádii nádorů zhoubných, nikoli však se stádii nižšími. Kvantifikace cfDNA z moče těchto pacientů by se tedy mohla používat jako dodatečné vyšetření k běžným laboratorním testům ke stratifikaci pacientů (Brisuda et al., 2016).

3.6 Hematologické nádory

3.6.1 Leukémie

Molekulární profilování leukémií je důležité v souvislosti s výběrem terapie a stratifikací rizika. Měření minimální reziduální nemoci se provádí analýzou vzorků, kdy pacient dosáhl po léčbě remise. Toto monitorování se nejčastěji provádí z aspirátu kostní dřeně a obnáší invazivní zákrok pro odběr vzorku. Odběr periferní žilní krve a následná analýza cfDNA umožňuje častější neinvazivní odběr vzorků, a proto se stává koncovým bodem nových klinických studií v měření MRD (Short et al., 2020).

Vzorky plazmy či séra jsou obohaceny o ctDNA více než u solidních nádorů, jelikož patologické leukocyty akutních leukémií jsou v kontaktu s cirkulující krví. Na základě studií byly zjištěny vyšší hladiny ctDNA u akutních leukémií než u zdravých kontrolních vzorků. Z důvodu vyšší odolnosti leukemických buněk vůči apoptóze, se častěji uvolňují do cirkulace obecně delší fragmenty ctDNA. Díky tomu se došlo k závěru, že vyšší klinickou významnost má celistvost ctDNA, než koncentrace (Gao et al., 2010).

U akutní myeloidní leukémie (AML) dochází k nádorové transformaci prekurzorů hematopoetických kmenových buněk myeloidní linie. Výsledky studií naznačují, že použití pouze ctDNA jako zdroj testovaného materiálu, může negativně ovlivnit detekci mutací, které by byly jinak přítomny v kostní dřeni. Kostní dřeň a ctDNA se mohou doplňovat při hodnocení a monitorování akutní myeloidní leukémie. Zejména při použití NGS byly v ctDNA nalezeny klinicky významné mutace, které naopak nebyly přítomné v kostní dřeni. Hlavní případné uplatnění cfDNA je tedy při hodnocení MRD (Short et al., 2020).

U lymfoidních leukémií dochází k ovlivnění tvorby a diferenciaci lymfocytů. Nejčastějším onemocněním do této kategorie spadá chronická lymfocytární leukémie

(CLL) a akutní lymfoblastická leukémie (ALL). V případě CLL se jedná o lymfoproliferativní malignitu B lymfocytů a postihuje především dospělé jedince. ALL se častěji vyskytuje u dětí (Kubacková et al., 2017). Výsledky studií představují vysoké hladiny ctDNA u ALL v počátku diagnózy a po zahájení terapie rychle klesá. Po zahájení léčby hladiny ctDNA klesají na hladiny zdravých subjektů (Schwarz et al., 2009). Však molekulárně genetická analýza přeskupení nádorově specifického imunoglobulinového těžkého řetězce genu IGH ze ctDNA, může potenciaálně sloužit pro monitorování léčebné odpovědi (Frickhofen et al., 1997). U pacientů s CLL je ctDNA snadno detekovatelná, což poskytuje příležitost pro komplexní genotypizaci nemoci. Díky tomu by analýza ctDNA společně s dalšími zavedenými metodami mohla vést k celkovému hodnocení nemoci a přispět tak například k včasnému odhalení selhání terapie (Yeh et al., 2017).

3.6.2 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění postihující terminálně diferenciované B lymfocyty. Biopsie kostní dřeně (trepanobiopsie) poskytuje pouze omezený molekulární profil nereprezentující všechna nádorová ložiska, zejména v přítomnosti dalších subklonů v jiných částech kostní dřeně i mimo kostní dřeň. Jelikož různé subklony mohou reagovat na léčbu odlišně je potřeba nových krevních biomarkerů (Kubacková et al., 2017). Na základě studií bylo zjištěno, že profil ctDNA je velice podobný s profilem aspirátu kostní dřeně (Allegra et al., 2022). ctDNA může být potenciaálně použita jako marker prognózy, jelikož snížené přežití pacientů s MM koreluje s větším množstvím genetických změn plazmatické DNA. I zde hladiny ctDNA v reakci na terapii klesají. V tekuté biopsii jsou přítomny delší fragmenty ctDNA pocházející zejména z nekrotizovaných nádorových buněk po účincích terapie (Vrábel et al., 2020). Vyšší hladiny ctDNA jsou přítomny u pacientů s mimodřeňovým (extramedulárním) onemocněním, oproti pacientům s dřeňovým (medulárním) typem (Long et al., 2019). V současné době nemá ctDNA u tohoto onemocnění uplatnění v hodnocení minimální reziduální nemoci, i když přibývá důkazů o její užitečnosti a možné budoucí aplikaci (Allegra et al., 2022).

3.6.3 Lymfomy

Lymfomy jsou vyvolány nádorovou transformací lymfocytů a standartně jsou pro jejich diagnostiku využívány biopsie tkání či lymfatických uzlin. Obzvláště problém představují lymfomy centrálního nervového systému. Tradičně používané metody k hodnocení léčebné odpovědi mají svá omezení, jako neschopnost detekovat onemocnění

na molekulární úrovni a zachycení dynamických nádorových procesů. Lymfomové buňky se takřka nevyskytují v krvi pacienta. To ztěžuje klasické hodnocení MRD na molekulární úrovni (Colmenares et al., 2022). Většina studií došla k závěru, že koncentrace ctDNA je obecně vyšší u pacientů s lymfomy, nicméně rozsah koncentrací je velice variabilní. Zároveň ctDNA obsahuje zvýšený počet somatických mutací, než u zdravých kontrol (Lim et al., 2021). Byla také zjištěna 85% shoda v mutacích mezi DNA, extrahovanou z lymfatických uzlin a ctDNA u difúzního velkobuněčného B-lymfomu (Bohers et al., 2015).

4 METODY ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZY VOLNÉ CIRKULUJÍCÍ DNA

Z důvodu obvykle nízkých koncentrací cfDNA jsou vyžadovány metody s vysokou analytickou senzitivitou a specificitou. Různé dostupné metody pro získání například CTC jsou založeny buď na detekci specifických antigenů, exprimovaných na povrchu buněčných membrán, nebo na fyzikálních vlastnostech buněk, jako je jejich velikost. V současnosti se jako tekuté biopsie používají další biomarkery přenášené krví, jako jsou krevní destičky (trombocyty), bezbuněčné nukleotidové řetězce (cfRNA a cfDNA) a extracelulární váčky. Trombocyty obsahují různé RNA transkripty a proteiny, které mohou ovlivnit proces vývoje metastáz (Best et al., 2015; Elazezy, Joosse, 2018). Nádorové buňky využívají schopnosti tvořit aktivně extracelulární váčky a vylučovat tak kódující a nekódující RNA transkripty do oběhu (Heitzer et al., 2017). Příkladem je karcinom prsu, kdy dochází exosomem zajištěný přenos mikroRNA miR-105, který podporuje tvorbu metastáz (Zhou et al., 2014).

4.1 Izolace cfDNA

Pro extrakci cfDNA z tekutých biopsií existuje několik přístupů. Mezi ně například patří izolace a obohacení cfDNA pomocí kladně nabitých magnetických kuliček, které vážou záporně nabitou fosfátovou kostru DNA. Kolonová extrakce a obohacování cfDNA na bázi vazebné afinity molekul DNA s pevnou fází z oxidu křemičitého a chemické extrakce polymery nebo na bázi fenol-chloroformového činidla. Metoda na bázi oxidu křemičitého má nevýhodu nižších výtěžků cfDNA z důvodu částečné ztráty fragmentů menších než 150 párů bází. Oproti tomu metoda založená na separaci magnetickými kuličkami se zdá být efektivnější pro záchyt kratších fragmentů cfDNA (Elazezy, Joosse, 2018).

4.2 Kvantifikace cfDNA

V současné době náleží mezi nepoužívanější metody ke stanovení koncentrace DNA metody založené na spektrofotometrii, fluorimetrické detekci a nejpřesnější, polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) (Li et al., 2014).

4.3 Molekulárně genetická analýza ctDNA

Celkové množství ctDNA může tvořit pouze 0,01 % celkové cfDNA (Diehl et al., 2005) s průměrnou délkou fragmentů kratších menší než 167 párů bází (Chen et al., 2020), což činí detekci ctDNA náročnou, zejména v raných fázích nádoru. Pro studium

genomového materiálu nádoru pomocí tekuté biopsie se objevily dvě strategie. První je založena na sledování reziduálního onemocnění z periferní krve na základě nádorově specifických mutací známých z primárního vzorku nádoru. Nevýhodou představuje nutnost znalosti genetického pozadí nádoru. Druhou možností je necílený molekulárně genetický screening. Výhodou je schopnost identifikovat změny vyskytující se během léčby a bez předchozí znalosti genetického pozadí primárního nádoru. Nevýhodou tohoto přístupu je potřeba vysoké koncentrace ctDNA z důvodu spolehlivé stanovení nádorově specifických změn (Elazezy, Joosse, 2018; Heitzer et al., 2017).

V současné době jsou analýzy ctDNA založeny zejména na sekvenačních technikách, PCR v reálném čase, digitální PCR nebo metody označované jako BEAMing (Chen et al., 2020).

Metoda BEAMing (beads, emulsions, amplification and magnetics) začíná namnožením předem určeného úseku DNA pomocí PCR. Výsledný produkt PCR se poté přidává k modifikovaným magnetickým kuličkám s oligonukleotidy (primery), rozptýlenými v oleji za tvorby emulze. Po opětovné PCR reakci se provádí prodlužování primeru s jednou bází nebo hybridizace se sondami specifickými pro mutovanou DNA. Na závěr se pomocí průtokové cytometrie kuličky se zachycenou mutací detekují a kvantifikují. Jedná se o metodu, která analyzuje vždy jednu alelu genu. Výhodou BEAMing metody je vysoká citlivost pro detekci alel s nízkou frekvencí (Lauring, Park, 2011). Metoda BEAMing může hrát důležitou roli při monitorování pacienta v časových intervalech. Například test pro detekci mutací v genu EGFR u pacientů s NSCLC, založeného na principu BEAMing metody je velice atraktivní metodou pro predikci léčebné odpovědi na léčbu (Scilla, Rolfo, 2019).

Mutace v ctDNA ze vzorků tekuté biopsie lze detekovat různými přístupy, které nejčastěji zahrnují testování buď jednoho určitého genu (klasické PCR metody) nebo testování v režimu multiplex (NGS). Sekvenování nové generace představuje komplexnější přístup k analýze, která detekuje oblasti více genů. Oblasti jsou hodnoceny současně pomocí panelu genů, významných pro danou malignitu. Oproti PCR metodám, NGS umožňuje získat komplexnější obraz z jediného vzorku (Scilla, Rolfo, 2019).

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

5.1 Hlavní cíl

Cílem teoretické části této bakalářské práce je seznámení čtenáře s pojmem volná cirkulující DNA a jejího laboratorního stanovení za účelem časné diagnostiky, sledování odpovědi na léčbu či monitorace vývoje nejrůznějších onemocnění s důrazem kladeným na onemocnění nádorová. Cílem praktické části bakalářské práce je stanovení koncentrace volné cirkulující DNA z plazmy 15 pacientů s nádorovými lymfoproliferacemi, léčených na Hematologicko-onkologickém oddělení Fakultní nemocnice Plzeň.

5.2 Dílčí cíle

1. Izolace cfDNA ze vzorků plazmy pacientů, léčených pro hematoonkologická onemocnění, z odběrů v čase diagnózy, po prvním cyklu léčby chemoterapií a po druhém cyklu léčby.
2. Kvantifikace cfDNA v jednotlivých vzorcích izolovaných z plazmy.
3. Vyhodnocení naměřených hodnot a porovnání výsledků s klinickými parametry.

6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

1. Jaký je rozdíl mezi koncentracemi izolované cfDNA u použitých metod kvantifikace?
2. Koreluje koncentrace izolované cfDNA v čase diagnózy s klinickým stádiem onemocnění?
3. Koreluje koncentrace izolované cfDNA po prvním a druhém cyklu léčby chemoterapií s odpovědí na léčbu?
4. Existuje vztah mezi koncentrací izolované cfDNA a etiologií pacientů, jako je věk a pohlaví?

7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Do praktické části této bakalářské práce, probíhající ve spolupráci s Hematologicko-onkologickým oddělením Fakultní nemocnice v Plzni, byly zahrnuty vzorky plazmy a klinická data 15 pacientů s B-lymfoproliferativním onemocněním v různých stádiích nemoci. Konkrétně, 5 pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL), 6 pacientů s difúzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) a 4 pacienti s folikulárním lymfomem (FL). Pacienti byli diagnostikováni v různých klinických stádiích nemoci, od nejméně závažných (klasifikace 0-1) až po závažná a velice závažná (4, IVA, IVB). Zařazení pacienti se skládali ze 7 mužů a 8 žen ve věku od 59 do 88 let, přičemž průměrný věk pacientů v době diagnózy byl 75 let. 10 pacientů dosáhlo po léčbě kompletní remise, 2 pacienti dosáhli stabilní nemoci a 3 pacienti dosáhli částečné remise.

Všichni pacienti, zařazení do studie, poskytli informovaný souhlas s odběrem a zpracováním vzorků krve k vědecko-výzkumným účelům.

Tabulka 1 Informace o pacientech zařazených do praktické části

Identifikace pacienta	Diagnóza	Klinické stádium	Věk v době diagnózy	Pohlaví	Odpověď na indukční léčbu
P24	CLL	0	70	Muž	SD
P25	DLBCL	IVB	83	Muž	CR
P26	DLBCL	IIE	72	Žena	SD
P32	DLBCL	IIB	64	Žena	CR
P35	FL	1	82	Muž	CR
P36	FL	4	77	Žena	CR
P43	DLBCL	IVA	88	Žena	CR
P52	DLBCL	IV	77	Žena	CR
P58	DLBCL	IV	59	Žena	CR
P66	CLL	1	70	Muž	CR
P68	CLL	1	79	Muž	PR
P71	FL	4	79	Žena	CR
P74	CLL	1	72	Žena	PR
P75	FL	3	69	Muž	CR
P81	CLL	4	73	Muž	PR

Legenda: CLL – chronická lymfocytární leukemie, DLBCL – difúzní velkobuněčný B-lymfom, FL – folikulární lymfom, klinické stádium CLL – klasifikace dle Raie, klinické stádium DLBCL – klasifikace dle Ann-Arbor, klinické stádium FL – klasifikace dle FLIPI, SD – stabilní nemoc, CR – celková remise, PR – částečná remise

Zdroj: Hematologicko-onkologické oddělení Fakultní nemocnice Plzeň, 2024

8 METODIKA

8.1 Zpracování vzorků plné krve

Periferní žilní krev byla odebrána do zkumavek s protisrážlivým činidlem K3EDTA. Nejdéle do 1 hodiny po odběru byly zkumavky transportovány do laboratoře, kde byla krev centrifugována při 3000x g po dobu 10 minut a teplotě 20 °C. Plazma byla přenesena do nové sterilní 15 ml Falcon zkumavky, kdy ve zkumavce nad frakcí bílých krvinek a krevních destiček bylo ponecháno zhruba 0,5 ml plazmy. Přenesená plazma byla opět centrifugována při 3000x g po dobu 15 minut a teplotě 4 °C. Plazma byla následně rozdělena po 1 ml do 1,5 ml sterilních mikrozkuavek, kdy na dně zkumavce bylo také ponecháno zhruba 0,5 ml plazmy. Mikrozkuavky se vzorkem plazmy se kódově značily a okamžitě zamrazily na -80 °C.

8.2 Izolace cfDNA

Vzorky, které byly analyzovány, byly řazeny do tří skupin dle období, ve kterém byl prováděn odběr plné krve:

Tabulka 2 Skupiny vzorků

Příklad na vzorku	P24-1	P24-2	P24-3
Čas náběru	V čase diagnózy	Po 1. cyklu léčby	Po 2. cyklu léčby

Zdroj: vlastní data

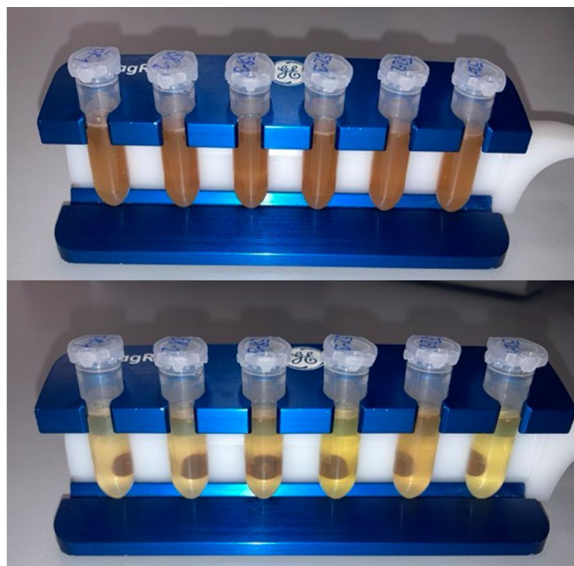
Pro izolaci cfDNA z mražených alikvotů plazmy byla využita komerční sada MagMax™ Cell-Free DNA Isolation Kit, LOT: 2308086 (Thermo Fisher Scientific, USA).

8.2.1 Postup izolování cfDNA z alikvotů plazmy

Alikvoty plazmy byly v čase izolace roztány při pokojové teplotě. Dále se vytemperoval izolační kit na pokojovou teplotu a před samotným použitím byly reagentie promíchány, zejména magnetické kuličky, které sedimentují na dno mikrozkuavky. Byl připraven Binding Solution/Beads Mix, složený pro jeden izolovaný vzorek plazmy ze 750 µl MagMax™ Cell-Free DNA Lysis/Binding Solution a 10 µl MagMax™ Cell-Free DNA Magnetic Beads. Do označené 2 ml mikrozkuavky bylo přidáno 600 µl plazmy a 760 µl připraveného mixu. Mikrozkuavka byla inkubována 10 minut a promíchána na laboratorní třepačce v pravidelných intervalech. Poté byla mikrozkuavka se vzorkem

a magnetickými kuličkami vložena do magnetického stojánu po dobu 5 minut (viz obrázek 3), kdy došlo k separaci magnetických kuliček. Po inkubaci, kdy byl izolovaný roztok zcela čirý, byl opatrně pomocí pipety odstraněn supernatant, aniž by byla narušena peleta magnetických kuliček s navázanou cfDNA. Mikrozkumavka byla vyjmuta z magnetického stojánu a kuličky byly resuspendovány ve 500 μ l MagMax™ Cell-Free DNA Wash Solution. Mikrozkumavka byla promíchána na třepačce, krátce centrifugována a inkubována 2 minuty v magnetickém stojánu. Vzniklý supernatant byl pipetou odstraněn. Dále byl do mikrozkumavky přidán 80% roztok ethanolu. Kuličky ve zkumavce byly resuspendovány a 1 minutu inkubovány v magnetickém stojánu. Po inkubaci byl opět odstraněn pipetou vzniklý supernatant. Postup s promytím 80% ethanolem byl proveden ještě jednou. V poslední části izolace byla mikrozkumavka umístěna mimo magnetický stojánek a kuličky bez ethanolu byly resuspendovány ve 30 μ l MagMax™ Cell-Free DNA Elution Solution a 5 minut inkubovány s pravidelným promícháváním. Po inkubaci byla mikrozkumavka krátce centrifugována, umístěna do magnetického stojánu a po 2 minutách inkubace byl čirý eluát, obsahující cfDNA přenesen do čisté 1,5 ml mikrozkumavky. Takto izolovaná cfDNA byla skladována krátkodobě při -20 °C do doby kvantifikace. Dlouhodobě byla izolovaná cfDNA skladována při -80 °C.

Obrázek 3 Počátek inkubace plazmy s magnetickými kuličkami a pufrem v magnetickém stojánu; separované magnetické kuličky po inkubaci v magnetickém stojánu



Zdroj: vlastní fotografie

8.3 Metody kvantifikace cfDNA

Ke kvantifikaci cfDNA byly použity dvě rozdílné metody:

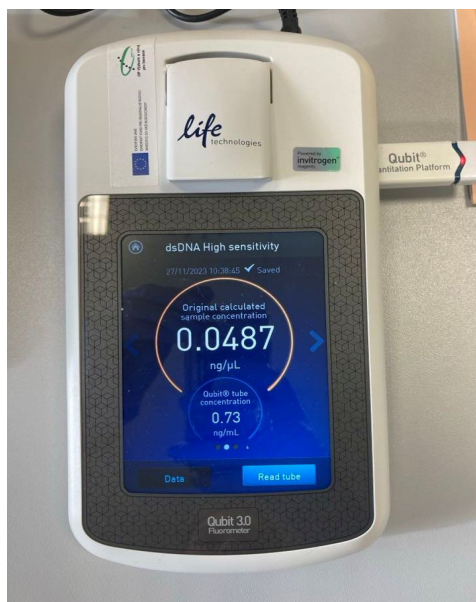
- Fluorimetrická metoda kvantifikace pomocí přístroje QubitTM 3.0 (ThermoFisher Scientific, USA).
- Denziometrická metoda kvantifikace separované cfDNA na automatické kapilární gelové elektroforéze TapeStation 2200 (Agilent Technologies, USA).

8.3.1 Kvantifikace na přístroji QubitTM 3.0

Ke kvantifikaci byl použit QubitTM dsDNA HS Assay Kit, LOT: 2301115 s mezí detekce 0,1–120 ng.

Kvantifikační kit byl vytemperován na pokojovou teplotu a vzorek izolované cfDNA byl roztán na ledu. Byl připraven pracovní roztok, složený pro jeden měřený vzorek z 1 μl QubitTM fluorescenční barvy a 199 μl QubitTM pufru. 197 μl vzniklého pracovního roztoku bylo přidáno ke 3 μl cfDNA a 190 μl pracovního roztoku bylo přidáno k 10 μl standardu 1 a standardu 2. Reakční zkumavky byly krátce centrifugovány a inkubovány 2 minuty ve tmě. Zkumavky se standardy a vzorky cfDNA byly postupně měřeny na přístroji QubitTM 3.0 (viz obrázek 4) a hodnota koncentrace cfDNA v $\text{ng}/\mu\text{l}$ byla zaznamenána.

Obrázek 4 Fluorimetr QubitTM 3.0 s výsledkem měření koncentrace



Zdroj: vlastní fotografie

8.3.2 Kvantifikace na přístroji TapeStation 2200

Kromě kvantifikace byl systém kapilární gelové elektroforézy použit pro fragmentační analýzu cfDNA. K měření byl použit High Sensitivity D1000 ScreenTape, LOT: 0202505-346 a High Sensitivity D1000 Reagents, LOT: 0006704963 s limitem detekce 10–1000 pg/ μ l a detekcí fragmentů DNA v rozmezí 35–1000 páru bází. Vyhodnocení probíhalo za použití TapeStation Control Software.

Obrázek 5 TapeStation 2200 připravený ke spuštění

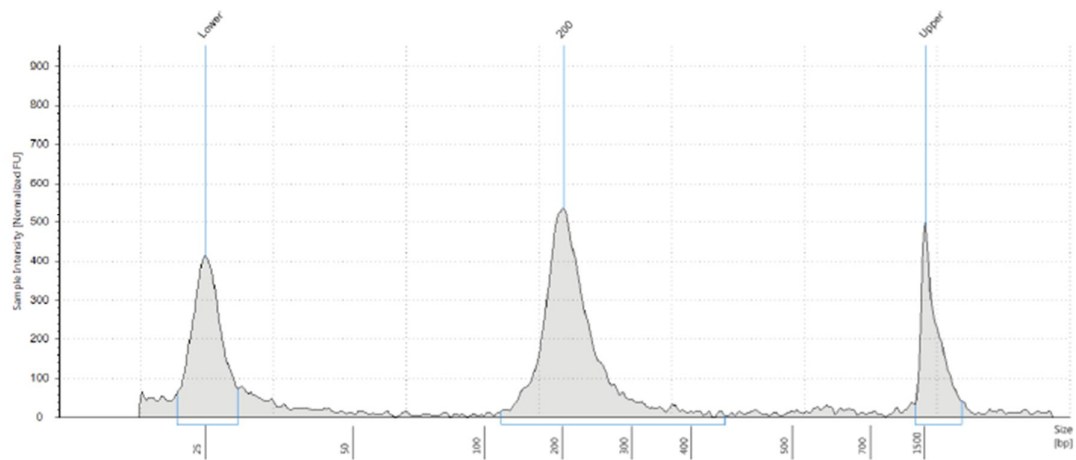


Zdroj: vlastní fotografie

Do stripu mikrozkušavek, určených pro systém TapeStation bylo přidáno 2 μ l D1000 reagenčního pufru, ke kterému byly přidány 2 μ l DNA žebříčku nebo 2 μ l vzorku cfDNA. Stripy byly uzavřeny a promíchány na třepačce po dobu 1 minuty. D1000 ScreenTape, temperovaný na pokojovou teplotu, byl vložen do přístroje (viz obrázek 5) spolu se stripem mikrozkušavek bez víčka a špičkami. Po uplynutí elektroforézy byla odečtena koncentrace v ng/ μ l a průměrná délka fragmentů cfDNA. Na obrázku číslo 6 lze vidět příkladný vzorek P66-1 s průměrnou délkou fragmentů 200 párů bází.

Obrázek 6 Ukázka výsledku fragmentační analýzy vzorku P66-1 s průměrnou délkou fragmentů cfDNA 200 párů bází

F2: 66-1



Zdroj: vlastní fotografie

9 VÝSLEDKY

Byla provedena izolace a kvantifikace volné cirkulující DNA ze vzorků 15 pacientů s B-lymfoproliferativním onemocněním ve třech časových bodech. Všechna uvedená data byla zpracována pomocí programu GraphPad Prism (verze 9) a programu Microsoft Excel (Office 365).

9.1 Koncentrace izolovaných vzorků cfDNA

V níže uvedené tabulce číslo 3 se nacházejí naměřené koncentrace izolované cfDNA z alikvotů plazmy.

Tabulka 3 Hodnoty koncentrací cfDNA

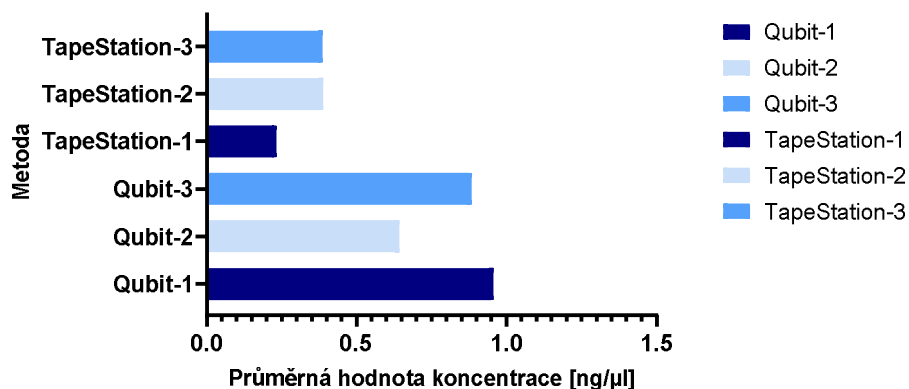
Vzorek	Qubit™ 3.0 [ng/μl]			TapeStation 2200 [ng/μl]		
	1	2	3	1	2	3
P24	TL	0,33	0,694	0,0693	0,214	0,267
P25	0,912	1,24	0,182	0,604	0,834	0,132
P26	0,888	1,93	TL	0,593	2,07	0,0815
P32	0,0527	0,0847	TL	0,0134	0,00225	0,00503
P35	0,0567	0,115	0,06	0,0939	0,099	0,0459
P36	0,242	0,379	0,185	0,0153	0,218	X
P43	8,07	1,85	2,61	X	0,286	0,945
P52	0,893	1,03	6,49	0,232	0,755	2,76
P58	0,773	0,793	1,01	0,229	0,256	0,323
P66	0,474	0,235	0,86	0,736	0,175	0,743
P68	0,215	0,194	0,189	0,0315	0,0142	0,107
P71	0,207	0,202	0,322	0,114	0,11	0,15
P74	0,333	0,543	0,064	0,173	0,501	0,024
P75	0,1	0,076	0,0993	0,0298	0,0578	0,0605
P81	1,12	0,631	0,492	0,548	0,231	0,133

Legenda: TL – koncentrace pod limitem detekce, X – chybné měření (nulový signál)

Zdroj: vlastní data

Nejvyšší koncentrace byla naměřena metodou Qubit™ 3.0 u vzorku P43-1, zatímco u metody TapeStation 2200 byla naměřena nejvyšší koncentrace u vzorku pacienta P52-3. Nejnižší koncentrace byla naměřena metodou Qubit™ 3.0 u vzorku P32-1 a metodou TapeStation 2200 u vzorku P32-2. Ve všech skupinách vzorků byla u pacienta P32 velmi nízká naměřená koncentrace. Z tabulky číslo 3 a zejména grafu 1, si lze povšimnout, že metoda Qubit™ 3.0 podávala obecně vyšší koncentrace než metoda TapeStation 2200.

Graf 1 Porovnání průměrných koncentrací cfDNA z QubitTM 3.0 a TapeStation 2200



Zdroj: vlastní data

9.2 Fragmentační analýza izolovaných vzorků cfDNA

Všechny izolované vzorky cfDNA byly podrobeny fragmentační analýze na přístroji TapeStation 2200. Přehled průměrných délek fragmentů cfDNA ve vzorcích je uvedeno níže, v tabulce číslo 4.

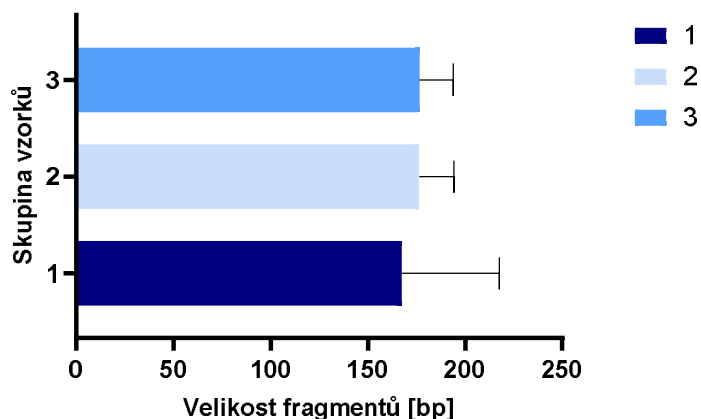
Tabulka 4 Průměrná velikost fragmentů cfDNA v časových bodech jednotlivých vzorků

Vzorek	Průměrná délka fragmentů cfDNA [bp]		
	1	2	3
P24	183	159	163
P25	177	176	177
P26	170	178	193
P32	206	191	186
P35	197	195	193
P36	122	186	163
P43	X	124	147
P52	178	172	181
P58	169	167	161
P66	200	172	144
P68	176	177	192
P71	193	195	190
P74	178	187	192
P75	179	191	196
P81	185	176	171

Legenda: X – chybné měření (nulový signál); Zdroj: vlastní data

Ve sledovaném souboru vzorků obsahovala skupina vzorků po druhém cyklu léčby v průměru nejdelší fragmenty se 177 páry bází. Skupina vzorků v době diagnózy má průměrnou délku fragmentů 168 páry bází a skupina po prvním cyklu léčby 176 páry bází.

Graf 2 Průměrné zastoupení fragmentů cfDNA v jednotlivých skupinách vzorků



Zdroj: vlastní data

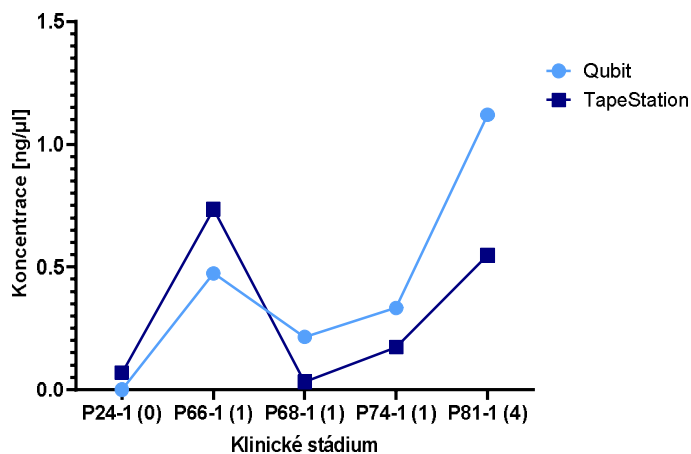
9.3 Spojitost koncentrace cfDNA s klinickým stádiem nemoci

V následující sekci byly hodnoceny koncentrace cfDNA s klinickým stádiem nemoci pro jednotlivé diagnózy. Pro hodnocení byly vybrány pouze koncentrace vzorků cfDNA izolovaných v čase diagnózy (skupina 1).

9.3.1 Chronická lymfocytární leukémie

Na grafu číslo 3 lze pozorovat nejvyšší koncentraci cfDNA u pacienta P81 v klinickém stádiu 4. Pacienti s klinicky nižším stádiem 1 vykazují kromě pacienta P66 nižší koncentrace cfDNA a pacient s klinickým stádiem 0 vykazuje koncentraci nejnižší. Pacient P66 s nízkým klinickým stádiem 1, u něhož byla koncentrace cfDNA vyšší než u ostatních pacientů se stejným klinickým stádiem, proběhla dle klinických dat krátce po dosažení kompletní remise progresu onemocnění do stádia 2.

Graf 3 Hodnoty koncentrací cfDNA v čase diagnózy s klinickým stádiem CLL

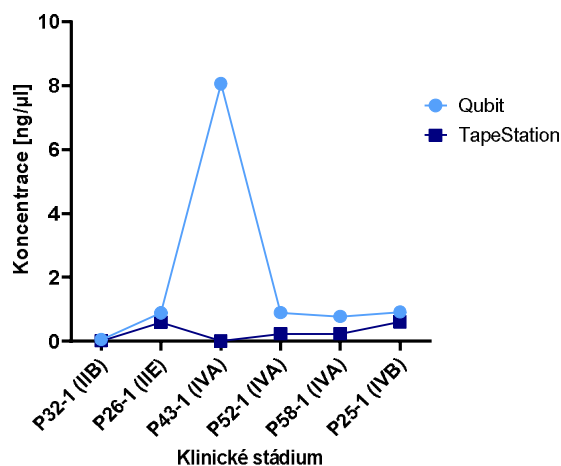


Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

9.3.2 Difúzní velkobuněčný B-lymfom

Z grafu číslo 4 je možné pozorovat nejvyšší koncentraci cfDNA u pacienta P43 se stádiem nemoci IVA. Takto vysoká koncentrace byla naměřena pouze za použití přístroje Qubit™ 3.0., metodou TapeStation 2200 se tento vzorek nepodařil změřit. V případě, že by koncentrace vzorku P43 byla srovnatelná s ostatními naměřenými koncentracemi v klinickém stádiu IVA, tak by nejvyšší průměrné koncentrace dosáhl vzorek P25 s nejvyšším klinickým stádiem IVB.

Graf 4 Hodnoty koncentrací cfDNA v čase diagnózy s klinickým stádiem DLBCL

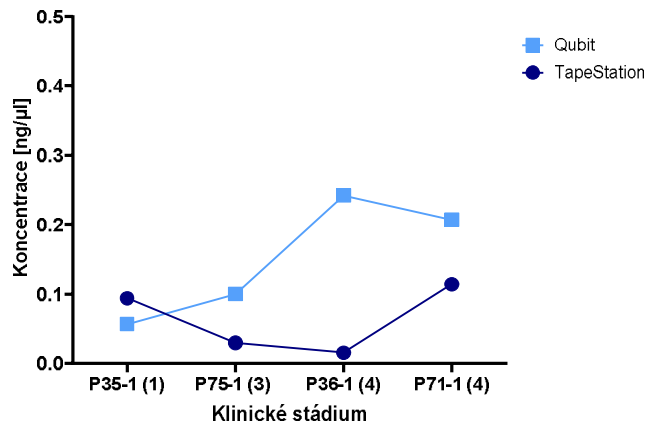


Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

9.3.3 Folikulární lymfom

V grafu číslo 5 si lze povšimnout nejvyšších koncentrací cfDNA u pacientů P36 a P71 v klinickém stádiu 4. Mezi stádii 1 a 3 není patrný velký rozdíl.

Graf 5 Hodnoty koncentrací cfDNA v čase diagnózy s klinickým stádiem FL

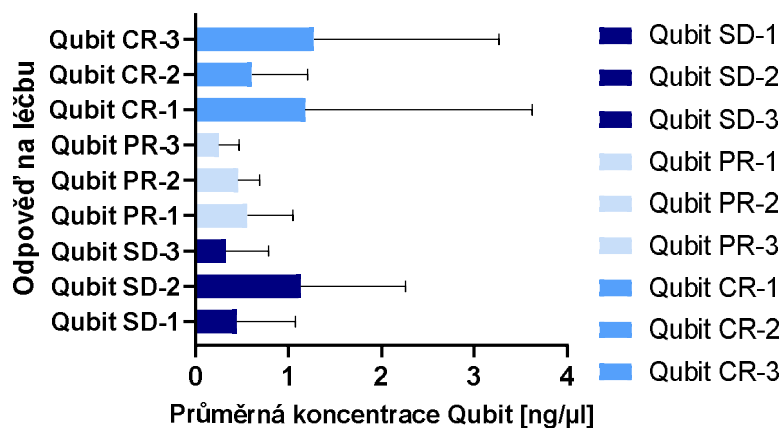


Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

9.4 Spojitost koncentrací cfDNA s odpovědí na léčbu

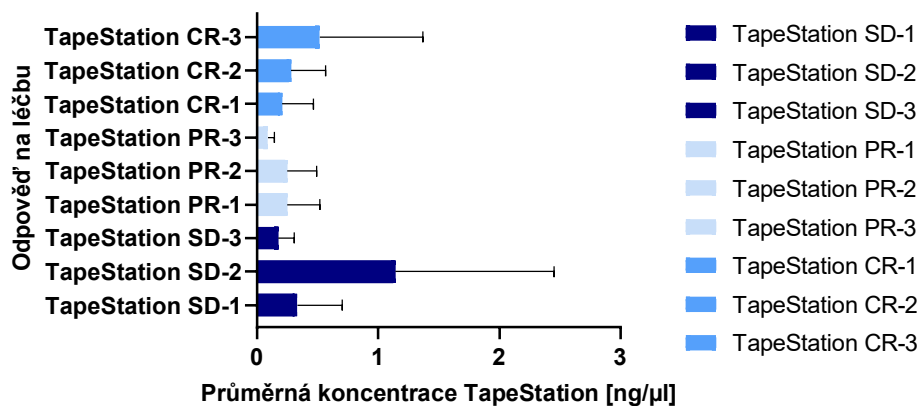
V grafu číslo 6 a 7 lze vidět porovnané koncentrace cfDNA v čase diagnózy, po prvním a druhém cyklu léčby. Oběma metodami byla naměřena nejvyšší průměrná koncentrace cfDNA po druhém cyklu léčby u pacientů s kompletní remisí, zatímco nejnižší u pacientů s parciální remisí. Též byly nalezeny klesající průměrné koncentrace cfDNA u vzorků s parciální remisí. Stoupající trend průměrné koncentrace cfDNA by byl v případě kompletní remise, kdyby hodnota vzorku P43-1 naměřená metodou Qubit™ 3.0 byla podobná ostatním vzorkům. U pacientů se stabilní nemocí a kompletní remisí byly naměřené průměrné hodnoty vyšší po prvním cyklu léčby než v čase diagnózy, opět v případě podobné koncentrace vzorku P43-1.

Graf 6 Průměrná koncentrace cfDNA naměřená metodou Qubit™ 3.0 skupiny vzorků v čase diagnózy, po prvním a druhém cyklu léčby s ohledem odpovědi na léčbu



Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

Graf 7 Průměrná koncentrace cfDNA naměřená metodou TapeStation 2200 skupiny vzorků v čase diagnózy, po prvním a druhém cyklu léčby s ohledem odpovědi na léčbu

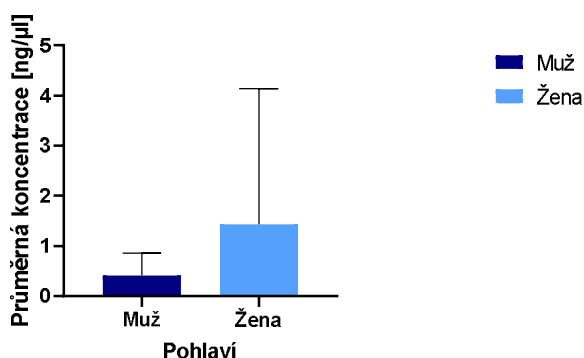


Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

9.5 Spojitost koncentrací cfDNA s pohlavím pacientů

Náš sledovaný soubor se skládal ze 7 mužů (47 %) a 8 žen (53 %). V následujícím grafu číslo 8 můžeme vidět průměrné koncentrace cfDNA (1,43 ng/μl) u žen a u mužů (0,41 ng/μl). I kdyby vzorek P43 měl výrazně nižší koncentraci cfDNA, ženy by měly nadále vyšší průměrnou koncentraci.

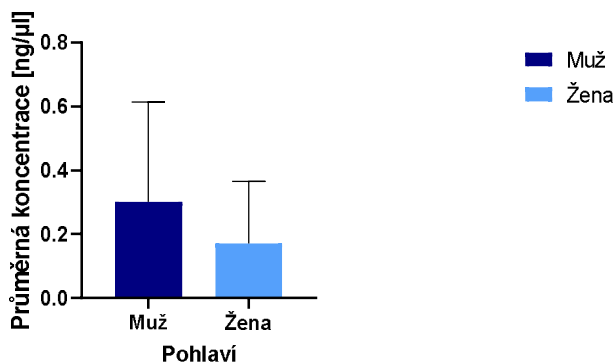
Graf 8 Průměrná koncentrace cfDNA z Qubit™ 3.0 vzorků v době diagnózy v rámci pohlaví



Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

U metody TapeStation 2200, jak si lze povšimnout v grafu 9, vychází však vyšší průměrná hodnota skupiny vzorků v době diagnózy u mužů (0,302 ng/μl), u žen je hladina cfDNA nižší (0,171 ng/μl).

Graf 9 Průměrná koncentrace cfDNA z TapeStation 2200 vzorků v době diagnózy v rámci pohlaví



Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

9.6 Spojitost koncentrací cfDNA s věkem pacientů

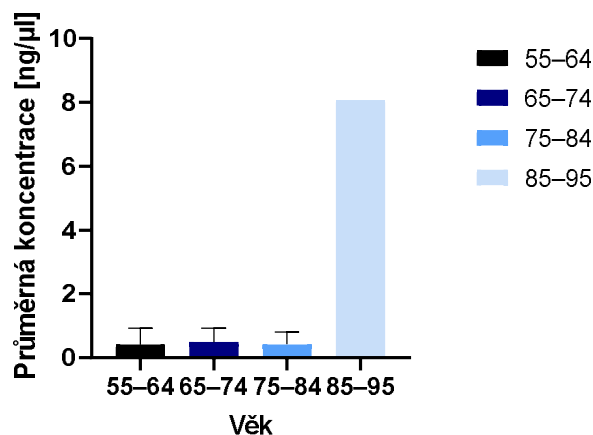
Tabulka 5 Četnost pacientů jednotlivých věkových skupin

Věkové rozmezí	55–64	65–74	75–84	85–95
Počet pacientů	2	6	6	1

Zdroj: Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň, 2024

V grafu číslo 10 byly porovnány průměrné koncentrace cfDNA metodou Qubit™ 3.0 skupiny vzorků v době diagnózy. Koncentrace skupiny ve věku 85–95 let je zastoupena pouze jedním pacientem P43, který má výrazně vyšší koncentraci cfDNA (8,07 ng/μl), oproti ostatním pacientům. U ostatních věkových skupin není patrný žádný významný rozdíl.

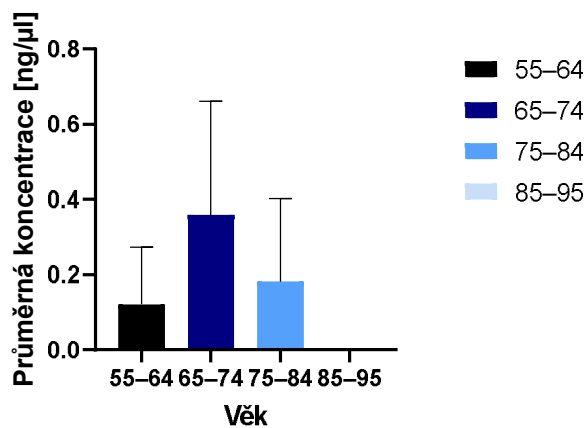
Graf 10 Porovnání koncentrací cfDNA z Qubit™ 3.0 skupiny vzorků v době diagnózy v jednotlivých věkových skupinách



Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

V grafu číslo 11 byly porovnány průměrné koncentrace cfDNA získané z TapeStation 2200 vzorků v době diagnózy s ohledem na věkovou skupinu pacientů. Vzorek P43 se touto metodou nepodařilo změřit. Nejvyšší průměrná koncentrace cfDNA byla též pozorována ve věkové skupině 65–74 let.

Graf 11 Porovnání koncentrací cfDNA z TapeStation 2200 skupiny vzorků v době diagnózy v jednotlivých věkových skupinách



Zdroj: vlastní data společně s daty Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň, 2024

DISKUZE

V posledních několika letech je analýza cfDNA u různých onemocnění, zejména těch onkologických, velmi zkoumaným tématem v rámci tekutých biopsií. Řada počátečních studií se zaměřovala na vztah koncentrace volné cirkulující DNA a časné diagnostiky, sledování odpovědi na léčbu či sledování vývoje nejrůznějších onemocnění. Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo seznámit čtenáře a shrnout poznatky o volné cirkulující DNA, možnostmi její analýzy a souvislostmi s různými onemocněními s důrazem na nádorová onemocnění.

Praktická část této bakalářské práce vznikla na základě studie, zahrnující 15 onkologických pacientů, léčených na Hematologicko-onkologickém oddělení Fakultní nemocnice Plzeň. U každého pacienta byly odebrány 3 vzorky krve, reprezentující časový horizont v době diagnózy, po prvním cyklu podané chemoterapie a po druhém cyklu léčby. Ze vzorků krve byla separována plazma a cfDNA byla izolována. CfDNA byla poté kvantifikována pomocí dvou metod, a to fluorescenčně pomocí přístroje Qubit™ 3.0 a denzitometricky pomocí přístroje na kapilární gelovou elektroforézu TapeStation 2200. Byla použita souprava Qubit™ dsDNA HS Assay Kit s limitem detekce 0,1–120 ng a High Sensitivity D1000 ScreenTape s limitem detekce 10–1000 pg/μl. Součástí analýzy na přístroji TapeStation 2200 byla také fragmentační analýza s limitem detekce 35-1000 párů bází. Cílem praktické části bylo porovnat naměřené koncentrace mezi těmito dvěma metodami a porovnat koncentrace cfDNA s klinickými daty pacientů.

Vzorky cfDNA P24-1, P26-3 a P32-3 se metodou Qubit™ 3.0 nepodařily kvantifikovat z důvodu příliš nízkých koncentrací, zatímco metodou TapeStation 2200 se neuspělo kvantifikovat vzorky P36-3 a P43-1. Naměřené koncentrace jednotlivých vzorků byly celkově vyšší u metody Qubit™ 3.0. I přes to, že fluorescenční metoda je méně citlivá, než TapeStation 2200, díky fluorescenční detekci dvouvláknové DNA je tato metoda více specifická. V literatuře, ve které se autoři zabývaly podobnou problematikou, byla zjištěna podobnost s výsledky od Williams et al., 2021, který se zabýval analýzou validačních materiálů z plazmy a výsledky od Ibrahim et al., 2022, který se zabýval analýzou moči.

Ve sledovaném souboru se nachází pacienti ve věku od 59 do 88 let s průměrným věkem 75 let v době diagnózy, přičemž 5 pacientů (33 %) bylo diagnostikováno s chronickou lymfocytární leukémií, 6 pacientů (40 %) s difúzním velkobuněčným B-buněčným lymfomem a 4 pacienti (27 %) s folikulárním lymfomem. Nejvíce pacientů (67 %) dosáhlo

po léčbě celkové remise. Částečné remise, docílilo 20 % pacientů a 13 % pacientů dosáhlo stabilní nemoci.

Pro hodnocení spojitosti koncentrace cfDNA s klinickým stádiem nemoci byly vybrány pouze koncentrace vzorků cfDNA izolovaných v čase diagnózy. Na základě studií byla zjištěna souvislost koncentrace cfDNA s klinickým stádiem onkologického onemocnění (Kubacková et al., 2017; Jamshidi et al., 2022). V našem případě naměřené koncentrace nejvíce korelovaly s onemocněním CLL, kdy nejvyšší koncentrace byla zaznamenána u vzorku P81-1 v klinickém stádiu 4 a patientského vzorku P66-1, u kterého krátce po dosažení celkové remise došlo k progresi do vyššího stádia. Také pacienti s DLBCL korelovali svou koncentrací cfDNA s klinickým stádiem, kde nejvyšších koncentrací dosáhly vzorky ve stádiu IIE a IVA, oproti nižším stádiím (IIB).

U folikulárního lymfomu byl prokázán nejmenší vliv koncentrace cfDNA na klinické stádium nemoci. Koncentrace byly však vyšší u vysokého stádia 4 oproti nižším stádiím (1 a 3), rozdíl však nebyl tak patrný jako u CLL nebo DLBCL.

Pro hodnocení vlivu koncentrace cfDNA s odpovědí na léčbu byly vybrány vzorky odebrané v čase diagnózy, po prvním a druhém léčebném cyklu. Nejvyšší průměrné koncentrace cfDNA po druhém cyklu léčby byly zaznamenány u pacientů s kompletní remisí, zatímco nejnižší byly naměřeny u pacientů s parciální remisí. Též byl zjištěn stoupající trend koncentrací cfDNA u kompletní remise v případě vyloučení vzorku P43-1, který má výrazně vyšší hladinu cfDNA oproti ostatním vzorkům. Trend s postupně klesající koncentrací cfDNA v průběhu léčby dosáhly pacienti s parciální remisí. Pacienti, kteří dosáhli stabilní nemoci měli razantní pokles v koncentracích cfDNA až po druhém cyklu léčby a u pacientů v celkové remisí byl razantní pokles pouze po prvním cyklu léčby, po druhém cyklu byla koncentrace cfDNA srovnatelná s koncentrací v době diagnózy, při použití fluorescenční metody kvantifikace. Hypotézu, že koncentrace cfDNA se v průběhu léčby snižuje splnili tedy pouze pacienti v parciální remisí. Hypotézu splňují i pacienti se stabilní nemocí, avšak až po druhém cyklu léčby. Zajímavostí jsou pacienti s nejlepší odpovědí na léčbu – v celkové remisí, u kterých je trend spíše opačný. To může být vysvětleno následkem rychlého rozpadu nádorové tkáně po razantních účincích chemoterapie, zvyšující celkové množství volné cirkulující DNA.

Co se týče pohlaví a věku pacientů, kvantifikační metodou QubitTM 3.0 naměřila vyšší průměrné koncentrace cfDNA v čase diagnózy u žen, metoda TapeStation 2200 naměřila

vyšší koncentrace cfDNA zase u mužů. Při porovnání věkových skupin a koncentrací cfDNA bylo docíleno stejného závěru mezi použitými metodami kvantifikace. Ve věkovém rozmezí 65–74 let se nacházely nejvyšší průměrné koncentrace. Měřený soubor se však skládá z relativně malého počtu pacientů, tudíž nelze vyvodit závěr, že pohlaví a věk pacientů nemá vliv na koncentraci cfDNA. Při porovnání těchto poznatků s výsledky jiných studií bylo dosaženo stejného závěru, jako je tomu například ve studii od Zhong et al., 2006.

ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly dosaženy stanovené cíle. V případě naměřené koncentrace jednotlivých vzorků byly koncentrace celkově vyšší u metody Qubit™ 3.0 oproti denzitometrické metodě TapeStation 2200. Až na některé výjimky pacientů byla prokázána korelace koncentrace volné cirkulující DNA (cfDNA) v čase diagnózy s klinickým stádiem onemocnění. Bylo též dosaženo hypotézy nižší koncentrace cfDNA u pacientů po prvním nebo druhém cyklu léčby oproti koncentracím cfDNA v čase diagnózy. Výjimku tvořili pacienti dosahující po léčbě kompletní remise, kteří měli po léčbě koncentrace vyšší pravděpodobně v důsledku vysoké efektivity podané chemoterapie, zvyšující množství cfDNA z usmrcené nádorové tkáně. Nebyl však nalezen žádný vztah mezi věkem či pohlavím pacientů s koncentrací cfDNA.

Současný stav výzkumu naznačuje, že cfDNA může sloužit jako cenný biomarker pro časnou diagnostiku, sledování a prognózu různých onemocnění, zejména onkologického původu. K tomu, aby se umožnilo rozšíření potenciálních aplikací tekutých biopsií v rutinní klinické praxi je zapotřebí dalšího výzkumu a samotné tekuté biopsie stojí teprve na svém počátku. Studiemi byla však zjištěna vysoká shoda mezi tkáňovými a molekulárními změnami v cirkulující nádorové DNA (ctDNA), což naznačuje možnost doplňkové analýzy ke klasickým metodám. Nicméně, jak již bylo zmíněno v této práci, test pro detekci mutací v genu EGFR u pacientů s karcinomem plic, je současně schválený jako prediktor léčebné odpovědi v USA a Evropě. Díky technologiím vysoce citlivého sekvenování, analýza ctDNA z tekutých biopsií nachází uplatnění čím dál více u mnoha typů nádorových onemocnění (Devereaux et al., 2022).

Dále našla cfDNA uplatnění především v rámci neinvazivního prenatalního testování (NIPT), které je bezpečnější oproti invazivní amniocentéze. Toto genetické testování ještě nenarozeného plodu je umožněno díky volné cirkulující fetální DNA (cffDNA) cirkulující v krvi těhotných žen. V případě placentárního mozaicismu nemusí být však analýza shodná s DNA plodu (Putzová et al., 2017).

Předkládaná práce měla za cíl poskytnout komplexní přehled o cfDNA a jejím diagnostickém potenciálu. S rozvojem technologií a zdokonalením analytických postupů lze očekávat, že cfDNA bude v budoucnosti hrát stále důležitější roli v diagnostice nádorových onemocnění a přispěje k posunu v oblasti onkologické péče.

SEZNAM LITERATURY

ABOLHASSANI, M.; TILLOTSON, J.K. a CHIAO, J.W., 1994. Characterization of the realese of DNA by a human leukemia-cell line HL-60. online. *International Journal of Oncology*. roč. 4, č. 2, s. 417-421. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ijo.4.2.417>. [cit. 2024-01-25].

ALBERTS, Bruce, 2008. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4105-5.

ALIX-PANABIÈRES, Catherin a PANTEL, Klaus, 2021. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. online. *Cancer Discovery*. roč. 11, č. 4, s. 858-873. ISSN 2159-8274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>. [cit. 2023-07-25].

ALIX-PANABIÈRES, Catherin; SCHWARZENBACH, Heidi a PANTEL, Klaus, 2011. Circulating Tumor Cells and Tumor DNA. online. In: <https://www.annualreviews.org/>. Dostupné z: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-med-062310-094219>. [cit. 2024-01-27].

ALLEGRA, Alessandro; CANCEMI, Gabriella; MIRABILE, Giuseppe; TONACCI, Alessandro; MUSOLINO, Caterina et al., 2022. Circulating Tumour Cells, Cell Free DNA and Tumour-Educated Platelets as Reliable Prognostic and Management Biomarkers for the Liquid Biopsy in Multiple Myeloma. online. *Cancers*. roč. 14, č. 17. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers14174136>. [cit. 2023-09-17].

AUCAMP, Janine; BRONKHORST, Abel; BADENHORST, Christoffel a PRETORIUS, Piet, 2018. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. online. *Biological Reviews*. roč. 93, č. 3, s. 1649-1683. ISSN 14647931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/brv.12413>. [cit. 2023-07-27].

BAZZAN, Erica; TINÈ, Mariaenrica; CASARA, Alvise; BIONDINI, Davide; SEMENZATO, Umberto et al., 2021. Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. online. *International Journal of Molecular Sciences*. roč. 22, č. 12. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22126417>. [cit. 2023-07-29].

BEST, Myron G.; SOL, Nik; KOOL, Irsan; TANNOUS, Jihane; WESTERMAN, Bart A. et al., 2015. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. online. *Cancer Cell*. roč. 28, č. 5, s. 666-676. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.018>. [cit. 2023-09-11].

BETTEGOWDA, Chetan; SAUSEN, Mark; LEARY, Rebecca; KINDE, Isaac; WANG, Yuxuan et al., 2014. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. online. *Science Translational Medicine*. roč. 6, č. 224. ISSN 1946-6234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>. [cit. 2023-07-31].

BOHERS, E.; VIAILLY, P.; DUBOIS, S.; BERTRAND, P.; MAINGONNAT, C. et al., 2015. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. online. *Haematologica*. roč. 100, č. 7, s. 280-284. ISSN 0390-6078. Dostupné z: <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.123612>. [cit. 2023-09-18].

BRISUDA, Antonin; PAZOURKOVÁ, Eva; SOUKUP, Viktor; HORINEK, Aleš; HRBÁČEK, Jan et al., 2016. Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer. online. *Urologia Internationalis*. roč. 96, č. 1, s. 25-31. ISSN 0042-1138. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000438828>. [cit. 2023-09-14].

CAMUZI ZOVICO, P; GASPARINI NETO, V; VENÂNCIO, F; SOARES MIGUEL, G; GRAÇA PEDROSA, R et al., 2020. Cell-Free DNA as an Obesity Biomarker. online. *Physiological Research*. s. 515-520. ISSN 1802-9973. Dostupné z: <https://doi.org/10.33549/physiolres.934242>. [cit. 2023-08-03].

CARNINO, Jonathan; LEE, Heedoo a JIN, Yang, 2019. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. online. *Respiratory Research*. roč. 20, č. 1. ISSN 1465-993X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1210-z>. [cit. 2023-07-29].

COCUCCI, Emanuele; RACCHETTI, Gabriella a MELDOLESI, Jacopo, 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. online. *Trends in Cell Biology*. roč. 19, č. 2, s. 43-51. ISSN 09628924. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>. [cit. 2023-07-30].

COLMENARES, Rafael; ÁLVAREZ, Noemí; BARRIO, Santiago; MARTÍNEZ-LÓPEZ, Joaquín a AYALA, Rosa, 2022. The Minimal Residual Disease Using Liquid Biopsies in Hematological Malignancies. online. *Cancers*. roč. 14, č. 5. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers14051310>. [cit. 2023-09-17].

ČAPKOVÁ, Linda; KALINOVÁ, Markéta; TICHÁ, Ivana; PAROBKOVÁ, Eva; MATĚJČKOVÁ, Milada et al., 2018. Detection of EGFR Mutations in Circulating Tumor DNA (ctDNA) Retrieved from Plasma – Interlaboratory Quality Assessment in the Czech Republic. online. *Klinická onkologie*. roč. 31, č. 5. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2018353>. [cit. 2023-09-12].

DEVEREAUX, Kelly; SOUERS, Rhona; MERKER, Jason; LINDEMAN, Neal; GRAHAM, Rondell et al., 2022. Clinical Testing for Tumor Cell-Free DNA: College of American Pathologists Proficiency Programs Reveal Practice Trends. online. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. roč. 147, č. 4, s. 425-433. ISSN 1543-2165. Dostupné z: <https://doi.org/10.5858/arpa.2021-0585-CP>. [cit. 2024-02-01].

DIEHL, Frank; LI, Meng; DRESSMAN, Devin; HE, Yiping; SHEN, Dong et al., 2005. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 102, č. 45, s. 16368-16373. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0507904102>. [cit. 2023-09-11].

DIEHL, Frank; SCHMIDT, Kerstin; CHOTI, Michael; ROMANS, Katharine; GOODMAN, Steven et al., 2008. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. online. *Nature Medicine*. roč. 14, č. 9, s. 985-990. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nm.1789>. [cit. 2023-09-09].

ELAZEZY, Maha a JOOSSE, Simon, 2018. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. online. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. roč. 16, s. 370-378. ISSN 20010370. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.10.002>. [cit. 2023-09-11].

ERMAKOV, Aleksei; KONKOVA, Marina; KOSTYUK, Svetlana; IZEVSKAYA, Vera; BARANOVA, Ancha et al., 2013. Oxidized Extracellular DNA as a Stress Signal in Human Cells. online. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. roč. 2013, s. 1-12. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/649747>. [cit. 2023-08-03].

FAN, H.; BLUMENFELD, Yair; CHITKARA, Usha; HUDGINS, Louanne a QUAKE, Stephen, 2008. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 105, č. 42, s. 16266-16271. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0808319105>. [cit. 2023-09-11].

FLEISCHHACKER, M. a SCHMIDT, B., 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. roč. 1775, č. 1, s. 181-232. ISSN 0304419X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.10.001>. [cit. 2023-07-25].

FRICKHOFEN, N.; MÜLLER, E.; SANDHERR, M.; BINDER, T.; BANGERTER, M. et al., 1997. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood*. roč. 90, č. 12, s. 4953-4960. ISSN 0006-4971.

GAHAN, Peter; SCHWARZENBACH, Heidi a ANKER, Philippe, 2022. The History and Future of Basic and Translational Cell-Free DNA Research at a Glance. online. *Diagnostics*. roč. 12, č. 5. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12051192>. [cit. 2023-07-25].

GAI, Wanxia; ZHOU, Ze; AGBOR-ENOH, Sean; FAN, Xiaodan; LIAN, Sheng et al., 2021. Applications of genetic-epigenetic tissue mapping for plasma DNA in prenatal testing, transplantation and oncology. online. *ELife*. roč. 10. ISSN 2050-084X. Dostupné z: <https://doi.org/10.7554/eLife.64356>. [cit. 2024-01-28].

GAO, Yu-Jie; HE, Yu-Juan; YANG, Zai-Lin; SHAO, Hui-Yuan; ZUO, Yan et al., 2010. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. online. *Cclm*. roč. 48, č. 11, s. 1651-1656. ISSN 1437-4331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.311>. [cit. 2023-09-15].

GRABUSCHNIG, Stefan; BRONKHORST, Abel; HOLDENRIEDER, Stefan; ROSALES RODRIGUEZ, Ingund; SCHLIEP, Klaus et al., 2020. Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. online. *International Journal of Molecular Sciences*. roč. 21, č. 21. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21218062>. [cit. 2023-07-26].

GYÖRGY, Bence; SZABÓ, Tamás; PÁSZTÓI, Mária; PÁL, Zsuzsanna; MISJÁK, Petra et al., 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. online. *Cellular and Molecular Life Sciences*. roč. 68, č. 16, s. 2667-2688. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>. [cit. 2024-01-27].

HAAN, David; BERGAMASCHI, Anna; FRIEDL, Verena; GULER, Gulfem; NING, Yuhong et al., 2023. Epigenomic Blood-Based Early Detection of Pancreatic Cancer Employing Cell-Free DNA. online. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. roč. 21, č. 7, s. 1802-18096. ISSN 15423565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.03.016>. [cit. 2023-09-13].

HANSON, Britt; SCOTCHMAN, Elizabeth; CHITTY, Lyn a CHANDLER, Natalie, 2022. Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD): how analysis of cell-free DNA in maternal plasma has changed prenatal diagnosis for monogenic disorders. online. *Clinical Science*. roč. 136, č. 22, s. 1615-1629. ISSN 0143-5221. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/CS20210380>. [cit. 2023-08-03].

HAO, T.; SHI, W.; SHEN, X.; QI, J.; WU, X. et al., 2014. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. online. *British Journal of Cancer*. roč. 111, č. 8, s. 1482-1489. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.470>. [cit. 2023-09-12].

HEITZER, Ellen; PERAKIS, Samantha; GEIGL, Jochen a SPEICHER, Michael, 2017. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. online. *Npj Precision Oncology*. roč. 1, č. 1. ISSN 2397-768X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0039-5>. [cit. 2023-09-11].

HILL, Melissa; LEWIS, Celine; JENKINS, Lucy; ALLEN, Stephanie; ELLES, Rob et al., 2012. Implementing noninvasive prenatal fetal sex determination using cell-free fetal DNA in the United Kingdom. online. *Expert Opinion on Biological Therapy*. roč. 12, č. 1, s. 119-126. ISSN 1471-2598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.666522>. [cit. 2023-08-03].

HUANG, Yin; LIU, Keli; LI, Qing; YAO, Yikun a WANG, Ying, 2018. Exosomes Function in Tumor Immune Microenvironment. online. In: METTINGER, Karl L.; RAMESHWAR, Pranela a KUMAR, Vinod (ed.); METTINGER, Karl; RAMESHWAR, Pranela; KUMAR, Vinod. *Exosomes, Stem Cells and MicroRNA*. Advances in Experimental Medicine and

Biology. Cham: Springer International Publishing, s. 109-122. ISBN 978-3-319-74469-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-74470-4_7. [cit. 2023-07-28].

HUMMEL, E.; HESSAS, E.; MÜLLER, S.; BEITER, T.; FISCH, M. et al., 2018. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. online. *Translational Psychiatry*. roč. 8, č. 1. ISSN 2158-3188. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0264-x>. [cit. 2023-07-31].

HU, Zhe-Yu; XIE, Ning; TIAN, Can; YANG, Xiaohong; LIU, Liping et al., 2018. Identifying Circulating Tumor DNA Mutation Profiles in Metastatic Breast Cancer Patients with Multiline Resistance. online. *EBioMedicine*. roč. 32, s. 111-118. ISSN 23523964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.05.015>. [cit. 2023-09-13].

CHANG, Yi; TOLANI, Bhairavi; NIE, Xiuhong; ZHI, Xiuyi; HU, Mu et al., 2017. Review of the clinical applications and technological advances of circulating tumor DNA in cancer monitoring. online. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. roč. 13, s. 1363-1374. ISSN 1178-203X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/TCRM.S141991>. [cit. 2023-09-12].

CHAUDHURI, Aadel; CHABON, Jacob; LOVEJOY, Alexander; NEWMAN, Aaron; STEHR, Henning et al., 2017. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. online. *Cancer Discovery*. roč. 7, č. 12, s. 1394-1403. ISSN 2159-8274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0716>. [cit. 2023-09-18].

CHEN, Emmalyn; CARIO, Clinton; LEONG, Lancelote; LOPEZ, Karen; MÁRQUEZ, César et al., 2021. Cell-free DNA concentration and fragment size as a biomarker for prostate cancer. online. *Scientific Reports*. roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84507-z>. [cit. 2023-09-13].

CHEN, Meijuan; HU, Cheng; JIANG, Rilei; GUO, Yuanyuan; WU, Mianhua et al., 2018. Exosome-related tumor microenvironment. online. *Journal of Cancer*. roč. 9, č. 17, s. 3084-3092. ISSN 1837-9664. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/jca.26422>. [cit. 2023-07-28].

CHEN, Xiaomin; WANG, Lin a LOU, Jiatao, 2020. Nanotechnology Strategies for the Analysis of Circulating Tumor DNA: A Review. online. *Medical Science Monitor*. roč. 26. ISSN 1643-3750. Dostupné z: <https://doi.org/10.12659/MSM.921040>. [cit. 2023-09-11].

CHEREPANOVA, Anna; TAMKOVICH, Svetlana; BRYZGUNOVA, Olga; VLASSOV, Valentin a LAKTIONOV, Pavel, 2008. Deoxyribonuclease Activity and Circulating DNA Concentration in Blood Plasma of Patients with Prostate Tumors. online. *Annals of the New York Academy of Sciences*. roč. 1137, č. 1, s. 218-221. ISSN 0077-8923. Dostupné z: <https://doi.org/10.1196/annals.1448.016>. [cit. 2024-01-25].

CHITTY, Lyn; HUDGINS, Louanne a NORTON, Mary, 2018. Current controversies in prenatal diagnosis 2: Cell-free DNA prenatal screening should be used to identify all chromosome abnormalities. online. *Prenatal Diagnosis*. roč. 38, č. 3, s. 160-165. ISSN 01973851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pd.5216>. [cit. 2023-08-03].

CHIU, R.W.; CHAN, K.C. a GAO, Y., 2008. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosome aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 105, č. 51, s. 20458-20463. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810641105>. [cit. 2024-02-01].

CHOI, J.J.; REICH, C. a PISETSKY, D., 2004. Release of DNA from Dead and Dying Lymphocyte and Monocyte Cell Lines In Vitro. online. *Scandinavian Journal of Immunology*. roč. 60, č. 1-2, s. 159-166. ISSN 0300-9475. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01470.x>. [cit. 2023-07-27].

IBRAHIM, Nurul Khalida; ERAKY, Ahmed; EGGERS, Jan; STEIERT, Tim Alexander; SEBENS, Susanne et al., 2022. Detection of Cancer Mutations by Urine Liquid Biopsy as a Potential Tool in the Clinical Management of Bladder Cancer Patients. online. *Cancers*. roč. 14, č. 4. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers14040969>. [cit. 2023-12-12].

ILIÉ, Marius a HOFMAN, Paul, 2016. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy?. online. *Translational Lung Cancer Research*. roč. 5, č. 4, s. 420-423. ISSN 22186751. Dostupné z: <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.08.06>. [cit. 2023-07-30].

ILKHANI, Khandan; BASTAMI, Milad; DELGIR, Soheila; SAFI, Asma; TALEBIAN, Shahrzad et al., 2020. The Engaged Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metabolism: Focusing on Cancer-Associated Fibroblast and Exosome Mediators. online. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. roč. 21, č. 2, s. 254-266. ISSN 18715206. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1871520620666200910123428>. [cit. 2023-07-28].

JAMSHIDI, Arash; LIU, Minetta; KLEIN, Eric; VENN, Oliver; HUBBELL, Earl et al., 2022. Evaluation of cell-free DNA approaches for multi-cancer early detection. online. *Cancer Cell*. roč. 40, č. 12, s. 1537-1549. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.10.022>. [cit. 2024-02-01].

KAHLERT, Christoph a KALLURI, Raghu, 2013. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. online. *Journal of Molecular Medicine*. roč. 91, č. 4, s. 431-437. ISSN 0946-2716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1020-6>. [cit. 2023-07-30].

KARAGLANI, Makrina; PANAGOPOULOU, Maria; CHEIMONIDI, Christina; TSAMARDINOS, Ioannis; MALTEZOS, Efstratios et al., 2022. Liquid Biopsy in Type 2 Diabetes Mellitus Management: Building Specific Biosignatures via Machine Learning. online. *Journal of Clinical Medicine*. roč. 11, č. 4. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm11041045>. [cit. 2023-08-03].

KOGUCHI, Dai; MATSUMOTO, Kazumasa; SHIBA, Izuru; HARANO, Takahiro; OKUDA, Satoshi et al., 2022. Diagnostic Potential of Circulating Tumor Cells, Urinary MicroRNA, and Urinary Cell-Free DNA for Bladder Cancer: A Review. online. *International Journal of Molecular Sciences*. roč. 23, č. 16. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23169148>. [cit. 2023-09-14].

KONG, Peng; WANG, Wei; MA, Ge; LI, Li; ZHU, Jin et al., 2017. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. online. *Oncotarget*. roč. 8, č. 26, s. 43180-43191. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17858>. [cit. 2023-07-25].

KUBACZKOVÁ, Veronika; SEDLAŘÍKOVÁ, Lenka; BEŠŠE, Lenka; ALMÁŠI, Martina; HÁJEK, Roman et al., 2015. Potential of Cell-free Circulating DNA in Diagnosis of Cancer. online. *Klinická onkologie*. roč. 28, č. 4, s. 251-259. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2015251>. [cit. 2023-08-03].

KUBACZKOVÁ, Veronika; VRÁBEL, David; SEDLAŘÍKOVÁ, Lenka; BESSE, Lenka a ŠEVČÍKOVÁ, Sabina, 2017. Cell-free DNA - Minimally invasive marker of hematological malignancies. online. *European Journal of Haematology*. roč. 99, č. 4, s. 291-299. ISSN 09024441. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ejh.12925>. [cit. 2023-09-15].

KUSTANOVICH, Anatoli; SCHWARTZ, Ruth; PERETZ, Tamar a GRINSHPUN, Albert, 2019. Life and death of circulating cell-free DNA. online. *Cancer Biology & Therapy*. roč. 20, č. 8, s. 1057-1067. ISSN 1538-4047. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>. [cit. 2023-07-25].

LAM, Vincent; ZHANG, Jianjun; WU, Carol; TRAN, Hai; LI, Lerong et al., 2021. Genotype-Specific Differences in Circulating Tumor DNA Levels in Advanced NSCLC. online. *Journal of Thoracic Oncology*. roč. 16, č. 4, s. 601-609. ISSN 15560864. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.12.011>. [cit. 2023-07-31].

LAULAGNIER, K.; VINCENT-SCHNEIDER, H.; HAMDI, S.; SUBRA, C.; LANKAR, D. et al., 2005. Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. online. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. roč. 35, č. 2, s. 116-121. ISSN 10799796. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.05.010>. [cit. 2023-07-30].

LAURING, Josh a PARK, Ben, 2011. BEAMing Sheds Light on Drug Resistance. online. *Clinical Cancer Research*. roč. 17, č. 24, s. 7508-7510. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2556>. [cit. 2023-09-11].

LEON, S.A.; SHAPIRO, B.; SKLAROFF, D.M. a YAROS, M.J., 1977. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. online. *Cancer Research*. 37, 3. roč. 37, č. 3, s. 646-650. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:18476423>. [cit. 2023-08-03].

LEON, S.; SHAPIRO, B.; SKLAROFF, D.M. a YAROS, M.J., 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*. roč. 37, č. 3, s. 646-650. ISSN 0008-5472.

LIM, Jun; KUSS, Bryone a TALAULIKAR, Dipti, 2021. Role of cell-free DNA in haematological malignancies. online. *Pathology*. roč. 53, č. 3, s. 416-426. ISSN 00313025. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.01.004>. [cit. 2023-09-18].

LIU, Binliang; HU, Zheyu; RAN, Jialu; XIE, Ning; TIAN, Can et al., 2022. The circulating tumor DNA (ctDNA) alteration level predicts therapeutic response in metastatic breast cancer: Novel prognostic indexes based on ctDNA. online. *The Breast*. roč. 65, s. 116-123. ISSN 09609776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.07.010>. [cit. 2023-09-12].

LI, Xiaofei; WU, Yuhua; ZHANG, Li; CAO, Yinglong; LI, Yunjing et al., 2014. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. online. *Analytical Biochemistry*. roč. 451, s. 18-24. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.01.016>. [cit. 2023-11-30].

LONG, Xiaolu; XU, Qian; LOU, Yaoyao; LI, Chunrui; GU, Jia et al., 2019. The Utility of Non-Invasive Liquid Biopsy for Mutational Analysis and Minimal Residual Disease Assessment in Extramedullary Multiple Myeloma. online. *SSRN Electronic Journal*. ISSN 1556-5068. Dostupné z: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3439544>. [cit. 2023-09-17].

LO, Y.; CORBETTA, Noemi; CHAMBERLAIN, Paul; RAI, Vik; SARGENT, Ian et al., 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. online. *The Lancet*. roč. 350, č. 9076, s. 485-487. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0). [cit. 2023-07-25].

LO, Y.; ZHANG, Jun; LEUNG, Tse; LAU, Tze; CHANG, Allan et al., 1999. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. online. *The American Journal of Human Genetics*. roč. 64, č. 1, s. 218-224. ISSN 00029297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/302205>. [cit. 2023-08-03].

LUDWIG, Joseph a WEINSTEIN, John, 2005. Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection. online. *Nature Reviews Cancer*. roč. 5, č. 11, s. 845-856. ISSN 1474-175X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrc1739>. [cit. 2023-09-12].

LUO, Jie; SHEN, Li a ZHENG, Di, 2014. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. online. *Scientific Reports*. roč. 4, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep06269>. [cit. 2023-09-12].

MANDEL, P. a METAIS, P., 1948. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*. roč. 142, č. 3-4, s. 241-243. ISSN 0037-9026.

MOULIERE, Florent; ROBERT, Bruno; ARNAU PEYROTTE, Erika; DEL RIO, Maguy; YCHOU, Marc et al., 2011. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. online. *PLoS ONE*. roč. 6, č. 9. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023418>. [cit. 2023-08-04].

OBERHOFER, Angela; BRONKHORST, Abel; UHLIG, Carsten; UNGERER, Vida a HOLDENRIEDER, Stefan, 2022. Tracing the Origin of Cell-Free DNA Molecules through Tissue-Specific Epigenetic Signatures. online. *Diagnostics*. roč. 12, č. 8. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12081834>. [cit. 2024-01-28].

ORRENIUS, S, 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. online. *Toxicology Letters*. roč. 149, č. 1-3, s. 19-23. ISSN 03784274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.017>. [cit. 2024-01-25].

PARIKH, Aparna; VAN SEVENTER, Emily; SIRAVEGNA, Giulia; HARTWIG, Anna; JAIMOVICH, Ariel et al., 2021. Minimal Residual Disease Detection using a Plasma-only Circulating Tumor DNA Assay in Patients with Colorectal Cancer. online. *Clinical Cancer Research*. roč. 27, č. 20, s. 5586-5594. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0410>. [cit. 2023-09-09].

PESSOA, Luciana; HERINGER, Manoela a FERRER, Valéria, 2020. CtDNA as a cancer biomarker: A broad overview. online. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. roč. 155. ISSN 10408428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103109>. [cit. 2023-07-31].

POLINA, Iuliia; ILATOVSKAYA, Daria a DELEON-PENNELL, Kristine, 2020. Cell free DNA as a diagnostic and prognostic marker for cardiovascular diseases. online. *Clinica Chimica Acta*. roč. 503, s. 145-150. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.01.013>. [cit. 2023-08-03].

POSPICHALOVA, Vendula; SVOBODA, Jan; DAVE, Zankruti; KOTRBOVA, Anna; KAISER, Karol et al., 2015. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. online. *Journal of Extracellular Vesicles*. roč. 4, č. 1. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.25530>. [cit. 2023-07-30].

PUTZOVÁ, M.; HASCH, M.; GOMOLČÁKOVÁ, B.; ŠUBRT, I. a MICHAL, M., 2017. Výhody využití cíleného sekvenování v neinvazivním prenatálním testování. *Actual Gyn*. roč. 9, s. 10-13. ISSN 1803-9588.

ROTH, Stefan; WERNSDORF, Saskia a LIESZ, Arthur, 2023. The role of circulating cell-free DNA as an inflammatory mediator after stroke. online. *Seminars in Immunopathology*.

roč. 45, č. 3, s. 411-425. ISSN 1863-2297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00281-023-00993-5>. [cit. 2023-08-03].

SALVI, Samanta; GURIOLI, Giorgia; DE GIORGI, Ugo; CONTEDEUCA, Vincenza; TEDALDI, Gianluca et al., 2016. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. online. *OncoTargets and Therapy*. roč. 9, s. 6549-6559. ISSN 1178-6930. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/OTT.S100901>. [cit. 2023-07-25].

SÁNCHEZ-HERRERO, Estela; SERNA-BLASCO, Roberto; ROBADO DE LOPE, Lucia; GONZÁLEZ-RUMAYOR, Víctor; ROMERO, Atocha et al., 2022. Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: An Overview of Biological Features and Factors That may Impact on ctDNA Analysis. online. *Frontiers in Oncology*. roč. 12. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.943253>. [cit. 2023-07-31].

SCILLA, Katherine a ROLFO, Christian, 2019. The Role of Circulating Tumor DNA in Lung Cancer: Mutational Analysis, Diagnosis, and Surveillance Now and into the Future. online. *Current Treatment Options in Oncology*. roč. 20, č. 7. ISSN 1527-2729. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0653-2>. [cit. 2023-09-11].

SHORT, Nicholas; PATEL, Keyur; ALBITAR, Maher; FRANQUIZ, Miguel; LUTHRA, Rajyalakshmi et al., 2020. Targeted next-generation sequencing of circulating cell-free DNA vs bone marrow in patients with acute myeloid leukemia. online. *Blood Advances*. roč. 4, č. 8, s. 1670-1677. ISSN 2473-9529. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001156>. [cit. 2023-09-14].

SCHMIDT, Maria; SAAD, Mário a DUNCAN, Bruce, 2005. Subclinical inflammation and obesity, diabetes and related disorders. online. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. roč. 2, č. 3, s. 307-312. ISSN 17406765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2005.08.003>. [cit. 2023-08-03].

SCHWARZ, Arne; STANULLA, Martin; CARIO, Gunnar; FLOHR, Thomas; SUTTON, Rosemary et al., 2009. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. online. *Annals of Hematology*. roč. 88, č. 9, s. 897-905. ISSN 0939-5555. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0698-6>. [cit. 2023-09-15].

SCHWARZENBACH, Heidi, 2013. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. online. *Breast Cancer Research*. roč. 15, č. 5. ISSN 1465-542X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/bcr3446>. [cit. 2023-07-31].

SCHWARZENBACH, Heidi; HOON, Dave a PANTEL, Klaus, 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. online. *Nature Reviews Cancer*. roč. 11, č. 6, s. 426-437. ISSN 1474-175X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrc3066>. [cit. 2023-07-31].

SMITH, Zachary; LEE, Changwon; ROJALIN, Tatu; CARNEY, Randy; HAZARI, Sidhartha et al., 2015. Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content. online. *Journal of Extracellular Vesicles*. roč. 4, č. 1. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28533>. [cit. 2023-07-30].

SNUSTAD, D. Peter a SIMMONS, Michael J., 2011. *Principles of Genetics*. 6th ed. Minnesota: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-470-90359-9.

SNUSTAD, D. a SIMMONS, Michael, 2015. *Principles of Genetics*. 7th edition. Minnesota: John Wiley & Sons Inc. ISBN 1119142288.

SOAVE, Armin; RIETHDORF, Sabine; DAHLEM, Roland; VON AMSBERG, Gunhild; MINNER, Sarah et al., 2017. A nonrandomized, prospective, clinical study on the impact of circulating tumor cells on outcomes of urothelial carcinoma of the bladder patients treated with radical cystectomy with or without adjuvant chemotherapy. online. *International Journal of Cancer*. roč. 140, č. 2, s. 381-389. ISSN 00207136. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ijc.30445>. [cit. 2023-09-14].

STROUN, M.; LYAUTEY, J.; LEDERREY, C.; OLSON-SAND, A. a ANKER, P., 2001. About the possible origin and mechanism of circulating DNA. online. *Clinica Chimica Acta*. roč. 313, č. 1-2, s. 139-142. ISSN 00098981. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00665-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00665-9). [cit. 2023-07-28].

STROUN, Maurice; ANKER, Philippe; LYAUTEY, Jacqueline; LEDERREY, Christine a MAURICE, Pierre, 1987. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. online. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. roč. 23, č. 6, s. 707-712. ISSN 02775379. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(87\)90266-5](https://doi.org/10.1016/0277-5379(87)90266-5). [cit. 2024-01-27].

SUZUKI, Nobuyasu; KAMATAKI, Akihisa; YAMAKI, Junko a HOMMA, Yoshimi, 2008. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. online. *Clinica Chimica Acta*. roč. 387, č. 1-2, s. 55-58. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.09.001>. [cit. 2023-07-27].

SWARUP, Vishnu a RAJESWARI, M.R., 2007. Circulating (cell-free) nucleic acids - A promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. online. *FEBS Letters*. roč. 581, č. 5, s. 795-799. ISSN 00145793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.051>. [cit. 2023-07-31].

SYNTICHAKI, Popi a TAVERNARAKIS, Nektarios, 2002. Death by necrosis. online. *EMBO reports*. roč. 3, č. 7, s. 604-609. ISSN 1469-221X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvfl38>. [cit. 2023-07-27].

SZPECHCINSKI, Adam; CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, Joanna; KUPIS, Włodzimierz; MASZKOWSKA-KOPIJ, Krystyna; DANCEWICZ, Maciej et al., 2012. Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. online. *Expert Opinion on Biological Therapy*. roč. 12, č. 1, s. 3-9. ISSN 1471-2598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.668519>. [cit. 2023-09-09].

TAMKOVICH, S.; CHEREPANOVA, A.; KOLESNIKOVA, E.; RYKOVA, E.; PYSHNYI, D. et al., 2006. Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood. online. *Annals of the New York Academy of Sciences*. roč. 1075, č. 1, s. 191-196. ISSN 0077-8923. Dostupné z: <https://doi.org/10.1196/annals.1368.026>. [cit. 2023-07-25].

TAN, E.; SCHUR, P.; CARR, R. a KUNKEL, H., 1966. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. online. *Journal of Clinical Investigation*. roč. 45, č. 11, s. 1732-1740. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI105479>. [cit. 2023-07-25].

THÉRY, Clotilde, 2011. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. online. *F1000 Biology Reports*. roč. 3. ISSN 1757594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3410/B3-15>. [cit. 2023-07-30].

THIERRY, A.; EL MESSAOUDI, S.; GAHAN, P.; ANKER, P. a STROUN, M., 2016. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. online. *Cancer and*

Metastasis Reviews. roč. 35, č. 3, s. 347-376. ISSN 0167-7659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>. [cit. 2023-07-26].

TIVEY, Ann; CHURCH, Matt; ROTHWELL, Dominic; DIVE, Caroline a COOK, Natalie, 2022. Circulating tumour DNA — looking beyond the blood. online. *Nature Reviews Clinical Oncology*. roč. 19, č. 9, s. 600-612. ISSN 1759-4774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00660-y>. [cit. 2023-07-31].

VAN DER VAART, Maniesh a PRETORIUS, Piet, 2008. Circulating DNA. online. *Annals of the New York Academy of Sciences*. roč. 1137, č. 1, s. 18-26. ISSN 00778923. Dostupné z: <https://doi.org/10.1196/annals.1448.022>. [cit. 2023-07-27].

VAUX, D. a STRASSER, A., 1996. The molecular biology of apoptosis. online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 93, č. 6, s. 2239-2244. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2239>. [cit. 2023-07-27].

VIORRITTO, Irene; NIKOLOV, Nikolay a SIEGEL, Richard, 2007. Autoimmunity versus tolerance: Can dying cells tip the balance?. online. *Clinical Immunology*. roč. 122, č. 2, s. 125-134. ISSN 15216616. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.07.012>. [cit. 2023-09-05].

VRÁBEL, David; SEDLAŘÍKOVÁ, Lenka; BESSE, Lenka; ŘÍHOVÁ, Lucie; BEZDĚKOVÁ, Renata et al., 2020. Dynamics of tumor-specific cfDNA in response to therapy in multiple myeloma patients. online. *European Journal of Haematology*. roč. 104, č. 3, s. 190-197. ISSN 0902-4441. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ejh.13358>. [cit. 2023-09-17].

WEISBERG, Stuart; MCCANN, Daniel; DESAI, Manisha; ROSENBAUM, Michael; LEIBEL, Rudolph et al., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. online. *Journal of Clinical Investigation*. roč. 112, č. 12, s. 1796-1808. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI19246>. [cit. 2023-08-03].

WILLIAMS, P. Mickey; FORBES, Thomas; P. LUND, Steven; COLE, Kenneth D.; HE, Hua-Jun et al., 2021. Validation of ctDNA Quality Control Materials Through a Precompetitive Collaboration of the Foundation for the National Institutes of Health. online. *JCO Precision Oncology*. č. 5, s. 910-920. ISSN 2473-4284. Dostupné z: <https://doi.org/10.1200/PO.20.00528>. [cit. 2023-12-12].

YANG, Yong; JIANG, Gening; ZHANG, Peng a FAN, Jie, 2015. Programmed cell death and its role in inflammation. online. *Military Medical Research*. roč. 2, č. 1. ISSN 2054-9369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0039-0>. [cit. 2023-07-27].

YEH, Paul; HUNTER, Tane; SINHA, Devbarna; FTOUNI, Sarah; WALLACH, Elise et al., 2017. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. online. *Nature Communications*. roč. 8, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ncomms14756>. [cit. 2023-09-17].

ZEMMOUR, Hai; PLANER, David; MAGENHEIM, Judith; MOSS, Joshua; NEIMAN, Daniel et al., 2018. Non-invasive detection of human cardiomyocyte death using methylation patterns of circulating DNA. online. *Nature Communications*. roč. 9, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03961-y>. [cit. 2023-08-03].

ZHANG, Bin; NIU, Xueliang; ZHANG, Qiang; WANG, Chunli; LIU, Bo et al., 2019. Circulating tumor DNA detection is correlated to histologic types in patients with early-stage non-small-cell lung cancer. online. *Lung Cancer*. roč. 134, s. 108-116. ISSN 01695002. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.05.034>. [cit. 2023-08-04].

ZHONG, Xiao Yan; HAHN, Sinuhe; KIEFER, Vivian a HOLZGREVE, Wolfgang, 2006. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations?. online. *Annals of Hematology*. roč. 86, č. 2, s. 139-143. ISSN 0939-5555. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00277-006-0182-5>. [cit. 2023-12-12].

ZHOU, Weiyang; FONG, Miranda Y.; MIN, Yongfen; SOMLO, George; LIU, Liang et al., 2014. Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. online. *Cancer Cell*. roč. 25, č. 4, s. 501-515. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.007>. [cit. 2023-09-11].

ZILL, Oliver; BANKS, Kimberly; FAIRCLOUGH, Stephen; MORTIMER, Stefanie; VOWLES, James et al., 2018. The Landscape of Actionable Genomic Alterations in Cell-Free Circulating Tumor DNA from 21,807 Advanced Cancer Patients. online. *Clinical Cancer Research*. roč. 24, č. 15, s. 3528-3538. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3837>. [cit. 2023-07-31].

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Žádost o poskytnutí informací v souvislosti s vypracováním bakalářské práce ve FN Plzeň



Vážená pani

Andrea Fenderlová

Studentka oboru *Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví*

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF Fakultní nemocnice Plzeň **uděluji souhlas** se získáváním / zpracováním informací o laboratorních metodách / analýzách / výsledcích, používaných na pracovišti *Hematologicko-onkologického oddělení (HOO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Volná cirkulující DNA v laboratorní diagnostice*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní sestra HOO souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být zcela anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe na HOO a **pod přímým vedením** oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **pan Klieber Robin, Mgr., odborný pracovník v laboratorních metodách HOO FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů **poskytnete** zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

Manažerka pro vzdělávání nelékařů

Útvar náměstkyně pro vnější vztahy a spolupráci s LF

Fakultní nemocnice Plzeň

Edvarda Beneše 1128/13, 301 00 Plzeň

Tel: 377 401 003

E-mail: chabrovas@fnplzen.cz

13. 9. 2023