

šetření biomarkerů v moči (4). Tyto eseje využívají různých technik – ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), FISH (Fluorescence in situ hybridization) nebo monoklonálních protilátek. Jedná se např. o proteiny jaderné matrix NMP22 (nuclear matrix proteins), což jsou non-chromatinové struktury, které se uplatňují v replikaci DNA a genové expresi, regulují distribuci chromatinu do dceřiných buněk a jejich hladiny jsou za normálních okolností velmi nízké. U urotelových nádorů byla prokázána zvýšená hladina NMP22 (4). Dále jsou to metody zaměřené na detekci faktoru H, který je důležitý v procesu aktivace komplementu. Velice podobný protein H produkují i buňky karcinomu močového měchýře. K jeho detekci se využívají tzv. BTA eseje (Bladder tumour antigen assays) (4). Dále jmenujme ještě UroVysion k detekci přítomnosti aneuploidie chromozomu 3, 7 a 17 a ztrátě genu p16 v lokusu 9p21 nebo Immunocyt/Ucyc +Test, který stanovuje pomocí monoklonálních protilátek karcinoembryonální antigen (CEA) a sulfátované mucinové glykoproteiny z exfoliováných buněk nádoru močového měchýře (4).

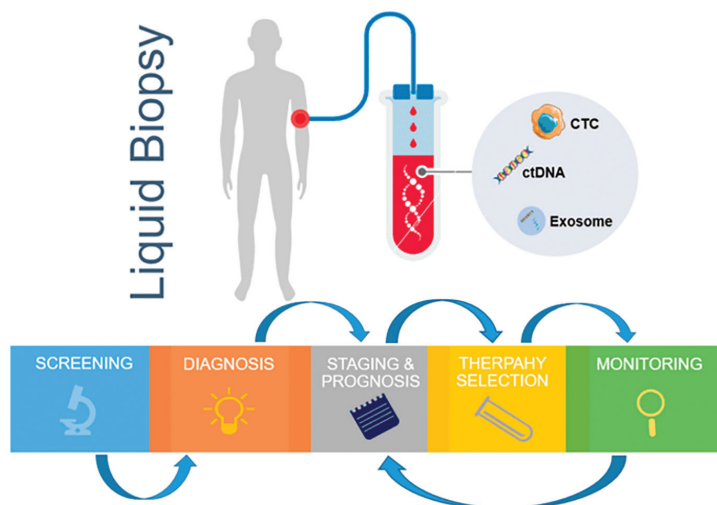
V rámci tekuté biopsie lze stanovit několik markerů. Jedná se o izolaci volné cirkulující nádorové DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) a mikroRNA (miRNA), cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells, CTC) a exozomální mRNA.

Tekutá biopsie umožňuje detekovat nádorové biomarkery ve snadno dostupných tělních tekutinách. Své využití by mohla najít ve screeningu nádorových onemocnění, diagnostice, monitorování odpovědi na léčbu, stanovení prognostických markerů i včasné detekci relapsu (5).

Cirkulující nádorové buňky (CTC)

Cirkulující nádorové buňky představují buňky, které se uvolnily z primárního nádoru nebo metastázy do krevního oběhu. Aby tyto buňky byly schopné přežít v krevním oběhu, musí dojít ke ztrátě jejich epitelových znaků a tyto buňky musí získat vlastnosti mezenchymových buněk (2). K tomu dochází v procesu epitelomezenchymální tranzice (EMT), který usnadňuje metastatické šíření nádoru a také umožňuje buňkám uniknout apoptóze, senescenci i imunitním buňkám. Jedinou dosud validovanou metodou schválenou FDA

Obr. 1. Tekutá biopsie umožňuje detekovat nádorové biomarkery ve snadno dostupných tělních tekutinách; své využití by mohla najít ve screeningu nádorových onemocnění, diagnostice, monitorování odpovědi na léčbu, stanovení prognostických markerů i včasné detekci relapsu (5)



k detekci CTC je CellSearch. V rámci této metody jsou počítány pouze viabilní nádorové buňky. Fragmenty buněk, nekrotické buňky a bezjaderné elementy se nezapočítávají. Výsledkem je počet takových buněk v 7,5 ml krve. S ohledem na užití takto malého vzorku je toto vyšetření zatíženo relativně malou senzitivitou. O překonání tohoto problému se snaží Cellcolector, který spočívá v izolaci CTC in vivo z mnohem většího krevního objemu s aplikací antiEpCam protilátek, které umožňují odlišit viabilní a apoptotické CTC (EPISPOT – The epithelial immuno spot). Problémem v tomto případě může být fakt, že detekci uniknou buňky, které prošly EMT, tyto buňky jsou ale zároveň i agresivnější (2).

Vyšetření CTC může mít prognostický význam, může být i ukazatelem rezistence na léčbu.

Volná cirkulující DNA (cfDNA)

Volná cirkulující DNA představuje fragmenty mimobuněčné DNA, které se přirozeně uvolňují do krve během apoptózy a nekrózy buněk. Nízké koncentrace cfDNA jsou tedy v krvi přítomné fyziologicky (10–100 ng/ml) a jsou poměrně rychle odbourávány játry, ledvinami, případně slezinou (1). V případě patologických stavů, jako jsou zánět nebo nádorová onemocnění, je cfDNA detekovatelná v mnohem vyšších koncentracích. Nádorově specifická volná DNA (ctDNA) se do oběhu uvolňuje nekrotizací nádorových buněk a velikost fragmentů je větší než 180 bp, jedná se te-

dy o velké fragmenty DNA, které často vytváří komplex. Tyto fragmenty mohou být detekovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (1). Jelikož se tyto fragmenty uvolňují ze všech nádorových ložisek, poskytují nám komplexní informaci o primárním nádoru i metastázách a představují tak kompletní genetické portfolio. Výrazné zvýšení ctDNA je přítomné především u pacientů s pokročilým onkologickým onemocněním, s generalizací. Hladiny ctDNA umožňují kontinuálně monitorovat stav onemocnění, jeho odpověď na probíhající léčbu (snížení ctDNA – dobrá odpověď na léčbu; přetrvávající vysoké hladiny ctDNA – rezistence na léčbu se špatnou prognózou), umožňuje sledovat minimální reziduální chorobu, detekovat relaps onemocnění a časně zahájit léčbu (2).

Exozomální mRNA

Exozomy jsou drobné membránou ohraničené váčky, které jsou buňkami uvolňovány do extracelulárního prostoru. Jedná se o nanočástice o velikosti 30–150 nm, které zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, a je prokázáno, že mají svou úlohu i v onkogenezi a progresi nádorových onemocnění. Obsahem těchto vezikul jsou specifické proteiny, lipidy a také messengerové mRNA a microRNA (2). Právě jejich přítomnost v různých tělních tekutinách z nich dělá potenciální zdroj nádorových biomarkerů a exozomy se v minulých několika letech staly jedním z hlavních cílů v tekuté biopsii u různých druhů nádorových