

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2013

Bc. Martin Bohuslav

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

**Povrchová modifikace magnetických částic pro
efektivní izolaci krevních buněk**

Bc. Martin Bohuslav

Diplomová práce

2013

UNIVERSITY OF PARDUBICE
Fakulty of Chemical Technology

**Surface modification of immunomagnetic carrier for
efficient isolation of blood cells**

Bc. Martin Bohuslav

Thesis

2013

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin Bohuslav**
Osobní číslo: **C10903**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Povrchová modifikace magnetických částic pro efektivní izolaci krevních buněk**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Základní definice CTC buněk, charakterizace, význam buněk z pohledu diagnostiky a prognózy nádorových onemocnění.

Přehled současných metod izolace a kvantifikace tzv. CTC buněk, metody používané ve vědě i ve fázi klinických studií.

Nové trendy v analýze buněk - miniaturizace, automatizace, mikrofluidní systémy, výhody spojení mikrofluidních separátorů a imunomagnetickou separací buněk.

Experimentální část:

Vazba specifických protilátek na magnetické mikro/nanočástice, vazba protilátek bude orientovaná nebo náhodná, povrchová modifikace částic s cílem minimalizovat nespecifickou sorpci buněk.

Imunomagnetická separace krevních buněk vsádkově, mikroskopické pozorování (rozety), stanovení účinnosti separace, míry nespecifické sorpce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Zuzana Svobodová

Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti:

Mgr. Lenka Brůčková

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2013

Martin Bohuslav

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, PhD. za odborné vedení a konzultace při jejím zpracovávání. Velký dík patří především Mgr. Barboře Jankovičové, PhD., Mgr. Janě Kučerové a Mgr. Zuzaně Svobodové nejen za vedení a cenné rady při práci v laboratoři, ale také za pomoc při zpracování dosažených výsledků. Můj velký dík patří také laborantkám, především paní Janě Kňavové za její pomoc a ochotu. Největší dík však náleží mé rodině za neustálou podporu po celou dobu studia, díky které tato práce mohla vzniknout.

SOUHRN

Tato diplomová práce je součástí projektu zabývajícího se vývojem nového mikroprůtokového zařízení pro izolaci cirkulujících nádorových buněk z plné krve. Stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi pacientů je důležité nejen pro včasné odhalení nádorového bujení, ale hlavně pro monitorování průběhu onemocnění, úspěšnosti protinádorové terapie a detekce návratu onemocnění. Předmětem naší práce bylo vyvinout bioaktivní nosič pro toto zařízení.

Cílem naší diplomové práce byl vývoj nového imunosorbentu s minimální nespecifickou sorpcí pro izolaci cirkulujících nádorových buněk a jeho porovnání s komerčně dodávaným nosičem.

Ve výzkumné části jsme nejprve modifikovali povrch magnetických částic polyetylglykolem, abychom dosáhli minimální nespecifické sorpce. Porovnávali jsme také účinnost vazby modelových IgG na magnetické částice PGMA povrchově modifikované polyetylglykolem s funkčními skupinami karboxylovými, hydrazidovými nebo hydroxylovými.

Dále jsme porovnávali nespecifickou sorpci a schopnost specifické vazby imobilizovaných protilátek povrchově modifikovaného imunosorbentu polyetylglykolem s nosičem nemodifikovaným. Pro ověření účinnosti specifické vazby připraveného imunosorbentu jsme si zvolili jako modelový systém biospecifický pár protein p53 a protilátky anti-p53.

Potom jsme porovnali specifickou vazbu buněk EpCAM⁺ a nespecifickou sorpci buněk EpCAM⁻ při imunomagnetické separaci buněk námi připraveným imunosorbentem a komerčně dostupným imunosorbentem. Nakonec jsme porovnávali schopnost imunosorbentů izolovat buňky s různou mírou exprese molekuly EpCAM.

Námi připravený imunosorbent se účinností specifické vazby buněk EpCAM⁺ vyrovnal komerčně dostupnému nosiči, ale nespecifická sorpce buněk EpCAM⁻ byla vyšší.

Klíčová slova:

cirkulující nádorové buňky

imunomagnetická separace

magnetické částice

povrchová modifikace

SUMMARY

The graduation theses are part of a project dealing with development of a new micro-flow device for isolation of circulating tumour cells from full blood. The identification of circulating tumour cells in peripheral blood of patients is important not only for detection of tumour proliferation, but mainly for monitoring the disease process, the efficiency of an anti-tumour therapy and the detection of the disease recurrence. The subject of this work was to develop a bioactive carrier for the device.

The aim of the theses is to develop a new immunosorbent with minimal non-specific sorption for isolation of circulating tumour cells and its comparison with commercially supplied carriers.

At the beginning of the research stage, the surface of magnetic particles was modified using polyethyleneglycol in order to obtain the minimal non-specific sorption. Then we compared the efficiency of the model IgG bond to PGMA magnetic particles modified on the surface by polyethyleneglycol with functional carboxylic, hydrazidic or hydroxylic groups.

Additionally, the non-specific sorption and the specific binding power of immobilized antibodies of the immunosorbent being modified on the surface by polyethyleneglycol were compared to a non-modified carrier. To validate the efficiency of the specific bond of the prepared immunosorbent, we chose the biospecific pair of p53 protein and anti-p53 antibody as a model system.

Finally, we compared the specific bonds of cells and the non-specific sorption of EpCAM+cells using the immunosorbent which had been prepared by us and also the commercially available immunosorbent. In the end, the efficiency of the immunosorbents to isolate cells was compared to different rates of EpCAM molecule expression.

The EpCAM specific binding efficiency of the immunosorbent which had been prepared by us was comparable with the commercially available carrier, but the non-specific sorption of the EpCAM⁺ cells was higher.

Key words:

circulating tumour cells

immuno-magnetic separation

magnetic particles

surface modification

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	absorbance
AFP	α -fetoprotein
ALDH	aldehyd dehydrogenáza
BCA	bicinchoninová kyselina (bicinchoninic acid)
CD45	povrchový antigen 45 (Cluster of Designation 45)
CEA	karcinoembryonální antigen (Carcinoembryonic Antigen)
CEpC	cirkulující epitelové buňky (Circulating Epithelial Cells)
CK	cytokeratiny (Cytokeratins)
CSC	nádorové kmenové buňky (Cancer Stem Cells)
CTC	cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumor Cells)
CTM	cirkulující nádorové mikroemboly (Circulating Tumor Microembols)
DAPI	4,6-diamino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRIE	vysoce reaktivní iontové leptání (Deep Reactive Ion Etching)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EMT	přeměna epiteliálních růstových znaků na mezenchymální (Epithelial to Mesenchymal Transition)
EpCAM	adhezni molekula epitelových buněk (Epithelial Cell Adhesion Molecule)
FDA	americký úřad pro správu potravin a léčiv (US Food and Drug Administration)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HER2/neu	receptor epidermálního růstového faktoru 2/proto-onkogen <i>neu</i>
HRP	křenová peroxidáza
IgG	imunoglobulin G
MET	přeměna mezenchymálních růstových znaků na epiteliální (Mesenchymal to Epithelial Transition)
MUC1, MUC2	mucíny 1, 2
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyetylglykol
PSA	prostatický specifický antigen
WHO	světová zdravotnická organizace

OBSAH

1	ÚVOD	13
2	TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1	Charakteristika nádorů	14
2.2	Nádorová buňka	14
2.3	Vznik nádorového ložiska a rozšíření nádoru	15
2.4	Charakteristika cirkulujících nádorových buněk.....	16
2.5	Diagnostika cirkulujících nádorových buněk.....	20
2.6	Význam diagnostiky cirkulujících nádorových buněk.....	21
2.7	Komplikace stanovení cirkulujících nádorových buněk.....	23
2.8	Metody izolace a kvantifikace cirkulujících nádorových buněk	24
2.8.1	Metody založené na morfologickém přístupu	24
2.8.2	Metody založené na imunologickém přístupu	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1	Imobilizace IgG na částice s karboxylovou funkční skupinou.....	42
3.2	Povrchová modifikace magnetických mikročástic polyetylglykolem....	43
3.3	Stanovení množství navázaného polyetylglykolu pomocí specifického konjugátu	44
3.4	Vazba IgG na magnetické mikročástice modifikované polyetylglykolem	45
3.5	Imunoprecipitace proteinu p53 z buněčného lyzátu	48
3.5.1	Imunosorbenty bez povrchové modifikace.....	49
3.5.2	Imunosorbenty s povrchovou modifikací polyetylglykolem	49
3.6	Počítání rozet magnetických částic s buňkami.....	50
3.7	Diskontinuální polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným	51
3.8	Barvení akrylamidových gelů dusičnanem stříbrným.....	53
3.9	Stanovení proteinů pomocí Micro BCA testu.....	54
4	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	55
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
5.1	Povrchová modifikace magnetických částic polyetylglykolem	56

5.2	Testování různých metod vazby IgG na částice povrchově modifikované polyetylglykolem.....	57
5.3	Optimalizace vazby IgG na částice s různým množstvím polyetylglykolu	63
5.4	Porovnání účinnosti vazby specifických protilátek anti-p53 na magnetické částice Sera-Mag a Dynabeads.....	66
5.5	Vazba specifických protilátek anti-p53 na magnetické částice PGMA modifikované polyetylglykolem	71
5.6	Izolace proteinu p53 z buněčného lyzátu	71
5.6.1	Izolace proteinu p53 z lyzátu imunosorbentem bez povrchové úpravy....	71
5.6.2	Izolace proteinu p53 z lyzátu imunosorbentem povrchově modifikovaným polyetylglykolem	75
5.7	Vazba specifických protilátek anti-EpCAM na magnetické částice PGMA modifikované polyetylglykolem	80
5.8	Porovnání připraveného imunosorbentu a komerčně dostupného pro imunomagnetickou separaci buněk	80
6	ZÁVĚR	86
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	87
8	PŘÍLOHY	94

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění se díky prudkému nárůstu během posledních desetiletí stala vážným zdravotním i společenským problémem. Dle WHO jsou celosvětově nádorová onemocnění s incidencí přes 10 milionů nových případů a mortalitou větší než 6 milionů ročně druhou nejčastější příčinou smrti po kardiovaskulárních onemocněních [1].

Vyšší výskyt nádorů je nejčastěji přičítán špatnému životnímu stylu, který zahrnuje stres, nedostatek spánku, malou fyzickou aktivitu, špatnou životosprávu, užívání alkoholu a kouření. Mezi další faktory patří nepochybně špatné životní prostředí, stejně jako faktory dědičné a genetické predispozice, které jsou obzvláště významné u určitých typů nádorů. Obecně se nádory vyskytují u osob středního a vyššího věku, je však smutným faktem, že se tato věková hranice posouvá stále níže. Jedním z důvodů je nepochybně lepší diagnostika a screeningové metody, díky kterým se daří zachycovat nádorová onemocnění v časnějších stádiích [2].

V české republice ročně umírá na nádorová onemocnění 27 000 osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti. Nejčastějším maligním onemocněním mužů je karcinom plic a následně gastrointestinální nádory a karcinomy prostaty. V případě žen je to nejčastěji karcinom prsu a reprodukčních orgánů, dále pak gastrointestinální nádory. Nemałym problémem je také vzestup incidence karcinomu plic [3].

V boji s nádorovými onemocněními je kladen důraz na stále se zdokonalující diagnostiku a zavádění screeningových metod k detekci nádorových onemocnění v časném stádiu, které přispívají k lepšímu terapeutickému zvládnutí tohoto onemocnění.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika nádorů

Nádor je definován jako lokálně neregulovaný růst tkáně, který má autonomní povahu. Růst nádoru se vymkne z regulačních mechanismů, které řídí a kontrolují buněčné dělení a angiogenezi. [4].

Nádory můžeme rozdělit do dvou skupin, jedná se o nádory nezhoubné, benigní a nádory zhoubné, maligní. Nádor nezhoubný je charakteristický tím, že je ostře ohraničen od okolní tkáně a jeho buňky jsou podobné buňkám původní tkáně a mohou mít zachovanou i původní funkci. Tento typ nádoru nebývá nebezpečný, protože netvoří metastázy. Problémy mohou nastat, pokud dochází k utlačování okolní tkáně a ovlivňování její funkce.[5].

Nádor zhoubný, maligní je charakterizován tím, že agresivně prorůstá do okolních tkání, protože zhoubné nádorové buňky přestávají být závislé na kontaktu s okolními buňkami. Dochází u okolních zdravých buněk k útlumu proliferační aktivity. Maligní nádorové buňky jsou schopny se odloučit od primárního nádoru a vstupovat do krevního řečiště, lymfatických cév a do tkání.[4].

2.2 Nádorová buňka

Nádorová buňka je buňka, u níž spontánní mutací, nebo spolupůsobením biologických, chemických, či fyzikálních karcinogenů došlo ke změnám v genotypu, jejímž fenotypickým důsledkem je omezená citlivost k apoptóze, k regulaci buněčného cyklu a v důsledku toho dochází k nekontrolovatelnému dělení [6].

Pro nádorovou buňku jsou charakteristické změny jádra: nepravidelný tvar jádra, změna poměru jádro/cytoplasma ve prospěch jádra, hrubý chromatin a nápadná jadérka. Změny jsou patrné i v cytoplazmě, kde dochází k převaze stromatu, což vede k jeho tuhé konzistenci. U některých nádorů může naopak docházet k převaze parenchymu a nádor má pak konzistenci měkkou. Pro nádorovou buňku jsou též typické změny v buněčné membráně – porucha kohezivity buněk, dále změny počtu a složení organel [7].

Nádorové buňky dělíme na maligní a benigní. Mezi základní znaky maligní buňky patří ztráta původní morfologie a funkce. Benigní nádorová buňka se naopak podobá buňkám původní tkáně a může mít zachovanou i původní funkci. Typickou

vlastností maligních buněk je jejich schopnost pronikat do okolní tkáně a do cirkulace, to mohou provést buď přímo přestupem přes cévní stěnu, nebo prostřednictvím lymfatického systému. Maligní buňky se již nemusí množit v jedné vrstvě, ale mohou tvořit mnohovrstevnatá ložiska. Benigní nádorové buňky tuto vlastnost nemají, jsou závislé na kontaktu s okolními buňkami a bazální membránou, a proto nepronikají do okolní tkáně a krevního řečiště a nemohou zakládat metastáze [4].

2.3 Vznik nádorového ložiska a rozšíření nádoru

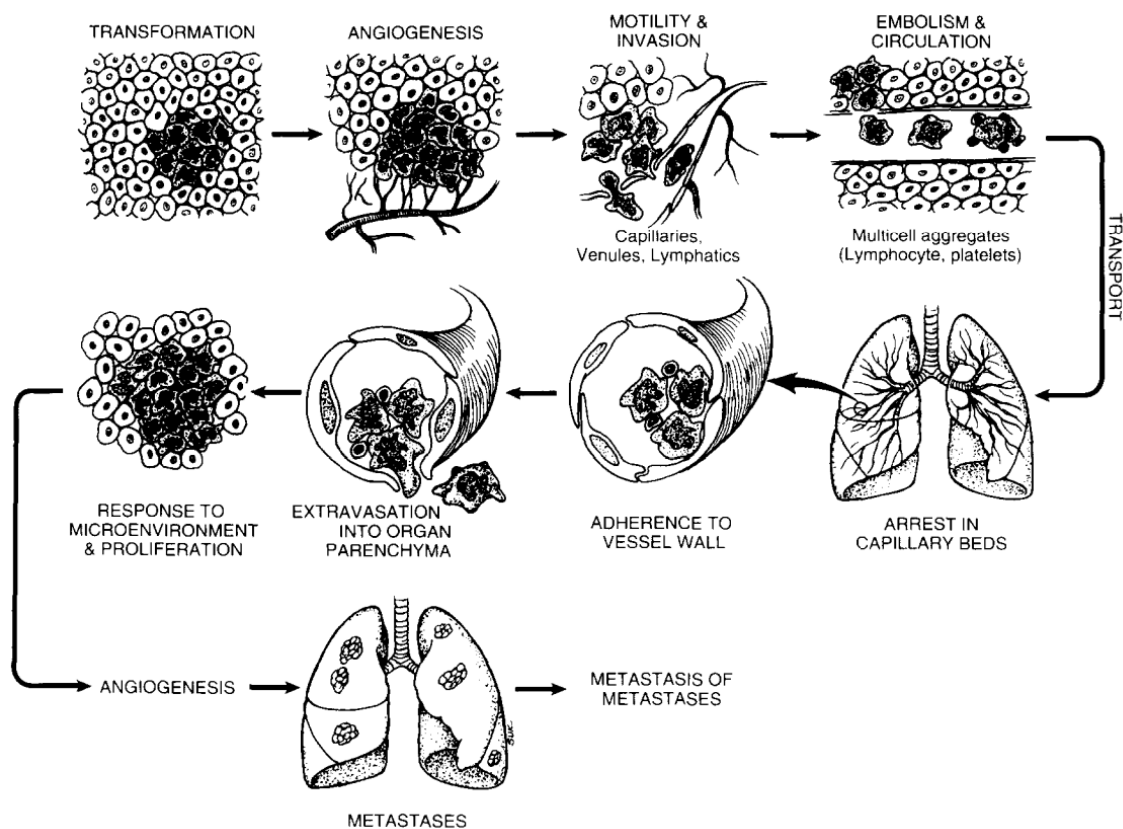
Za určitých okolností dochází k přeměně somatické buňky v buňku nádorovou. Aby se tak mohlo stát, proběhne mnoho dílčích kroků. Těmi jsou genetické mutace různých genů, které se v průběhu života buňky hromadí. Patří mezi ně tzv. antionkogeny, jímž se říká též tumor-supresorové geny, které brání buňkám v nekontrolovaném růstu a ovlivňují mechanismus apoptózy. Jsou-li zasaženy mutací, nevykonávají už správně svoji funkci. Dalšími geny jsou tzv. onkogeny, které vznikají mutací z protoonkogenů. Ty kódují většinou různé růstové faktory a jejich receptory, nebo mají vliv na přenos signálů v buňce, nebo též regulují genovou expresi. Může se také jednat o geny, které ovlivňují opravné mechanismy DNA [8].

Pokud se nahromadí potřebné genetické změny, buňka se začne po čase nekontrolovaně množit až do velikosti ložiska kolem 2 – 3 mm. Další růst buněk je omezen malým přívodem živin. Aby mohlo dojít k dalšímu růstu nádoru, musí dojít k tvorbě nových cév. To způsobí zvýšení přívodu živin a nádor dále roste. Nádorové buňky svými produkty podporují angiogenezi [9].

Maligní nádorové buňky se uvolňují do krevního řečiště přestupem přes cévní stěnu do nově vzniklých cév nebo prostřednictvím lymfatického systému a jsou dále roznášeny ke vzdáleným orgánům [5]. Většina těchto buněk je odhalena imunitním systémem a je donucena k apoptóze [10]. Těm nádorovým buňkám, které jsou v krevním oběhu, říkáme cirkulující nádorové buňky (CTC). Jelikož ložisko nádoru má heterogenní podstatu, i CTC se skládají z mnoha odlišných subpopulací, které se liší svými povrchovými znaky i genetickou výbavou [11].

Pokud se CTC někde uchytlí na endotelu cévy, může projít přes cévní stěnu a založit tak mikrometastatické ložisko, nebo zůstat ve stavu dormance v kostní dřeni nebo v lymfatických uzlinách jako diseminovaná nádorová buňka (DTC) [12]. Další možností je, že se v kapiláře usadí shluk buněk, které proliferují, až dojde

k protržení cévní stěny a dále ke vzniku mikrometastáze. U mikrometastází dochází snadněji k angiogenezi, díky větší agresivní povaze metastatických buněk. Nové ložisko se tak může stát dalším zdrojem CTC již agresivnější povahy. Pravděpodobnost založení dalších metastatických ložisek se tak zvyšuje [13]. Způsob rozšíření nádoru je popsán na obrázku č. 1.



Obrázek 1.: Proces vzniku a vývoje nádorové tkáně (převzato z [13]).

Aby mohly vzniknout metastáze, musí se oddělit nádorové buňky z primárního ložiska, projít mezibuněčným prostorem a vstoupit do cirkulace, přežít v cirkulaci, přilnout k subendotelové membráně, vstoupit do orgánového parenchymu, odpovídat na růstové faktory, proliferovat a indukovat angiogenezi a unikat imunitnímu systému.

2.4 Charakteristika cirkulujících nádorových buněk

Většina CTC je mnohonásobně větší než leukocyty, ale pouhá velikost není dostatečným kritériem pro identifikaci nádorové buňky, protože kromě mnohonásobně větších CTC byly nalezeny i malé, velikostně srovnatelné s leukocyty. CTC však charakterizuje zvětšené jádro složené z rozvolněného chromatinu a velkých jadérek. Poměr mezi jádrem a cytoplasmou je proto vysoký [14].

Odhaduje se, že u pacientů s metastatickým nádorovým onemocněním se vyskytuje 1 CTC na $10^5 - 10^7$ leukocytů a u pacientů s lokalizovaným nádorem tento poměr může být i 1 CTC na 10^8 leukocytů [15].

Cirkulující nádorové buňky s epitelovými charakteristikami

CTC s epitelovými charakteristikami pocházejí z nádorů epitelového původu. Tyto CTC jsou izolovány a stanovovány na základě jejich typických povrchových znaků, mezi něž patří molekula EpCAM a cytokeratiny 7, 8, 18, 19 a 20[16]. Mají vysokou proliferační aktivitu. Tyto CTC se dostávají do krevního řečiště u mnohých nádorů epitelového původu ve velkém množství a mohou být nejpočetnější subpopulací CTC v krevním řečišti, i když většina z nich po vstupu do cirkulace zaniká apoptózou. Nemusí však být vždy přítomny u všech pacientů [17].

Cirkulující nádorové buňky po epitel-mezenchymální přeměně

Jedná se o podskupinu CTC, které prodělaly epitel-mezenchymální přeměnu (EMT). Během tohoto procesu buňky ztrácejí charakteristiku epiteliálních buněk a získávají znaky typické pro mezenchymální buňky. Tyto buňky jsou minoritní v porovnání s ostatními CTC epitelového původu [18].

Během EMT dochází ke ztrátě vysoké bazoapikální polarizace buněk, která je typická pro epitelové buňky a mění se morfologie buněk, které se podobají spíše vřetenu, než oválnému tvaru. Tato změna je spojená se snižováním exprese epiteliálních proteinů. Díky těmto změnám přestávají být buňky závislé na přichycení na bazální membráně a sousedních buňkách [19]. Dále se snižuje exprese E-cadherinů, které zajišťují silné mezibuněčné spojení, a nahrazují se N-cadheriny. Tomuto procesu se říká „cadherine switching“ [20]. Tato změna exprese cadherinů má dominantní vliv na zvýšenou pohyblivost nádorových buněk. [21]. Dalšími epiteliálními proteiny, které snižují svoji expresi, jsou okludin, klaudiny, cytokeratiny nebo kateniny, naopak se zvyšuje exprese mezenchymálních proteinů vimentinu, tenascin C, lamininu $\beta 1$, kolagenu typu VI α , stejně jako různých proteináz. Také se zvyšuje exprese integrinů, které zajišťují interakce s mezibuněčným matrixem [18].

Díky těmto změnám buňky ztratí mezibuněčnou přilnavost a získají schopnost rozrušovat mezibuněčný matrix, modifikují pak cytoskelet a zvyšují tak svou pohyblivost a invazivitu [19].

Jak již bylo uvedeno, při EMT dochází ke snižování až vymizení exprese epitelových molekul EpCAM a cytokeratinů, což výrazně komplikuje stanovení těchto buněk [19].

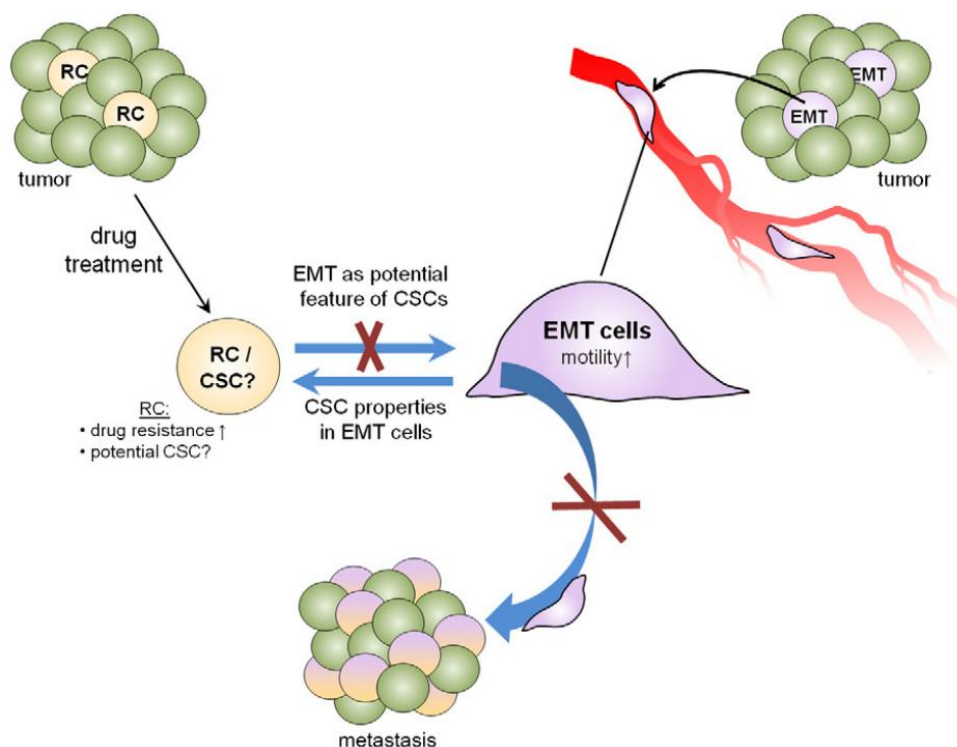
Kmenové nádorové buňky

Kmenové nádorové buňky nebo také nádorové buňky podobné kmenovým (CSC) jsou považovány za více rezistentní k chemoterapii a radioterapii a mohou být odpovědné za přežívání nádoru po léčbě a za metastáze. Uvádí se, že tyto buňky mají schopnost sebeobnovy [22]. Jsou charakteristické fenotypem $CD44^+/\alpha_2\beta_1^{\text{vysoká}}/CD133^+$ [23].

Experimentálně byla prokázána zvýšená exprese markerů kmenových buněk během indukce EMT prsních epitelálních buněk a nádorových buněk prsu [24]. Další skupiny výzkumníků prokázaly, že proces EMT nejen podporuje invazivitu nádorových buněk a vznik metastáz, ale přispívá také k odolnosti vůči léčbě a obohacuje buňky fenotypem a vlastnostmi CSC [25].

U nádoru hlavy a krku bylo prokázáno, že subpopulace fenotypu $ALDH^+$, s charakteristikou CSC a EMT, zvyšuje schopnost buněk formovat kolonie a invazivitu, protože tato subpopulace je schopná prodělat opačný proces MET. [26]. Jiná výzkumná skupina ukázala, že CSC mohou přecházet mezi dvěma fenotypy, první je migrační s expresí $CD44^+EpCAM^{\text{nizká}}$ s mezenchymálními markery (EMT) a druhý je proliferační $CD44^+EpCAM^{\text{vysoká}}$ s epitelálními charakteristikami (MET) [27].

Stávající léčba nádorů vede často k odstranění nádorových buněk, někdy ale mohou uniknout rezistentní buňky, mezi které patří i CSC. Během léčby i bez ní se některé nádorové buňky mohou změnit do pohyblivého fenotypu prostřednictvím EMT. Výsledkem je ztráta epitelálních markerů a adhezivity a získání mezenchymálních povrchových znaků. Tyto buňky pak snadněji pronikají do krevního řečiště a migrují do vzdálených míst. Důkazy naznačují, že buňky charakteru CSC mohou prodělat EMT a získat tak vyšší pohyblivost. Tento proces však může proběhnout i v opačném směru. CSC proto nejsou pouze více rezistentní k léčbě, ale často jsou i více pohyblivé a invazivní, než buňky, které nejsou fenotypu CSC po EMT [28]. Proces je popsán na obrázku č. 2.

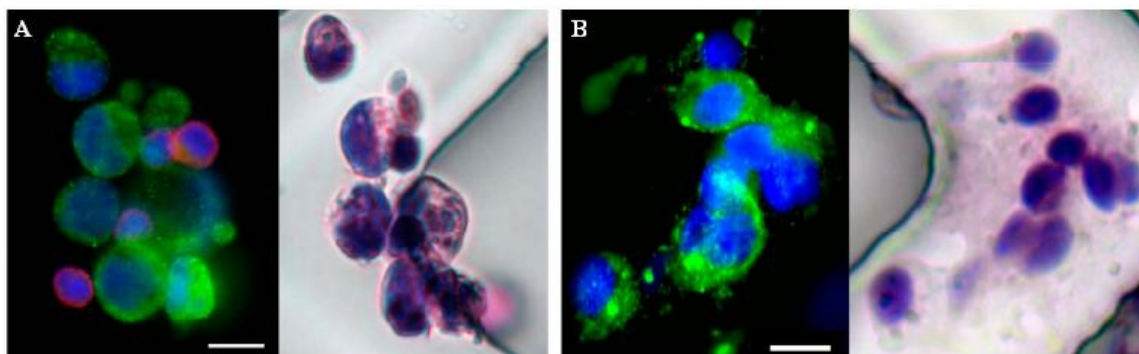


Obrázek 2.: Utváření metastáz zahrnující přeměnu EMT u CSC buněk (převzato z [28]).

Buňky po prodělání EMT pronikají do krevního řečiště a z něj do tkání, kde formují metastáze. Úmrtnost u nádorů hlavy a krku je způsobena hlavně metastázemi a terapeutické cílení na proces EMT (buď na indukci/aktivaci EMT u RC/CSC nebo na aktuální proces pohyblivosti/přemístění označené červeným křížem) může vést k lepší prognóze.

Cirkulující nádorové mikroemboly

Cirkulující nádorové mikroemboly (CTM) jsou patologické shluky nádorových buněk. Příklad takového shluku je zobrazen na obrázku č. 3. V buňkách je patrné typické velké jádro, které je charakteristické pro rychle se dělící nádorové buňky [14].



Obrázek 3.: Shluky nádorových buněk (CTM) izolované na HB-čipu (převzato z [29]).

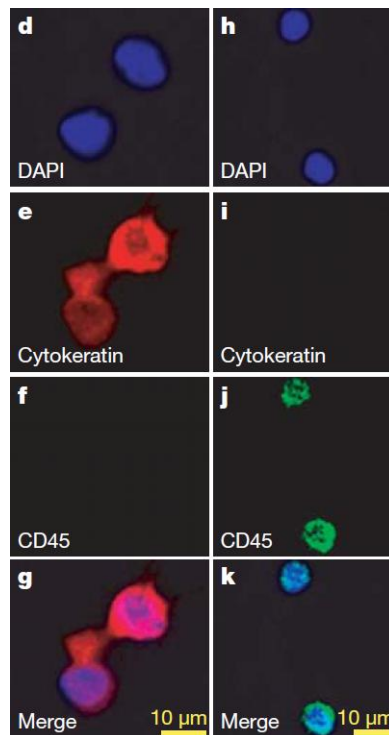
(A) Mikroskopie buněk izolovaných na HB-čipu od pacientů s metastatickým nádorem prostaty; je zobrazena imunofluorescenčně značená DNA (modrá), prostatický specifický membránový antigen (zelená) a CD 45 (červená) a imunohistochemické barvení (hematoxylin a eosin). (B) Mikroskopie buněk izolovaných na HB-čipu od pacientů s metastatickým nádorem plic; je zobrazena imunofluorescenčně značená DNA (modrá), cytokeratiny 7/8 (zelená) a CD 45 (červená) a imunohistochemické barvení (hematoxylin a eosin). Měřítka představuje 10 μm .

V těchto shlucích nemusí být jen nádorové buňky, ale může se jednat o agregát s krevními destičkami, které jim tak vytváří ochranný plášť před imunitním systémem, který je pak nemůže zničit [30]. Agregace s destičkami poskytuje nádorovým buňkám také prorůstové faktory a vhodné mikroprostředí pro proliferaci [31]. Bylo též prokázáno, že nádorové buňky v CTM jsou více odolné k apoptóze než volné CTC, u kterých byla pozorována apoptóza častěji [32].

Díky destičkám je usnadněn CTM kontakt s endotelem cév a umožňují nádorovým buňkám průnik přes cévní stěnu a formování metastáz. [33]. CTM také mají schopnost zakládat metastázy po přilnutí k cévní stěně bez extravazace přímo v krevním řečišti [34].

2.5 Diagnostika cirkulujících nádorových buněk

V klinické praxi se cirkulující nádorové buňky nejčastěji izolují využitím jejich povrchové molekuly EpCAM a následná identifikace se provádí pomocí značení jádra, ve kterém se barví nukleová kyselina 4,6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI), a značení cytokeratinů (CK) protilátkami konjugovanými s fluorochromem. Pro vyloučení leukocytů, které by mohly způsobit falešnou pozitivitu, je leukocytární povrchový antigen CD45 značen odlišným barvivem. Příklad takového barvení je ukázán na obrázku č. 4. Jednotlivé metody detekce jsou popsány níže.



Obrázek 4.: CTC a leukocyty označené specifickým barvením (převzato z [36]).

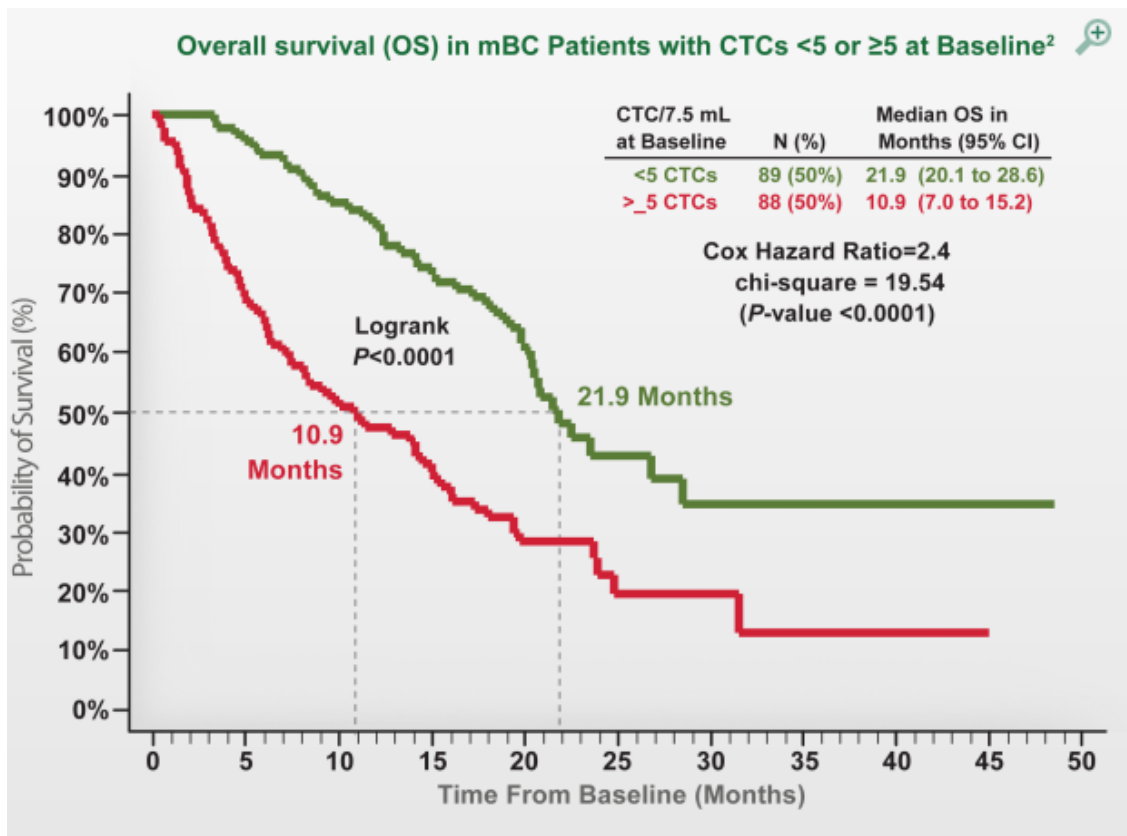
Jádra jsou barvena barvivem DAPI, cytokeratiny anti-cytokeratinovými protilátkami konjugovanými rhodaminem (epitelové buňky) a CD45 anti-CD45 protilátkami konjugovanými s fluoresceinem (leukocyty). D-g jsou značené CTC a h-k jsou leukocyty.

2.6 Význam diagnostiky cirkulujících nádorových buněk

Jelikož se do krve dostávají CTC již z primárního nádoru záhy po započetí angiogeneze, můžou tak CTC sloužit jako potenciální biomarker k odhalení nádorového onemocnění ještě před tím, než je detekovatelné primární nádorové ložisko zobrazovacími technikami [37]. Díky včasné diagnostice se může zahájit adekvátní léčba ještě před diseminací nádorových buněk a následným vznikem metastáz, které jsou hlavním důvodem špatné prognózy nádorového onemocnění, a díky přítomnosti specifických orgánových antigenů na CTC lze určit původ nádorových buněk. K nejčastěji stanovovaným nádor-specifickým markerům u rakoviny prsu patří AFP, HER2/neu, mamaglobulin a MUC1/MUC2. Pro rakovinu prostaty je typický PSA a pro rakovinu žaludku a kolorekta CEA [16].

K monitorování průběhu a účinku terapie slouží stanovení množství diseminovaných nádorových buněk v odběru z periferní krve. Jejich množství často koreluje s průběhem a prognózou nádorového onemocnění. Výhodou tohoto způsobu detekce je, že není zapotřebí invazivního zásahu do organismu, jako by byla například biopsie [38]. Analýza CTC z krve však dovoluje získat potřebné informace a navíc

nezatěžovat tolik organismus pacienta. I když nám množství CTC v krvi přímo nesděluje, v jak pokročilém stádiu se onemocnění nachází, protože množství CTC se může lišit podle typu nádoru a umístění metastáz. Byl ale prokázán vztah mezi množstvím CTC v krvi a dobou přežití pacientů vícenásobnými klinickými studiemi pomocí testu Cellsearch®, který je zatím jako jediný schválený americkým úřadem pro správu potravin a léčiv (FDA) při monitorování pacientů s metastatickými nádory prsu, prostaty a metastatického kolorektálního nádoru [39]. Vztah mezi množstvím CTC u metastatického nádoru prsu a dobrou nebo špatnou prognózou ukazuje obrázek č. 5. Jako hranice mezi dobrou nebo špatnou prognózou je stanoven minimální počet 5 CTC v 7,5 ml plné krve.



Obrázek 5.: Vztah mezi množstvím CTC v plné krvi a prognózou u pacientů s metastatickou rakovinou prsu (převzato z [40]).

Stanovení CTC může sloužit k monitorování průběhu nádorového onemocnění během terapie. Velký význam také spočívá v průběžném monitorování návratu onemocnění po skončení terapie. V případě pozitivního nálezu se může rychle znovu zahájit léčba. Díky citlivé analýze se tak může zabránit zbytečnému vystavení pacienta

vedlejšímu toxickému účinku při terapii, nebo se naopak včas může zahájit léčba, i když se ještě nádorové ložisko nepodařilo prokázat zobrazovací technikou [41].

Díky vývoji nových metod detekce a charakterizace CTC, a jejich zdokonalování se mohou CTC použít v klinickém výzkumu jako farmakodynamický biomarker vývoje cílené protinádorové terapie. Díky tomuto využití CTC by se mohla vyvinout účinnější terapie s nižšími vedlejšími účinky a optimalizovat se podle potřeby pacienta. Monitoroval by se tak i vznik a vývoj rezistence ke konkrétní terapii a mohlo by se včas zareagovat změnou léčby [42].

2.7 Komplikace stanovení cirkulujících nádorových buněk

Velmi důležitá je senzitivita testů detekujících CTC, protože je potřeba detekovat jednu buňku z počtu 10^{7-8} ostatních jaderných buněk vyskytujících se v plné krvi. Druhým důležitým aspektem je nutná vysoká specificita stanovení, která eliminuje falešně pozitivní a falešně negativní výsledky. Falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny například přítomností epiteliálních antigenů na leukocytech, proto se provádí vizualizace leukocytů značením jejich povrchového antigenu CD45.

Diagnostické buněčné techniky se zaměřují právě na buňky s epitelovou charakteristikou, které jsou přítomny u většiny nádorů epitelového původu, i když je známo, že u určitého procenta pacientů, podle typu nádoru, nemusí být přítomny vůbec nebo jsou nedetekovatelné. Je ale také prokázáno, že pokud se k detekci rizikových buněk použijí kromě protilátek anti-EpCAM i protilátky anti-CD 146, tak se účinnost detekce zvýší [43].

Jednou z komplikací stanovení CTC je přítomnost cirkulujících epitelových buněk (CEpC) v krvi, které mají na svém povrchu přítomny cytokeratiny a molekulu EpCAM, které se používají k detekci CTC. Rozlišit se dají pomocí morfologických znaků. V minulosti totiž bylo prezentováno, že po operativním odstranění primárního nádoru většina CTC mizí po 1 - 2,5 hodinách [44]. To bylo zjištěno stanovením, které bylo založené na protilátkách proti epitelovým markerům. To by tedy znamenalo, že CTC hynou v cirkulaci velmi rychle a musí být do ní neustále dodávány. Jenže bylo již také publikováno, že během prvních tří dnů po operaci se množství buněk s epitelovou charakteristikou zvyšuje až 1000-násobně a po dalších 2 – 4 dnech většina mizí [45]. Z toho vyplývá, že v prvním případě nebyly stanovovány CTC, ale CEpC, o kterých se dnes již ví, že se masivně vyskytují v krevním oběhu po operacích. Proto nikdy nestačí

analýza CTC založená pouze na epitelových markerech. Otázkou ještě zůstává, jaký vliv na množství CTC v krevním oběhu má fyzická zátěž, trávení nebo jiné vlivy [46].

Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny přítomností destiček na povrchu nádorových buněk, což může způsobovat snižování schopnosti detekce povrchových molekul a CTM pak nemusí být detekovány. Některé postupy při detekci CTM mohou vést ke ztrátě buněk. Mezi ně patří například centrifugace, díky které může dojít ke zničení CTM a nemusí se podařit je stanovit [35].

2.8 Metody izolace a kvantifikace cirkulujících nádorových buněk

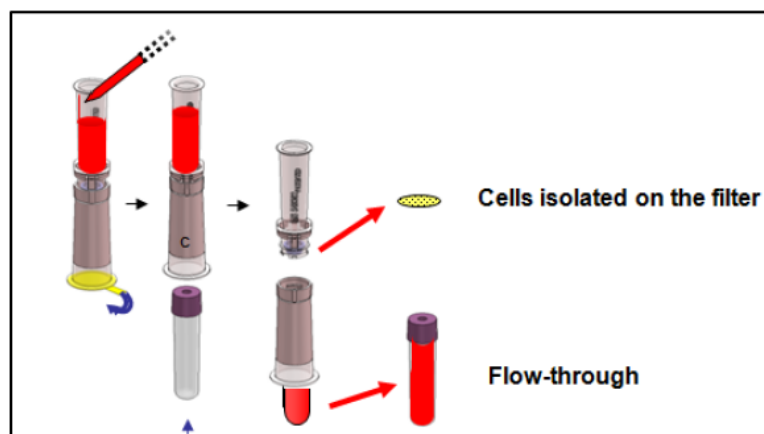
Metody izolace a kvantifikace CTC se dají dělit podle mnoha kritérií: jestli probíhá analýza přímo z plné krve, nebo je zapotřebí dalších preanalytických kroků, při kterých může docházet ke ztrátě buněk. Další způsob dělení těchto metod je podle toho, jestli využívají přímou detekci CTC, nebo nepřímou. Dále se dělí podle toho, jestli při analýze dochází k destrukci buněk, nebo je můžeme dále studovat. V této práci jsou však rozděleny podle morfologických odlišností CTC od ostatních krevních buněk a podle povrchových nebo jaderných buněčných struktur.

2.8.1 Metody izolace cirkulujících nádorových buněk založené na morfologickém přístupu

Tyto metody využívají rozdílných morfologických vlastností CTC od ostatních krevních buněk. Mezi ně patří větší velikost většiny CTC a jejich nízká hustota. CTC se také vyznačují nižší schopností přizpůsobit svůj tvar okolí než leukocyty a tudíž procházejí malými otvory.

Screencell®

Screencell® je filtrační zařízení, které využívá toho, že většina nádorových buněk je mnohokrát větší než leukocyty, které se nezachytí na mikroporózním membránovém polykarbonátovém filtru. Velikost pórů je kalibrovaná na $7,5 \pm 0,36 \mu\text{m}$ nebo $6,5 \pm 0,33 \mu\text{m}$ a jsou náhodně distribuované s hustotou 1×10^5 pórů/cm² [47]. Toto zařízení je dostupné ve třech provedeních, Screencell® Cyto, které je určené k fixování buněk pro počítání a strukturální charakterizaci, dále Screencell® CC, které izoluje živé buňky pro pěstování buněčných kultur a jejich další analýzu, a Screencell® MB pro molekulární biologii [48]. Postup analýzy je popsán na obrázku č. 6.



Obrázek 6.: Postup analýzy vzorku zařízením Screencell® (převzato z [49]).

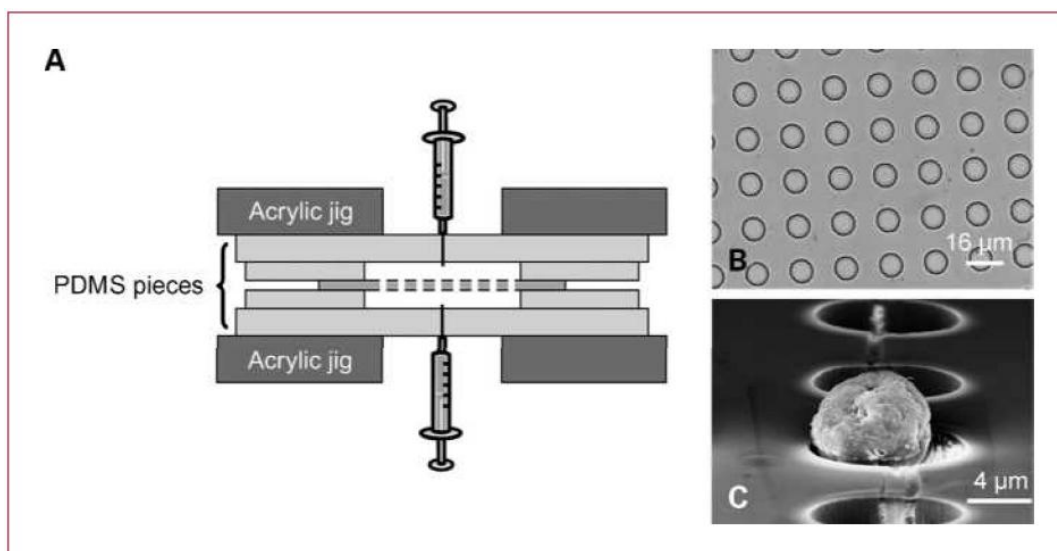
Naředěný vzorek puřem je umístěn do rezervoáru. Aplikováním podtlaku je vzorek přefiltrován přes mikroporózní membránový filtr. Filtr se zachycenými buňkami je následně uvolněn ze zařízení k dalšímu zpracování.

Výhodou tohoto zařízení je jeho nízká cena, velmi rychlá analýza, přefiltrování vzorku trvá pouze 3 minuty a kromě jednotlivých buněk jsou izolovány i CTM [48]. Účinnost izolace se pohybuje přes 90 % a viabilita izolovaných buněk je kolem 85 % [49]. Nevýhodou je, že některé leukocyty mohou být větší a nemusejí projít filtrem, a naopak i CTC mohou být velikostí srovnatelné s bílými krvinkami a projít přes filtr. Je však také možná analýza roztoku, který prošel přes filtr, a následné ověření přítomnosti malých nádorových buněk, které prošly mikropóry filtru. [50].

Toto zařízení je v klinické praxi využíváno ke stanovení CTC před operací, např. u pacientů s nádorem plic a jako prognostický marker v průběhu další léčby [51]. Uplatňuje se též u pacientů s nádorem jater, kde zjištěná přítomnost cirkulujících nádorových mikroembolů je spojována s horší prognózou onemocnění [50].

Přenosné filtrační mikrozařzení

Toto zařízení izoluje CTC na základě prosté filtrace, pomocí které dochází k separaci buněk podle jejich velikosti. Pro stanovení se používá periferní plná krev, která je přefiltrována přes parylenový membránový filter a zachycené buňky jsou následně fluorescenčně značeny [52]. Toto zařízení je znázorněné na obrázku č. 7.



Obrázek 7.: Zařízení pro izolaci CTC (převzato z [53]).

(A) Schematická kresba funkčního mikrozařízení skládajícího se z parylenového membránového filtru mezi pravoúhlými PDMS destičkami a přitisknuté akrylovými upínáky se vstupem a výstupem pro stříkačky. (B) Zobrazení opticky průhledného parylenového filtru s rovnoměrně rozmístěnými 8- μm póry. (C) Zobrazení jedné nádorové buňky chycené na membráně elektronovým mikroskopem.

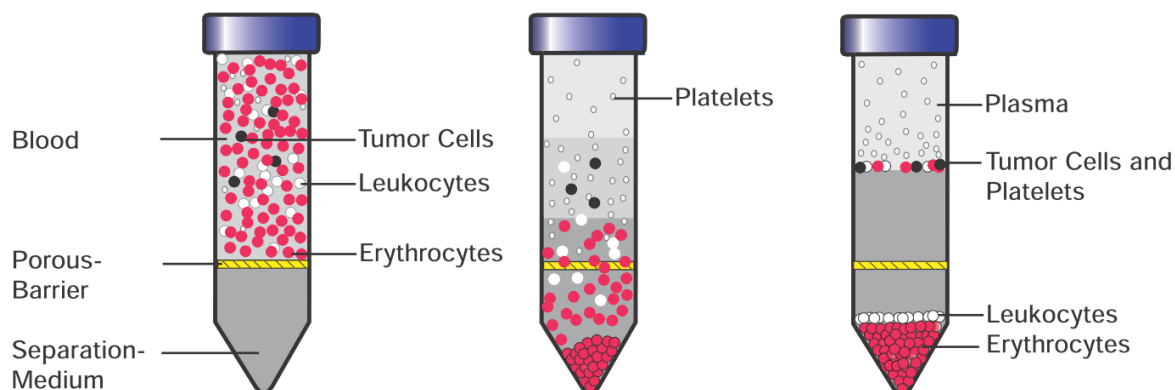
Toto zařízení dosahuje účinnosti izolace nádorových buněk resuspendovaných v plné krvi přes 90 % a s nejméně 95 % účinností izolace aspoň jedné buňky z pěti resuspendovaných buněk v 7,5 ml krve. Bylo také provedeno porovnání se systémem CellSearch. Pomocí tohoto zařízení byly identifikovány CTC u 51 pacientů z 57, systém CellSearch dokázal identifikovat CTC pouze u 26 pacientů. Tam, kde byly identifikovány CTC oběma testy, kromě pěti případů byl vyšší počet CTC identifikován pomocí tohoto zařízení [53].

Onkoquick®

Tato obohacovací metoda izolace CTC využívá rozdílné hustoty krevních elementů za vhodných podmínek. CTC a krevní destičky mají nižší hustotu, než erytrocyty a většina leukocytů, proto je lze od sebe odseparovat. Po separaci lze CTC dále analyzovat, používají se imunocytochemické metody [54]. Průměrná účinnost záchytu CTC rozpuštěných v plné krvi se pohybuje přes 70 %. Výhodou této metody je, že povrchové struktury buněk nejsou ničím ovlivněny a analýza probíhá přímo z plné krve [55]. Tato metoda je však určená doposud pro výzkumnou činnost, nikoli pro diagnostické použití [54].

Toto zařízení se skládá z 50 ml velké polypropylenové centrifugační nádoby, která je rozdělena do dvou částí membránou s póry. Spodní část obsahuje modře zbarvené dělicí médium a do horní části se umísťuje krevní vzorek objemu až 30 ml. Při

centrifugaci, která trvá dvacet minut, prochází leukocyty a erythrocyty přes porózní membránu, a proto vytlačují dělicí roztok do horní části. Buňky s nízkou hustotou a krevní destičky zůstávají mezi plazmou a dělicím médiem [54]. Celý proces izolace trvá jen 45 minut [55] a průběh je znázorněn na obrázku č. 8.

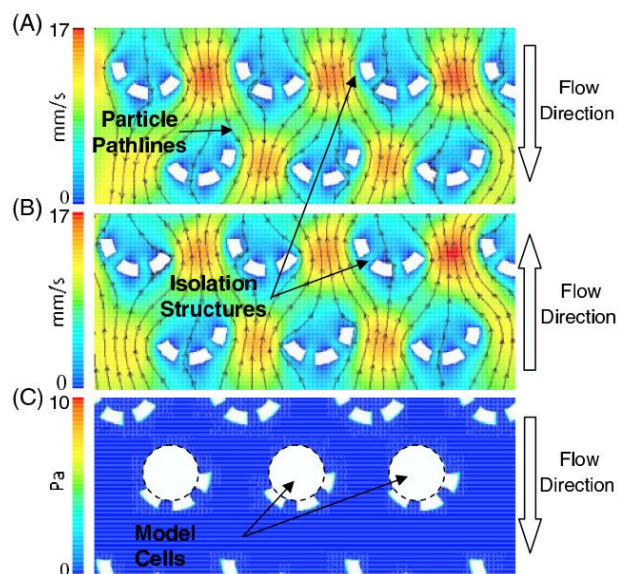


Obrázek 8.: Onkoquick® - průběh separace (převzato z [54]).

Na obrázku je zobrazena Onkoquick® dělicí nádoba před, během a po separaci.

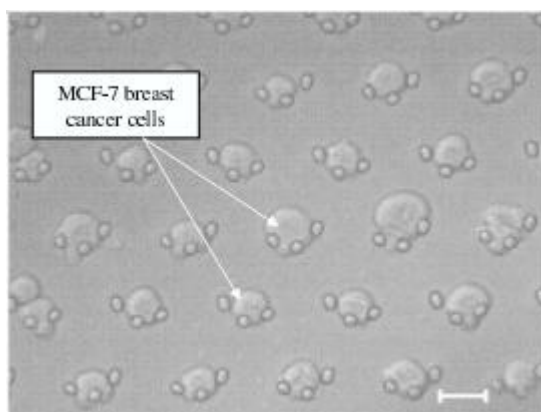
Mikrofluidní filtrační zařízení

Toto mikrozařízení sestává z kanálku, které obsahuje vícenásobné pole bariér poloměščitého profilu, ve kterých se zachytávají nádorové buňky. V každé pasti jsou dvě mezery o průměru 5 μm , které zajišťují průchod krevních elementů, a to i leukocytům, díky jejich schopnosti projít velmi malým zúžením oproti stejně velkým nádorovým buňkám. Pasti jsou umístěny 50 μm od sebe, čímž se předchází ucpání celého zařízení. Navíc je vzorek plné krve ještě přefiltrován přes filtr s 20 μm mezerami, aby se zabránilo ucpání zařízení, což by mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům. Buňky mohou být fluorescenčně barveny přímo v zařízení, nebo obrácením toku mohou být uvolněny z mikročipu a následně kultivovány [56]. Na obrázku č. 9. je analýza smykového napětí, obrázek č. 10 ukazuje buňky zachycené v mikrokanálku a na obrázku č. 11 je porovnání míry proliferace buněk, které byly podrobeny izolaci tímto zařízením, s buňkami, které izolovány nebyly.

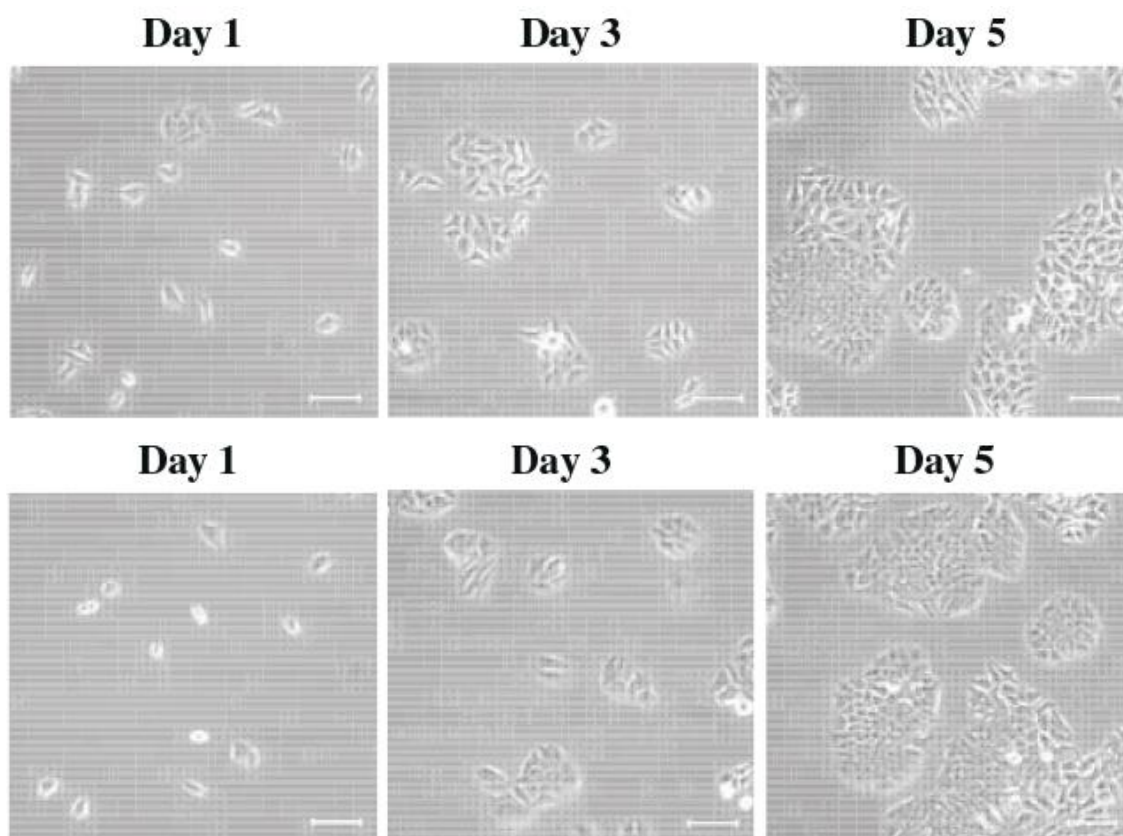


Obrázek 9.: Analýza toku a smykového napětí (převzato z [56]).

Model předvídá izolaci při tlaku 5 kPa. (A) Profil toku, když jsou buňky chytány. (B) Profil toku, když jsou buňky uvolňovány. (C) Předpokládané zachycené buňky.



Obrázek 10.: Izolační struktura čipu s buňkami (převzato z [56]).



Obrázek 11.: Porovnání proliferace buněk MCF 7 (převzato z [56])

Proliferace buněk, které nebyly podrobeny izolaci (nahore) a buněk izolovaných pomocí mikroprůtokového zařízení sledovaných po dobu 5 dnů. Nebyly pozorovány žádné rozdíly v míře proliferace.

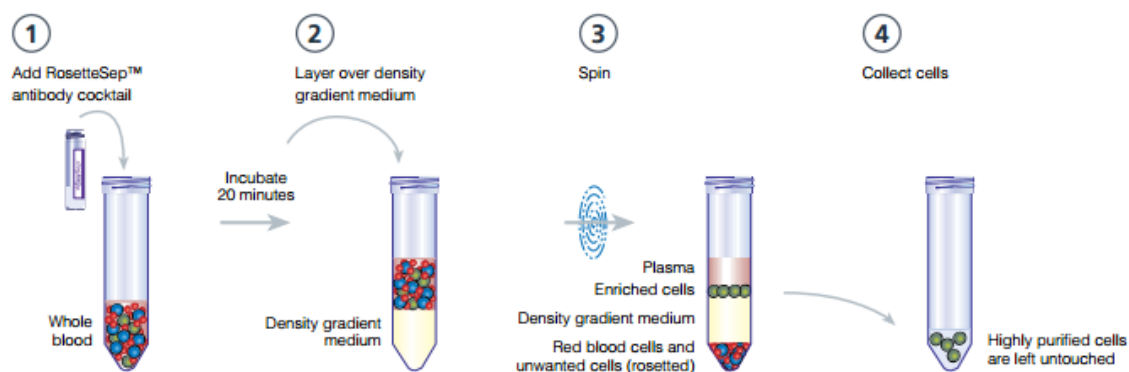
2.8.2 Metody založené na imunologickém přístupu

Tyto metody využívají pro izolaci CTC jejich povrchových znaků, především molekuly EpCAM a cytokeratinů 7, 8, 18, 19 a 20. Nebo jsou zaměřeny na identifikaci nukleových kyselin nebo produktů těchto buněk.

RosetteSepTM

Tato obohacovací metoda CTC přímo z krve je založená na negativní selekci, čili na odstranění všech ostatních buněk, kromě těch požadovaných. K tomuto účelu je komerčně dostupná směs protilátek (RosetteSep[®] Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail) [57]. Tato směs obsahuje myší a krysí monoklonální protilátky, které byly izolovány afinitní chromatografií pomocí proteinu A nebo proteinu G a byly bispecificky vázány v komplex tetramerních protilátek. Tyto protilátky jsou zaměřeny proti povrchovým antigenům lidských hematopoetických buněk CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66b a glykoforynu A, který se nachází na červených krvinkách [58].

Tato směs protilátek se přidá přímo do plné krve a během dvacetiminutové inkubace se vytvoří rozety, které jsou ve srovnání se samotnými buňkami díky vyšší denzitě následně odstraněny během centrifugace při 1200 g po dobu dvaceti minut v hustotním gradientovém médiu (Lymphoprep™) [58]. Průběh analýzy je znázorněn na obrázku č. 12.



Obrázek 12.: Průběh izolace buněk pomocí RosetteSep™ (převzato z [59]).

V prvním kroku je smíchána plná krev se směsí tetramerních protilátek. Následně se po dvacetiminutové inkubaci směs přepipetuje na dělicí gradientový gel a proběhne centrifugace. Rozety červených krvinek a nechtěných buněk jsou v dolní části oddělené gelem od požadovaných buněk.

Tímto přístupem získáme obohacenou populaci nádorových buněk. Část CTC, které se zachytí v rozetách, však může být ztracena. Účinnost izolace buněk při použití této metody je 45 %. Čistota může být měřena pomocí průtokové cytometrie po imunocytochemickém barvení fluorochromem navázaném na specifické nádorové protilátky [58].

CellSearch® CTC test

Tento systém je založen na imunomagnetické separaci CTC, využívající ferrofluidové nanočástice s koutovanými protilátkami anti-EpCAM. Fluorescenčně jsou značeny cytokeratiny 8, 18 a 19 nacházející se na CTC a leukocytární antigen CD45. Jádra jsou značena pomocí barvení nukleové kyseliny barvivem 4,6-diamino-2-fenylindolem (DAPI). Jako CTC jsou identifikovány buňky značené $CK^+/DAPI^+/CD45^-$, zatímco leukocyty jsou značené $CK^-/DAPI^+/CD45^+$ [39].

Analýza CTC probíhá ze 7,5 ml plné krve, která je nejdříve centrifugována a krevní buňky jsou odděleny od plazmy. Potom je vzorek umístěn do automatického systému přípravy vzorků CellTrack Autoprep, ve kterém jsou buňky izolovány imunomagnetickou separací. Následně jsou buňky barveny pomocí fluorescenčně značených protilátek a barviva nukleových kyselin DAPI. Dále již probíhá identifikace

a počítání buněk CellSpotter analyzátořem, což je poloautomatickým systémem založený na fluorescenčním mikroskopu s vyhodnocovacím softwarem [60].

Pro stanovení lineární přímé závislosti testu byly použity buňky nádorové linie SKBR-3, které byly rozpuštěny v krevních vzorcích od zdravých dárců. Lineární oblast korelace přímé závislosti byla stanovena v rozmezí 5 až 1142 buněk s účinností izolace vyšší než 85 %. Dále bylo testováno 145 vzorků krve zdravých dárců a 199 vzorků krve od pacientů s benigním nádorem a pouze u jednoho z těchto 344 vzorků byla stanovena víc jak 1 CTC v 7,5 ml krve. Pak také bylo stanovováno množství CTC u pacientů s metastatickými nádory. Víc jak jednu CTC se podařilo stanovit u 57 % pacientů s nádorem prostaty, u 37 % pacientů s nádorem prsu, u 37 % pacientek s nádorem vaječníků, u 30 % pacientů s kolorektálním nádorem a u 20 % pacientů s nádorem plic [61].

Prozatím je tento systém jediný, který je schválen americkým úřadem pro správu potravin a léčiv (FDA) pro klinické využití při monitorování pacientů s metastatickými nádory prsu, prostaty a metastatického kolorektálního nádoru během léčby a k určování dobré nebo špatné prognózy, kde je hranice určena počtem 5 CTC v 7,5 ml krve [39].

CELLlection™ Epithelial Enrich

Firma Invitrogen dodává pro izolaci CTC přímo z krve superparamagnetické částice velikosti 4,5 μm v průměru. Jsou na nich vázány monoklonální myší protilátky anti-EpCAM přes DNA spojku, která se po provedené imunomagnetické separaci rozštěpí a částice se oddělí od buněk [62].

Ke vzorku plné krve (5 ml) se přidá imunosorbent a následuje krátká inkubace, během které se na částice naváží CTC. Pak se navázané částice rychle odseparují pomocí magnetu a následně jsou buňky uvolněny z nosiče přidáním uvolňovacího pufru. Získáme tak obohacené žijící nádorové buňky, které můžeme dál kultivovat nebo analyzovat pomocí imunocytochemických metod [63].

MACS

Firma Miltenyi Biotec dodává obohacovací a detekční diagnostickou soupravu, která je určen pro izolaci CTC. Tato metoda je založena na imunomagnetické separaci pomocí superparamagnetických částic velikosti 50 nm, které vytvářejí koloidní směs a jsou z biologicky odbouratelného materiálu, který proto není potřeba odstranit z buněk po separaci [64]. MACS Microbeads jsou koutovány protilátkami anti-EpCAM. CTC

jsou značeny cytokeratinovými protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou. Vyhodnocení se provádí pomocí světelného mikroskopu [65].

Analýza se provádí z 5 až 15 ml plné krve. Na první MACS koloně jsou CTC vázány na částice a potom je provedeno odmytí nenavázaných složek směsi. Izolované CTC jsou následně eluovány a fixovány na druhou kolonu, kde probíhá značení pomocí specifických protilátek. Následně jsou buňky eluovány a zafixovány na sklíčko, kde se inkubují se substrátem a pak jsou analyzovány světelným mikroskopem [66].

Adnatest

Společnost Adnagen poskytuje testy pro detekci CTC kolorektálního nádoru, nádoru prsu a prostaty. Detekce je založená na imunomagnetické separaci CTC z plné krve, následně lýze CTC a identifikaci genové exprese s nádorem asociovaných markerů pomocí PCR. U kolorektálního nádoru se využívá např. CEA a EGFR [67].

Analýza probíhá z 5 ml plné krve. Nejprve jsou CTC vázány na magnetické částice Dynabeads, které na svém povrchu nesou specifické protilátky proti epiteliálním a s nádorem asociovaným antigenům. Po následném promytí jsou navázané CTC lyzovány. Z lyzátu se imunomagneticky izoluje mRNA s nádorem asociovaných markerů pomocí Dynabeads oligo(dT)₂₅. Dále je vytvořena reversní transkripční komplementární DNA, která je detekována a charakterizována PCR [68].

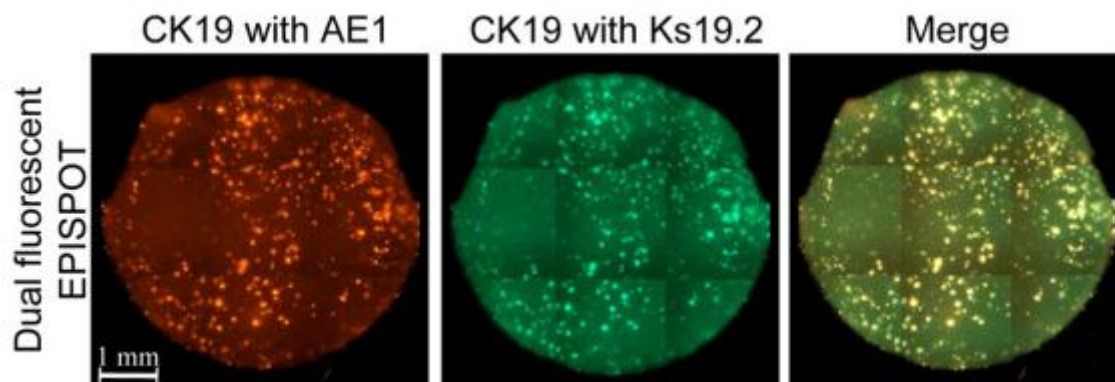
Tato metoda je vysoce citlivá a specifická, momentálně je certifikována Evropskou unií pro detekci nádoru prsu a kolorekta, ale nebyla prozatím schválena americkou FDA. V EU je tato metoda využívána k sledování pacientů během terapie a k časné detekci případného návratu onemocnění [67].

EPISPOT

Tato metoda slouží k detekci živých CTC. Je odvozena od metody ELISPOT a je založena na principu detekce sekretovaných proteinů produkovaných živými nádorovými buňkami. Na specifické imobilizované protilátky se vážou sekretované proteiny a následně jsou vizualizovány navázáním fluorescenčně značených protilátek [69].

Nejprve jsou specifické protilátky proti CK-19 navázané na misku. Následně se přidá vzorek s buňkami a kultivuje se po dobu 48 hodin. Během této doby se sekretované proteiny vážou na specifické protilátky. Po inkubaci se miska promyje a buňky jsou odstraněny. Navázané proteiny jsou fluorescenčně značeny specifickými protilátkami proti CK-19. Fluorescenční imunospoty jsou následně počítány

automatickým fluorescenčním zobrazovacím systémem, jeden imunospot odpovídá jedné nádorové buňce [70]. Ukázka imunospotů je na obrázku č. 13.



Obrázek 13.: Vizualizace CK-19 dvěma různě značenými protilátkami. (převzato z [70])
Značení použitých protilátek je uvedeno nad jednotlivými obrázky, třetí obrázek je výsledkem jejich sloučení.

Tato metoda je vysoce citlivá a specifická, ale stále je ve stádiu vývoje. Touto metodou můžeme stanovovat různé proteiny charakteristické pro konkrétní nádorové buňky použitím různých specifických protilátek [69].

Laserová skenovací cytometrie

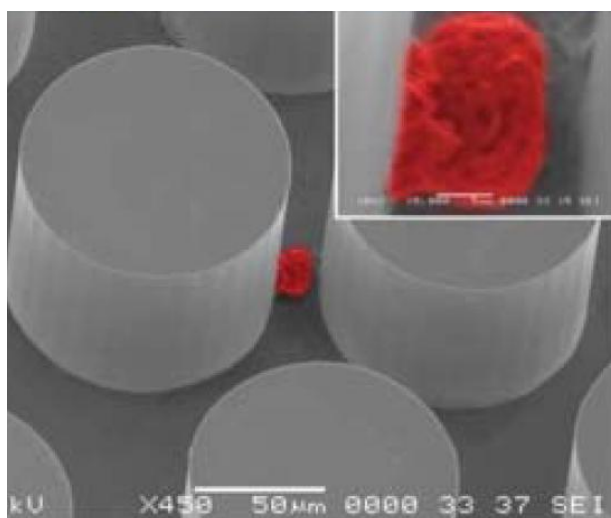
Tato metoda slouží k analýze CTC, které jsou nejprve značeny navázáním specifických protilátek konjugovaných s fluorochromem. Následně jsou CTC analyzovány průtokovým cytometrem s laserem indukovanou fluorescencí [71].

CTC ze vzorku plné krve je nutné nejprve obohatit pro zvýšení citlivosti detekce, protože průtoková cytometrie by měla sama o sobě nízkou účinnost. K obohacení se používá např. filtrace přes polykarbonátový filtr nebo imunomagnetická separace. Dále následuje značení specifickými fluorescenčně značenými protilátkami proti epiteliálním antigenům. Mezi využívané povrchové antigeny patří molekula EpCAM a cytokeratiny. Ze vzorku je dále nutné vyloučit leukocyty, protože by mohly zapříčinit falešně pozitivní nález. K jejich vyloučení se využívá fluorescenční značení leukocytárního antigenu CD45. Pak již následuje analýza průtokovým cytometrem, který zaznamenává signál jednotlivých procházejících buněk [72].

Samotná identifikace značených buněk je velmi rychlá, vysoce specifická a navíc umožňuje morfologickou analýzu jednotlivých buněk a rozlišuje živé buňky od neživých. Použitím různých specifických protilátek můžeme stanovit různé s nádorem asociované povrchové antigeny. Je využívána ke sledování protinádorové terapie a detekci zbytkového nádorového onemocnění [73].

CTC-čip

Tato metoda využívá čipové technologie s mikrofluidními prvky. Rozměry tohoto CTC-čipu jsou pouze 25 x 66 mm, vnitřní plocha s mikrosloupkou zaujímá plochu 19 x 51 mm a obsahuje 78 000 mikrosloupek o kruhovém průřezu s celkovou plochou 970 mm². Mikrosloupky jsou vysoké 100 μm a jejich průměr je rovněž 100 μm. Průměrná vzdálenost mezi nimi je 50 μm. Mikrostruktura je vyleptána do křemíkové matrice Silex metodou DRIE, hlubokým iont-reaktivním leptáním. Na mikrosloupky jsou následně kovalentně navázány protilátky anti-EpCAM [36]. Detail struktury CTC-čipu je na obrázku č. 14.



Obrázek 14: Detail CTC-čipu pořízený pomocí elektronové mikroskopie (převzato z [36]).

Obrázek ukazuje chycenou nádorovou buňku plic NCI-H1650 zobrazenou červeně.

Velkou výhodou tohoto čipu je, že může analyzovat CTC z plné krve bez předchozích úprav, při kterých dochází ke snížení počtu cílových buněk. Uspořádání čipu je velmi šetrné k buňkám, maximální smykové napětí má hodnotu 0,4 dyn/cm², pokud by bylo příliš vysoké, buňka by na mikrosloupku nezůstala. Důležitým parametrem ovlivňujícím účinnost záchytu je také rychlost toku, protože ovlivňuje dobu kontaktu buňky s mikrosloupkem, při rychlosti vyšší než 2 ml za hodinu účinnost výrazně klesá. Důležité je, že při analýze CTC-čipem zůstávají téměř všechny buňky živé a můžeme je dál studovat [74].

CTC-čip byl testován na 116 vzorcích krve od pacientů s metastatickými nádory plic, prostaty, slinivky, prsu a tlustého střeva a CTC byly identifikovány u 115 vzorků, čili s citlivostí převyšující 99 % a 100 % přesností. Množství stanovených CTC se pohybovalo v desítkách až stovkách v 1 ml krve. Čistota stanovených CTC byla přes

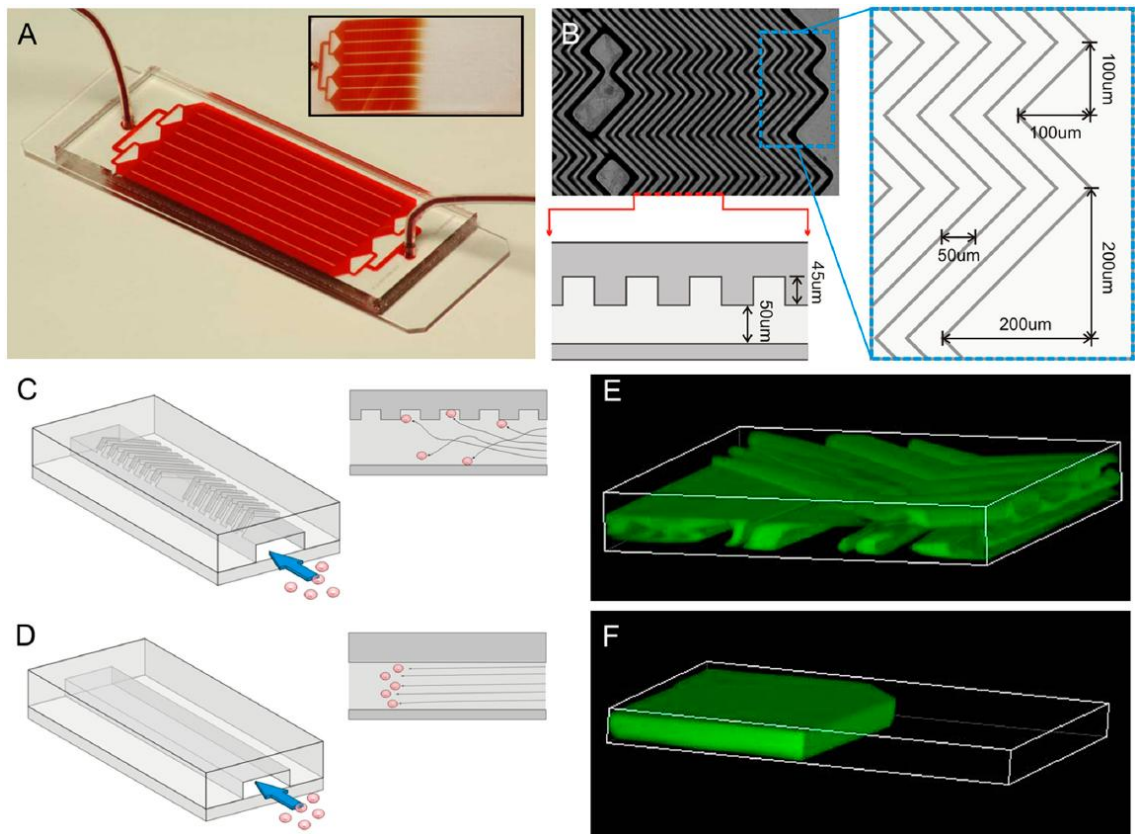
50 %, podle druhu nádoru. Jako CTC byly určeny buňky značené CK⁺/DAPI⁺/CD45⁻ [36].

Nevýhodou této metody je, že zatím není komerčně dostupná a není automatizovatelná. Prozatím byly na CTC-čip pouze vázány protilátky proti molekule EpCAM. Další nevýhodou také je vysoká cena CTC-čipu a možnost pouze jednoho použití [36].

Herringbone-čip

Herringbone-čip (HB-čip) je pokračováním vývoje CTC-čipu. Skládá se ze dvou skleněných destiček spojených polydimetylsiloxanem obsahujících osm kanálků. Využívá pasivního generování mikrovírů pomocí důmyslné sítě rýh na horní straně mikrokanálků, tvořících tzv. strukturu do stromečku, zobrazenou na obrázku č. 15. Na stěně kanálků jsou imobilizované protilátky proti specifickému znaku nádorových buněk, tj. EpCAM.

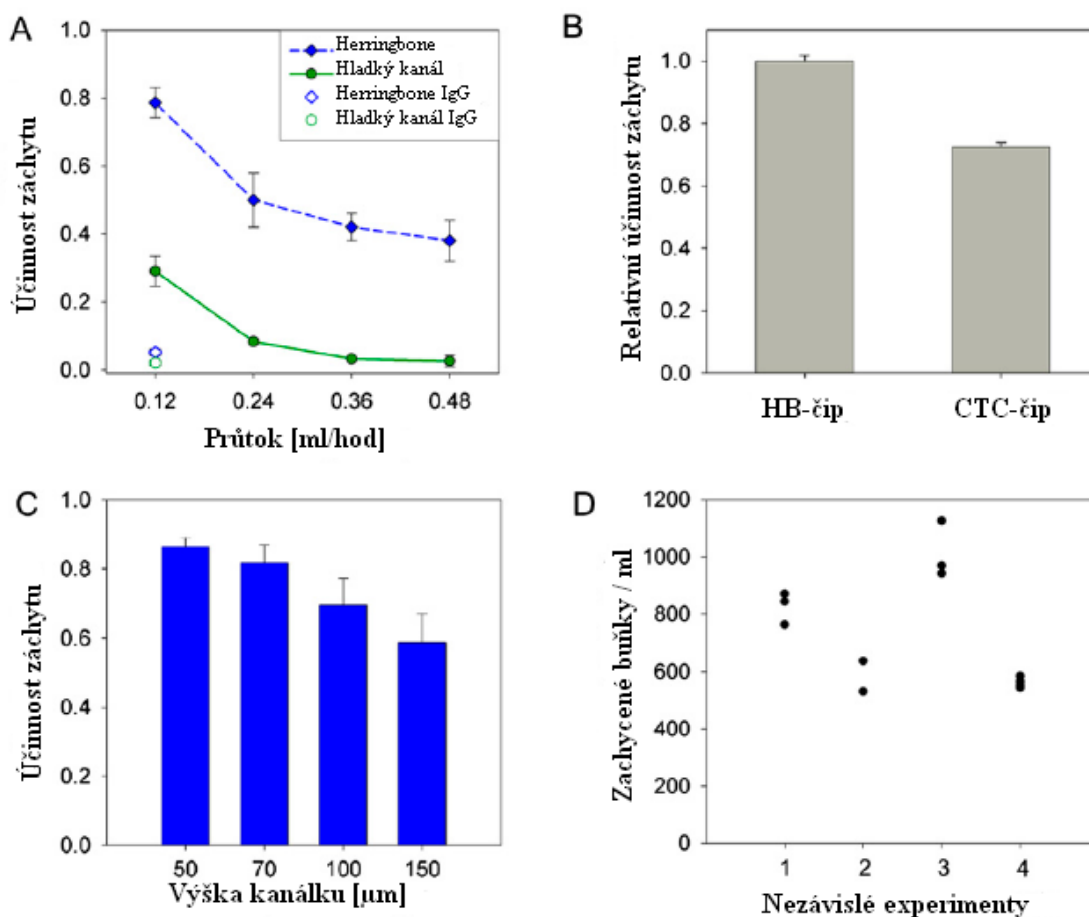
V porovnání s čipem s hladkou stěnou, HB-čip tvořící víry zabraňuje laminárnímu proudění a tudíž zvyšuje interakci buněk s protilátkami na povrchu mikrokanálků. Generování virů nezávisí ani na rychlosti průtoku vzorku čipem, ani na viskozitě, tudíž rozdíly mezi jednotlivými vzorky krve pacientů neovlivňují jejich míchání [75].



Obrázek 15.: Zobrazení průtoku v HB-čipu a porovnání s čipem s hladkou stěnou (převzato z [29]).

(A) HB-čip se skládá z mikroprůtokového uspořádání kanálků s jedním vstupem a výstupem. Obrázek ukazuje rovnoměrný tok krve zařízením. (B) Mikroskopie čipu ukazuje asymetrii a opakování zářezů na vnitřní stěně kanálku. Na dalším obrázku vidíme rozdíl mezi interakcí buněk s povrchem HB-čipu (C) a tradičního čipu s rovnou stěnou (D). Studie znázorňující tok využívající dvě tekutiny o stejné viskozitě (jedna je zelená, druhá čirá) ukazují chaotické mikrovíry tvořené v HB-čipu (E) a proud bez míchání v klasickém čipu s hladkou stěnou (F).

Pro testování účinnosti záchytu buněk se používají buňky s relativně nízkou expresí molekuly EpCAM, PC3, které se přimíchávají do kontrolní krve. Srovnání HB-čipu s CTC-čipem je na obrázku č. 16.



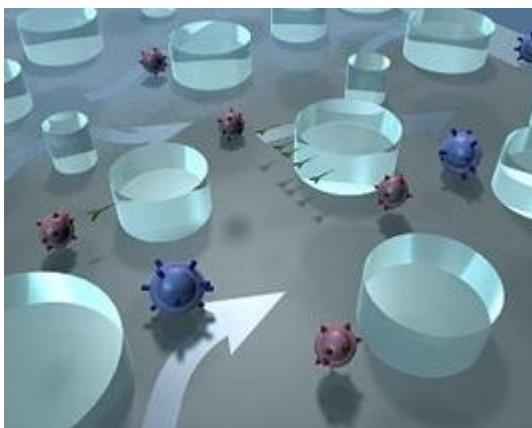
Obrázek 16.: Optimalizace HB-čipu a porovnání s CTC-čipem (převzato z [29]).

(A) Pro optimalizaci byly použity buňky PC3 smíšené s plnou krví o koncentraci 1000 buněk/ml a analyzované malou verzí HB-čipu (1 kanál, výška 70 μm , $\alpha = 0,43$) a čip s hladkou stěnou (výška 100 μm). Účinnost je ukázána pro obě zařízení a navíc byly použity IgG kontroly. (B) Porovnání relativní účinnosti záchytu mezi HB-čipem v plné velikosti (výška 50 μm , $\alpha = 0,8$) a skleněného CTC-čipu. Pro data v (B) byl připraven vzorek krve s přimícháním buněk PC3 o výsledné koncentraci 500 buněk/ml a rozdělen pro oba čipy. Kvůli drobným odchylkám v koncentracích, účinnost záchytu HB-čipu je stanovena vyšší než 100% ($112,4\% \pm 1,8\%$, $n = 4$). Následně byly data normalizovány k HB-čipu. (C) Proměnlivost výšky kanálku má minimální vliv na účinnost, pokud se výška kanálku nezvýší trojnásobně. (D) Rozptyl je ukázán na čtyřech různých experimentech, každý s jinou koncentrací PC3 buněk v krvi.

HB-čip je schopný kromě jednotlivých buněk také zachytit shluky nádorových buněk z krve pacientů, tzv. cirkulující nádorové mikroemboly (CTM), tvořené 4-12 buňkami. Podařilo se je stanovit ve třech vzorcích krve z celkového počtu devatenácti, od pacientů s metastatickým nádorem prostaty nebo plic. Tyto CTM nebyly nikdy izolovány pomocí CTC-čipu, protože je navržen tak, aby jím procházely pouze jednotlivé buňky, ani se nepodařilo stanovit pomocí imunomagnetické separace [29].

Mikrofluidní systém CEE™

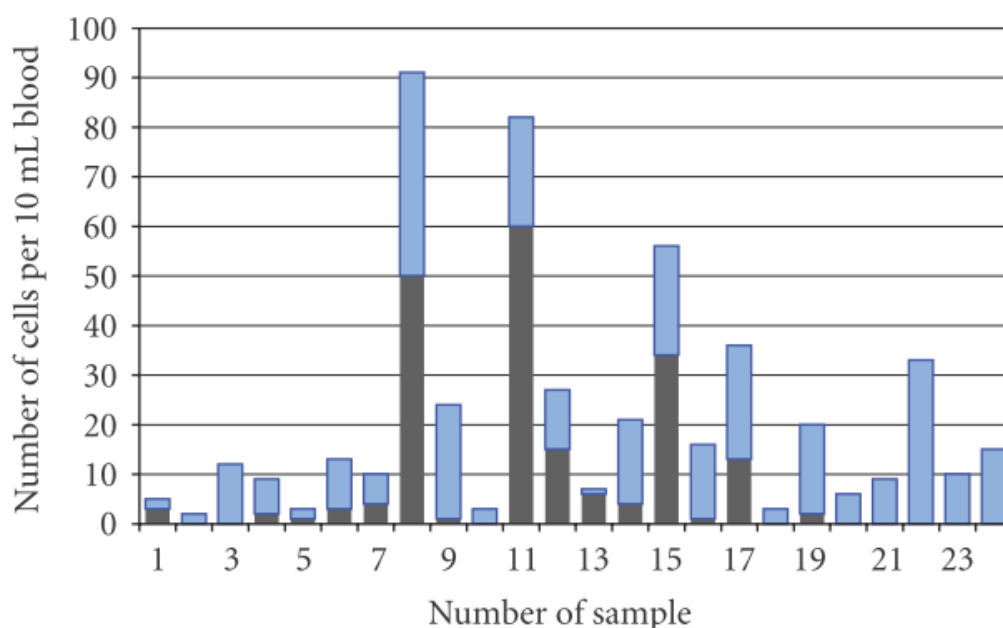
Toto mikrofluidní zařízení vyvinuté firmou Biocept pro analýzu nádorových buněk se skládá z mikrokanálku vysokého 50 μm obsahující zhruba 9 000 sloupeků o objemu okolo 24 μl . Struktura mikrofluidního kanálku je znázorněna na obrázku č. 17.



Obrázek 17.: Virtuální zobrazení mikrofluidního kanálku systému CEE™ (převzato z [76]).

Na mikrosloupky jsou pak vázány protilátky proti povrchovým znakům nádorových buněk. Díky průhlednému materiálu můžeme chycené buňky pozorovat světelným nebo fluorescenčním mikroskopem. Můžeme proto barvit buňky imunofluorescenčně přímo v mikrokanálku nebo provést fluorescenční *in situ* hybridizaci. Buňky se dají z mikrokanálků také uvolnit zvýšením průtoku a tudíž i smykového napětí a koncentrovat je pro analýzu DNA pomocí PCR [76].

Jelikož je známé, že některé CTC mohou prodělat EMT a ztratit tak epiteliální markery a nebyly by detekovány pomocí protilátek anti-EpCAM a anti-CK, proto byla vyvinuta směs protilátek proti epitelovým a mezenchymálním povrchovým znakům CEE-Enhanced, která se používá jak k vazbě na mikrosloupky, tak i k následné imunocytochemické detekci. Konkrétní specifitu protilátek CEE-Enhanced firma neudává [77]. Zvýšení účinnosti izolace požitím směsi protilátek CEE-Enhanced dokládá obrázek č. 18.



Obrázek 18.: Porovnání počtu CTC identifikovaných pomocí protilátek anti-EpCAM a anti-CK se směsí protilátek CEE-Enhanced (převzato z [78]).

Analýza vzorků krve 24 pacientů ve čtvrtém stádiu nádoru prsu. Buňky byly barveny nejdříve anti-CK protilátkami a pak směsí protilátek CEE-Enhanced. Pro záchyt buněk byla použita směs protilátek CEE-Enhanced. Černé sloupce odpovídají buňkám detekovaných pomocí anti-CK protilátek a horní modré následnému barvení pomocí směsi protilátek CEE-Enhanced. Všechny buňky označené jako CTC byly CD45⁻ a DAPI⁺.

Nevýhodou této metody však je to, že analýza neprobíhá přímo z plné krve, ale je nutné předchozí obohacení CTC pomocí hustotního gradientu. Analýza CTC, které nemají charakteristiku epiteliálních buněk, však může vést k novým diagnostickým aplikacím analýzy CTC [78].

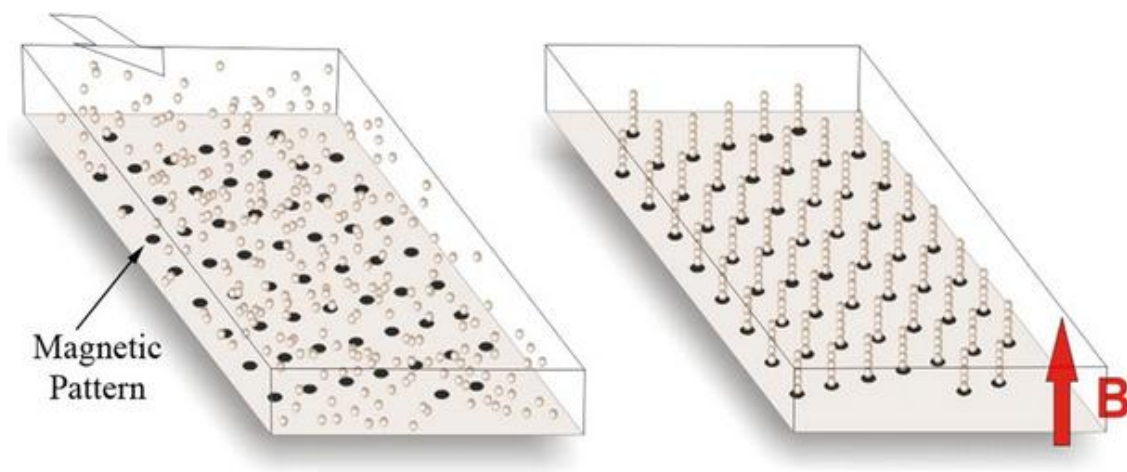
System Ephesia

Toto mikroprůtokové zařízení slouží k záchytu a následné imunofenotypizaci a morfologické analýze cirkulujících nádorových buněk. Umožňuje také zachycené buňky dále kultivovat *in situ* [79].

Princip tohoto zařízení spočívá v imunomagnetické separaci. Magnetické částice jsou uspořádány do sloupků v mikrokanálku kolem kterých protéká vzorek plné krve a cílové buňky jsou vázány na nosič [80].

Nejdříve se do mikrokanálku napustí suspenze superparamagnetických částic a aplikuje se magnetické pole. Následně se částice uspořádají do sloupků v místě magnetického terče a přebytečný nosič je odplaven z kanálku. Mikrokanálek s částicemi je znázorněn na obrázku č. 19. Pak už následuje analýza vzorku plné krve o objemu 7,5 ml. Cílové buňky se vážají svými povrchovými antigeny na sloupky magnetických

částic s imobilizovanými protilátkami. Následuje cytologické barvení nebo kvantitativní fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Vizualizace se provádí pomocí konfokální světelné a fluorescenční mikroskopie přímo v mikrokanálku. Tento systém umožňuje zároveň cytomorfoloickou a imunofenotypizační analýzu buněk. Celý tento systém je již plně automatizovatelný [79].



Obrázek 19.: Zobrazení mikrokanálku systému Ephesia s nosičem (převzato z [80]).

Vlevo je zobrazen mikrokanálek s nosičem bez přítomnosti magnetického pole a vpravo jsou znázorněny sloupky magnetických částic vytvořené po aplikaci magnetického pole.

Specificita a účinnost izolace tohoto systému byla testována pomocí směsných vzorků různých buněčných linií. Účinnost byla stanovena vyšší než 90 % a specificita lepší než 99 %. Pak také byla provedena izolace B lymfocytů přímo z krve pacientů s leukémií a následná imunofenotypizace a cytomorfoloická analýza přímo v mikrokanálku [80].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Přístroje:

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Goettigen, D)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, D)
- pH metr ORION model 420Aplus (Orion Reseach Inc., Beverly, MA, USA)
- magnetické míchadlo MM4 (LAVAT a. s. Chotutice, Radim u Kolína, ČR)
- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- topné hnízdo Grant-bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- software ImageJ pro denzitometrické vyhodnocení gelů (volně ke stažení z <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga Labofuge 400 (Heraeus Instruments, Hanau, Německo)
- rotační vakuový koncentrátor RVC 2-18 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Německo)
- biologický termostat BT 120 M (Laboratorní přístroje Praha, Praha, ČR)
- vertikální rotátor Grant-bio PTR-30 (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- spektrofotometr Biophotometr 6131 (Eppendorf, Hamburg, D)
- spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Multiscan RC, type 351 + software Genesis (Labsystems, Helsinky, Finsko)
- třepačka BioVortex V1 (Biosan, Riga, LTV)
- ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex Digitech, Londýn, UK)
- fluorescenční mikroskop Nikon (Nikon Corporation, Tokio, J)

Pomůcky:

- kyvety UVette[®], optická délka 10 mm (Eppendorf, Hamburg, D)
- mikrotitrační destičky – typ P, 96 jamek, polystyrenové (KOH-I-NOOR Hardtmuth a.s., České Budějovice, ČR)
- odsolovací kolonky MikroSpin[™] G-25 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
- magnetický separátor Dynal MPC-S (Dynal, Carlsbad, CA, USA)
- Hamiltonova stříkačka – 250 µl (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

- Bürkerova komůrka
- Podložní a krycí sklička

Magnetické částice:

- **Magnetické částice Sera-Mag® (Seradyn, Indianapolis, IN, USA)**
Superparamagnetické částice velikosti 0,771 μm , s množstvím aktivních funkčních skupin 0,528 mmol/g, hustotou 1,4 g/cm^3 , tvořené jádrem z polystyrenu obaleného vrstvou magnetického materiálu a polymerem s karboxylovou funkční skupinou.
- **Magnetické částice Dynabeads® M270 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, N)**
Superparamagnetické částice velikosti 2,8 μm , s množstvím aktivních funkčních skupin 0,15 mmol/g, hustotou 1,6 g/cm^3 , tvořené jádrem z polystyrenu a povrchem s navázaným glycidyl éterem s karboxylovou funkční skupinou.
- **Magnetické částice – Ústav makromolekulární chemie Akademie Věd ČR (ÚMCH AV ČR, Praha, ČR)**
Superparamagnetické částice velikosti 3,9 μm , s množstvím aktivních funkčních skupin 0,2 mmol/g, hustotou 6,7 g/cm^3 , tvořené poly(glycidyl metakrylátem) a etylen dimetakrylátem (PGMA), s funkční skupinou karboxylovou.
- **Dynabeads® Epitelial Enrich (Invitrogen Dynal AS, Oslo, N)**
Superparamagnetické polystyrenové částice velikosti 4,5 μm s imobilizovanými myšími monoklonálními protilátkami anti-EpCAM izotypu IgG1.

3.1 Imobilizace IgG na částice s karboxylovou funkční skupinou

Chemikálie:

- 2-(N-morfolin-4-yl)etansulfonová kyselina (MES, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDAC, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (sulfo-NHS, $\text{C}_4\text{H}_4\text{NNaO}_6\text{S}$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- azid sodný (NaN_3) (Chemapol Limited, Londýn, UK)
- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Roztoky:

- *vazebný roztok:* 0,1 M MES pufr pH 5
- *promývací roztok:* PBS pufr pH 7,4
- *skladovací roztok:* PBS pufr pH 7,4 s 0,1% BSA
- vodný roztok 0,1 M azidu sodného

Protilátky:

- myší monoklonální anti-p53 protilátky třídy IgG2a (DO-1), (Dr. Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno, ČR)
- králičí polyklonální IgG anti-p53 protilátky (CM 1), (Dr. Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno, ČR)

Postup:

1 mg částic Sera-Mag a Dynabeads byl 5 x promyt vazebným roztokem, pak bylo k částicím přidáno 7,5 mg EDAC ve 250 μ l vazebného roztoku, 1,25 mg sulfo-NHS v 250 μ l vazebného roztoku, 100 μ g příslušných protilátek a celkový objem byl doplněn vazebným roztokem na 1 ml. Směs byla inkubována přes noc při 4 °C za otáčení. Druhý den byly částice 10 x promyty promývacím roztokem, pak byly resuspendovány v 1,5 ml skladovacího roztoku a bylo k nim přidáno 10 μ l 0,1 M azidu sodného.

3.2 Povrchová modifikace magnetických mikročástic polyetylen glykolem

Chemikálie:

- 2-(N-morfolin-4-yl)etansulfonová kyselina (MES, C₆H₁₃NO₄S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDAC, C₈H₁₇N₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (sulfo-NHS, C₄H₄NNaO₆S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- amin-PEG-biotin (2000 Da) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA)
- amin-PEG (2000 Da) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA)
- amin-PEG-karboxyl (3400 Da) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA)
- hydrazid-PEG-hydrazid (3400 Da) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA)

- amin-PEG-hydroxyl (3400 Da) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA)
- azid sodný (NaN₃) (Chemapol Limited, Londýn, UK)
- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Roztoky:

- 0,1 M MES pufr pH 5
- 0,01 M MES pufr pH 5
- 0,1 M fosfátový pufr pH 6,2
- 0,1 M fosfátový pufr pH 6,2 s 1 M NaCl
- 0,1 M azid sodný

Postup:

0,5 mg částic PGMA a Dynabeads bylo 4 x promyto 0,5 ml 0,1 M MES pufrém. Pak se k částicím přidalo 3,75 mg EDAC v 250 µl 0,01 M MES pufru a 0,625 mg sulfo-NHS v 250 µl téhož pufru. Následovala pětiminutová inkubace za otáčení při laboratorní teplotě. Poté bylo k částicím přidáno 500 µl rozpuštěného příslušného PEGu se zvolenou funkční skupinou (-COOH, -NH-NH₂, -OH, -NH₂), (1 mg/ml u PEGů s molekulovou hmotností 2000 Da, 1,7 mg/ml u PEGů s molekulovou hmotností 3400 Da, poměr funkčních skupin částic a PEGu 1:2,5) a následovala inkubace při 4 °C za otáčení přes noc. Druhý den byly částice 7 x promyty 0,1 M MES pufrém, 2 x fosfátovým pufrém, 1 x fosfátovým pufrém s 1 M NaCl a 1 x fosfátovým pufrém bez NaCl. Poté bylo ještě přidáno 10 µl azidu sodného k zakonzervování částic.

3.3 Stanovení množství navázaného polyetylen glykolu pomocí specifického konjugátu

Chemikálie:

- streptavidin-peroxidáza (kat. č. S5512-1MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- *o*-fenylendiamin (OPD, C₆H₈N₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 6,2
- 0,1 M fosfátový pufr pH 6,2 s 1 M NaCl

- vodný roztok streptavidin-HRP o koncentraci 1 µg/ml
- *substrátový roztok*: 10 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 6,2 s 2,5 mg OPD a 7,5 µl 30% peroxidu vodíku
- 1 M kyselina sírová
- 0,1 M fosfátový pufr pH 6,2

Postup:

Od vzorků s navázaným PEG s biotinem (2000 kDa), s PEG bez biotinu (2000 kDa) a vzorku bez PEG připraveným podle kapitoly 3.2, bylo odpipetováno 0,1 mg částic, které byly resuspendovány v 10 µl fosfátového pufru a bylo k nim přidáno 90 µl roztoku konjugátu. Následovala inkubace 30 minut za otáčení při laboratorní teplotě. Poté byly částice 3 x promyty fosfátovým puftrem, 1 x fosfátovým puftrem s 1 M NaCl a 6 x fosfátovým puftrem bez NaCl.

30 µg promytých částic bylo resuspendováno ve 100 µl fosfátového pufru a bylo k nim přidáno 100 µl substrátového roztoku. Následovala desetiminutová inkubace při 37 °C za otáčení. Pak byl odpipetován supernatant do 33 µl kyseliny sírové. Následně byla proměřena absorbance objemu 100 µl v mikrotitrační destičce při 492 nm.

3.4 Vazba IgG na magnetické mikročástice modifikované polyetylen glykolem

Chemikálie:

- 2-(N-morfolin-4-yl)etansulfonová kyselina (MES, C₆H₁₃NO₄S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDAC, C₈H₁₇N₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (sulfo-NHS, C₄H₄NNaO₆S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- NaIO₄, p.a. (Reanal, Budapešť, HU)
- etylenglykol (C₂H₆O₂) (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- glycerinaldehyd (C₃H₆O₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyanoborohydrid sodný (CH₃BNNa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- triacetoxyborohydrid sodný (C₆H₁₀O₆BNa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Protilátky:

- lidský imunoglobulin G (huIgG), (kat. č. I4506-100MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- myší monoklonální anti-p53 protilátky třídy IgG2a (DO-1), (Dr. Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno, ČR)
- protilátky anti-EpCAM (Santa Cruz Biotechnology, St. Cruz, USA)

Roztoky:

- 0,01 M MES pufr pH 5
- PBS pufr pH 7,4
- 0,1 M acetátový pufr pH 4,6 s 0,2 M NaCl
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,2 M NaIO₄
- 0,1 M glycerinaldehyd v acetátovém pufru pH 4,6 s 0,2 M NaCl
- vodný roztok huIgG o koncentraci 1 mg/ml
- vodný roztok kyanoborohydridu sodného o koncentraci 30 mg/ml
- vodný roztok triacetoxyborohydridu sodného o koncentraci 30 mg/ml

3.4.1 Vazba IgG na částice potažené polyetylen glykolem s karboxylovou funkční skupinou

Metoda A – jednokrokově s použitím EDAC i sulfo-NHS

Postup:

K 0,5 mg částic PGMA-PEG-COOH připravených podle kapitoly 3.2 se přidalo 3,75 mg EDAC ve 100 μ l MES pufru, 0,625 mg sulfo-NHS ve 100 μ l téhož pufru, 50 μ g příslušných protilátek a celkový objem byl doplněn MES pufrům na 500 μ l. Imobilizace probíhala při 4 °C za otáčení přes noc. Poté byl imunosorbent promyt 10 x PBS pufrům.

Metoda B – jednokrokově s použitím EDAC

Postup:

K 0,5 mg částic PGMA-PEG-COOH připravených podle kapitoly 3.2 se přidalo 3,75 mg EDAC ve 100 μ l MES pufru, 50 μ g příslušných protilátek a celkový objem byl doplněn MES pufrem na 500 μ l. Imobilizace probíhala při 4 °C za otáčení přes noc. Poté byl imunosorbent promyt 10 x PBS pufrem.

Metoda C – dvoukrokově s použitím EDAC i sulfo-NHS

Postup:

K 0,5 mg částic PGMA-PEG-COOH připravených podle kapitoly 3.2 se přidalo 3,75 mg EDAC ve 250 μ l MES pufru, 0,625 mg sulfo-NHS ve 250 μ l téhož pufru a následovala inkubace 10 minut za otáčení při laboratorní teplotě. Poté se odstranil supernatant a přidalo se k částicím 50 μ g příslušných protilátek a celkový objem byl doplněn na 500 μ l MES pufrem. Imobilizace probíhala při 4 °C za otáčení přes noc. Poté byl imunosorbent promyt 10 x PBS pufrem.

Metoda D – dvoukrokově s použitím EDAC

Postup:

K 0,5 mg částic PGMA-PEG-COOH připravených podle kapitoly 3.2 se přidalo 3,75 mg EDAC ve 250 μ l MES pufru, 250 μ l téhož pufru a následovala inkubace 10 minut za otáčení při laboratorní teplotě. Poté se odstranil supernatant a přidalo se k částicím 50 μ g příslušných protilátek a celkový objem byl doplněn na 500 μ l MES pufru. Imobilizace probíhala při 4 °C za otáčení přes noc. Poté byl imunosorbent promyt 10 x PBS pufrem.

3.4.2 Vazba IgG na částice potažené polyetylglykolem s hydrazidovou funkční skupinou

Postup:

K 1,25 mg NaIO₄ bylo přidáno 250 μ g příslušných protilátek v 250 μ l redestilované vody a následovala inkubace 30 minut při laboratorní teplotě za otáčení ve tmě, pak byla reakce zastavena přidáním 0,5 μ l etylenglykolu a inkubace pokračovala ještě 10 minut. 125 μ g zoxidovaných protilátek bylo odsoleno pomocí PD SpinTrap G-25 kolonek.

Kolonka byla jemně promíchána, byl odstraněn skladovací roztok (centrifugace 1 minutu při 800 g), 5 x byla ekvilibrována 300 µl acetátového pufru (centrifugace 1 minutu při 800 g), na kolonku byl aplikován roztok protilátek a kolonka byla centrifugována 2 minuty při 800 g.

K 0,5 mg částic PGMA-PEG-NH-NH₂ připravených podle kapitoly 3.2 bylo přidáno 50 µg zoxidovaných (nebo zoxidovaných a odsolených) protilátek a celkový objem byl doplněn na 500 µl acetátovým pufrem. Následovala inkubace přes noc při laboratorní teplotě za otáčení. Druhý den byly částice 5 x promyty acetátovým pufrem, pak následovala blokáce 0,5 ml glycerinaldehydu pro odstranění nezreagovaných funkčních skupin po dobu 1 hodiny za otáčení při laboratorní teplotě a nakonec byl imunosorbent promyt 3 x acetátovým a 3 x PBS pufrem.

3.4.3 Vazba IgG na částice potažené polyetylen glykolem s hydroxylovou funkční skupinou

Postup:

K 0,5 mg částic PGMA-PEG-OH připravených podle kapitoly 3.2 bylo přidáno 250 µl fosfátového pufru a 250 µl roztoku NaIO₄, pak proběhla inkubace 90 minut ve tmě při laboratorních podmínkách za otáčení. Poté se částice 5 x promyly fosfátovým pufrem, přidalo se k nim 50 µg příslušných protilátek a celkový objem byl doplněn na 450 µl acetátovým pufrem (odebral se původní vzorek na elektroforézu). Částice byly inkubovány 10 minut při laboratorních podmínkách za otáčení.

Poté se k suspenzi imunosorbentu přidalo 50 µl roztoku kyanoborohydridu sodného (triacetoxyborohydridu sodného) a proběhla inkubace přes noc při 4 °C za otáčení. Druhý den se částice promyly 10 x PBS pufrem.

3.5 Imunoprecipitace proteinu p53 z buněčného lyzátu

Chemikálie:

- kyselina trifluoroctová (C₂HF₃O₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- azid sodný (NaN₃) (Chemapol Limited, Londýn, UK)
- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Roztoky:

- PBS pufr pH 7,4
- 0,1 M fosfátový pufr s 0,2 M NaCl

- 0,1 M fosfátový pufr s 1 M NaCl
- 0,1 M fosfátový pufr
- 0,05% TFA
- 0,1 M azid sodný

3.5.1 Imunosorbenty bez povrchové modifikace

Imunosorbenty:

- Sera-Mag-COOH + anti-p53 DO-1 (monoklonální)
- Sera-Mag-COOH + anti-p53 CM 1 (polyklonální)
- Dynabeads-COOH + anti-p53 DO-1 (monoklonální)
- Dynabeads-COOH + anti-p53 CM 1 (polyklonální)

Lyzáty buněčných linií:

- MDA MB-468 (obsahuje p53, pozitivní kontrola), (Dr. Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno)
- H1299 (negativní vzorek na p53, negativní kontrola), (Dr. Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno)

Postup:

Nejdříve bylo naředěno 160 μ l lyzátu 1840 μ l redestilované vody a 1 mg každého imunosorbentu připraveného podle kapitoly 3.1 byl promyt 5 x 1,5 ml PBS pufru a 2 x 1,5 ml redestilované vody. Pak k částicím bylo přidáno 500 μ l ředěného buněčného lyzátu a proběhla inkubace přes noc (16 – 20 hodin) při 4 °C za otáčení. Druhý den byly částice 10 x promyty 1,5 ml fosfátového pufru s 0,2 M NaCl, 5 x 1,5 ml fosfátového pufru s 1 M NaCl a 5 x 1,5 ml fosfátového pufru. Následně byla 3 x provedena eluce 200 μ l TFA po 15 minutách za otáčení při laboratorní teplotě. Eluční frakce byly zkoncentrovány do sucha a pak rozpuštěny v 15 μ l redestilované vody. Imunosorbenty byly 2 x promyty 1,5 ml TFA (regenerace), 5 x 1,5 ml PBS pufru a bylo k nim přidáno 10 μ l konzervačního činidla azidu sodného.

3.5.2 Imunosorbenty s povrchovou modifikací polyetylen glykolem

Imunosorbenty:

- PGMA-COOH + amine-PEG-carboxyl + anti-p53 DO-1 (monoklonální)
- PGMA-COOH + hydrazide-PEG-hydrazide + anti-p53 DO-1 (monoklonální)
- PGMA-COOH + amine-PEG-hydroxyl + anti-p53 DO-1 (monoklonální)

Lyzáty buněčných linií:

- H1299 (negativní vzorek na p53, negativní kontrola), (Dr. Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno, ČR)
- MCF 7 (obsahuje p53, pozitivní kontrola), (Dr. Vojtěšek, Masarykův onkologický ústav, Brno, ČR)

Ředění lyzátu:

- 140 µl lyzátu H1299 + 1610 µl redestilované vody
- 200 µl lyzátu MCF 7 + 1550 µl redestilované vody

Postup:

0,5 mg imunosorbentů připravených podle návodu v kapitole 3.4 bylo promyto 5 x 1,5 ml PBS pufru a 2 x 1,5 ml redestilované vody. Pak k částicím bylo přidáno 250 µl ředěného buněčného lyzátu a proběhla inkubace přes noc (16 – 20 hodin) při 4 °C za otáčení. Druhý den byly částice 10 x promyty 0,75 ml fosfátového pufru s 0,2 M NaCl, 5 x 0,75 ml fosfátového pufru s 1 M NaCl a 5 x 0,75 ml fosfátového pufru. Následně byla 3 x provedena eluce 200 µl TFA po 15 minutách za otáčení při laboratorní teplotě. Eluční frakce byly zakoncentrovány do sucha a pak rozpuštěny v 15 µl redestilované vody. Imunosorbenty byly 2 x promyty 0,75 ml TFA (regenerace), 5 x 0,75 ml PBS pufru a bylo k nim přidáno 10 µl azidu sodného.

3.6 Počítání rozet magnetických částic s buňkami

Chemikálie:

- hovězí sérový albumin (BSA) (kat. č. A7906-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Roztoky:

- PBS pufr pH = 7,4 s 0,1% BSA

Imunosorbenty:

- PGMA-PEG-anti-EpCAM
- Dynabeads® Epitelial Enrich (Invitrogen Dynal AS, Oslo, N)

Buněčné linie:

- **MCF7 (ATCC, Rockville, Maryland, USA)**
Buněčná linie adenokarcinomu prsu získaná od 69-leté ženy, EpCAM pozitivní.
- **JURKAT (Fujisaki Cell Center, Okayama, J)**
Buněčná linie T buněk získaná od 14-letého chlapce s akutní lymfoblastickou leukémií, EpCAM negativní.
- **SKBR3 (DSMZ, Braunschweig, D)**
Buněčná linie nádoru prsu získaná od 43-leté ženy, EpCAM pozitivní.
- **A549 (GBF, Braunschweig, D)**
Buněčná linie nádoru plic získaná od 58-letého muže, EpCAM pozitivní.
- **Raji (Fujisaki Cell Center, Okayama, J)**
Buněčná linie získaná od 12-letého chlapce s Burkittovým syndromem, EpCAM negativní.

Postup:

Nejdříve bylo odpipetováno 15 μ l originální suspenze částic Dynabeads Epithelial Enrich (PK) obsahující 0,5 mg částic a třikrát byly promyty PBS pufrem pH = 7,4 s 0,1% BSA. Stejně bylo promyto i 0,5 mg připraveného imunosorbentu PGMA-PEG-anti-EpCAM podle návodu v kapitole 3.4.2 s odsolením protilátek. Pak byl od imunosorbentů odtážen supernatant a byl k nim napipetován 1 ml suspenze příslušných buněk (připravila Mgr. Svobodová). Následně proběhla inkubace 30 minut za otáčení při laboratorní teplotě.

Pak byly imunosorbenty s navázanými buňkami pětikrát promyty 1 ml PBS pufru pH = 7,4 s 0,1% BSA. Následovalo počítání rozet v Bürkerově komůrce ve velkých čtvercích.

3.7 Diskontinuální polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným

Chemikálie:

- akrylamid (C_3H_5NO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-(hydroxymetyl)-aminometan ($C_4H_{11}NO_3$) (Penta, Praha, ČR)
- dodecylsulfát sodný (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$) (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

- persíran amonný ((NH₄)₂S₂O₈) (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED, C₆H₁₆N₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- glycerol (C₃H₈O₃) (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- bromfenolová modř (C₁₉H₁₀O₅Br₄S) (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- glycin (C₂H₂NO₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- molekulový marker Precision Plus Protein™ Standards – nebarvený, Mr 10 – 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Roztoky:

- *roztok A:* 30% směs akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu: 11,68 g akrylamidu a 0,32 g N,N'-metylen-bis-akrylamidu rozpustit ve 12 ml destilované vody, nechat bobtnat a doplnit destilovanou vodou na 40 ml
- *roztok B:* 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8
- *roztok C:* 1,0 M Tris-HCl pufr pH 6,8
- *roztok D:* 10% roztok SDS
- *roztok E:* 10% roztok persíranu amonného (připravit těsně před použitím!)
- *roztok G:* 0,1 M Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4% SDS, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří
- *elektrodový pufr:* 0,025 M Tris, 0,192 M glycin a 0,1% SDS, pH 8,3 – 8,6

Postup podle Laemmliho[81]:

Nejdříve byl připraven 10% dělicí gel a následně 5% zaostřovací gel dle tabulky 1.

Tabulka 1.: Příprava gelů pro SDS-PAGE

	10% dělicí gel [ml]	5% zaostřovací gel [ml]
destilovaná voda	2,0	1,4
roztok A	1,65	0,33
roztok B	1,25	-
roztok C	-	0,25
roztok D	0,05	0,02
roztok E	0,05	0,02
TEMED	0,002	0,002

Ke vzorkům byl napipetován roztok G v poměru 1:1, pak byly promíchány a povařeny v topném hnízdě při 100 °C po dobu 2 minut. Molekulový marker byl také povařen. Gely byly vloženy do elektroforetické vany, zality elektrodoým pufrem a do jamek byly napipetovány vzorky a molekulový marker. Dělení probíhalo při napětí 180 V a proudu 30 mA na jeden gel po dobu 50 minut.

3.8 Barvení akrylamidových gelů dusičnanem stříbrným

Chemikálie:

- glutaraldehyd ($C_5H_8O_2$) – 50% vodný roztok (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dusičnan stříbrný, p.a. ($AgNO_3$) (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)
- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Roztoky:

- *fixační roztok:* 5% kyselina octová a 50% etanol
- 10% glutaraldehyd (připravit před použitím!)
- 20% dusičnan stříbrný
- 9 M hydroxid sodný
- *vyvolávací roztok:* 0,05% kyselina citronová a 0,04% formaldehyd
- *ustalovací roztok:* 5% kyselina octová
- *roztok amoniakálního stříbra:* 20% roztok $AgNO_3$ byl přikapáván do směsi 21 ml destilované vody, 1,4 ml amoniaku a 239 μ l 9 M NaOH, až do vzniku zákalu, pak byl roztok doplněn destilovanou vodou na 100 ml

Postup podle Oakleye et al.[82]:

Po skončení elektroforézy byl gel propláchnut destilovanou vodou a přemístěn do fixačního roztoku, ve kterém zůstal přes noc při 4 °C. Druhý den byl gel rehydratován 30 minut v destilované vodě, poté inkubován v 10% glutaraldehydu a pak 6 x 10 minut promýván v destilované vodě. Po promytí následovala inkubace 15 minut v roztoku amoniakálního stříbra a opláchnutí destilovanou vodou. Pak byl gel vyvolán vyvolávacím roztokem a byl přemístěn do ustalovacího roztoku.

3.9 Stanovení proteinů pomocí Micro BCA testu

Chemikálie:

- Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)
- lidský imunoglobulin G (huIgG), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-(N-Morfolin-4-yl)etansulfonová kyselina (MES, C₆H₁₃NO₄S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDAC, C₈H₁₇N₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (sulfo-NHS, C₄H₄NNaO₆S) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- základní chemikálie čistoty p.a. (Lach-Ner a.s., Neratovice, ČR)

Postup:

Nejdříve byl připraven roztok IgG o koncentraci 2 mg/ml. Poté byla připravena kalibrační řada dle následující tabulky:

Tabulka 2.: Příprava kalibračních roztoků IgG

Označení roztoku	Voda	Roztok IgG	Koncentrace
A	450 µl	50 µl zásobního roztoku	200 µg/ml
B	800 µl	200 µl roztoku A	40 µg/ml
C	400 µl	400 µl roztoku B	20 µg/ml
D	400 µl	400 µl roztoku C	10 µg/ml
E	400 µl	400 µl roztoku D	5 µg/ml
F	400 µl	400 µl roztoku E	2,5 µg/ml
G	480 µl	320 µl roztoku F	1 µg/ml
H	400 µl	400 µl roztoku G	0,5 µg/ml

Dále byl připraven pracovní roztok smícháním reakčních činidel A, B a C v poměru 25:24:1. Pak se od všech roztoků pro kalibraci, vzorků a slepých vzorků odpipetovalo 150 µl do 0,5ml mikrozkušavek. Jako slepé vzorky byly vždy použity roztoky stejného složení, pouze neobsahující IgG, u částic byly jako slepé vzorky použity částice bez navázaných IgG, 0,1 mg nosiče resuspendovaná ve 150 µl PBS pufru. Ke vzorkům bylo přidáno 150 µl pracovního roztoku a následovala inkubace po dobu 2 hodin při 37 °C za stálého otáčení. Poté se od zreagované směsi odpipetovalo 200 µl do mikrotitrační destičky a změřila se absorbance při 570 nm.

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato práce je součástí projektu, jehož cílem bylo vyvinout bioaktivní nosič pro mikroprůtokové zařízení pro izolaci cirkulujících nádorových buněk z plné krve pacientů. Cílem teoretické části bylo shrnout aktuální informace o cirkulujících nádorových buňkách, jejich charakteristických vlastnostech a významu z pohledu diagnostiky a také uvést přehled metod, které se používají ve výzkumu a v klinické praxi pro jejich izolaci.

Experimentální část se věnovala přípravě magnetického imunosorbentu pro specifickou izolaci CTC s minimální nespecifickou sorpcí a porovnání připraveného imunosorbentu s komerčně dodávaným nosičem.

První část popisuje povrchovou modifikaci magnetických částic polyetylglykolem a následné porovnání účinnosti vazby modelových IgG na magnetické částice PGMA povrchově modifikovaných polyetylglykolem s funkčními skupinami karboxylovými, hydrazidovými nebo hydroxylovými.

Následujícím krokem bylo porovnat účinnost vazby monoklonálních a polyklonálních specifických protilátek anti-p53 na magnetické částice Sera-Mag a Dynabeads s karboxylovou funkční skupinou.

Dalším úkolem experimentální části bylo porovnat míru nespecifické sorpce připravených imunosorbentů s povrchovou úpravou a bez povrchové úpravy polyetylglykolem a schopnost těchto imunosorbentů izolovat protein p53 z lyzátů různých buněk.

Posledním cílem experimentální části bylo porovnat náš připravený imunosorbent s navázanými specifickými protilátkami proti molekule EpCAM s komerčně dostupným imunosorbentem Dynabeads® Epithelial Enrich při izolaci buněk s různou expresí povrchového antigenu EpCAM.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Naše práce spočívala v následujících dílčích krocích. Nejprve jsme modifikovali povrch magnetických částic polyetylenglykolem (PEG) a pak jsme na ně vážali odpovídající protilátky. Tyto protilátky jsme navázali i na nemodifikované částice, abychom mohli porovnat specifickou a nespecifickou sorpci těchto nosičů při izolaci proteinu p53 z buněčného lyzátu. Dále jsme modifikovaný nosič s navázanými anti-EpCAM protilátkami použili k izolaci buněk imunomagnetickou separací.

5.1 Povrchová modifikace magnetických částic polyetylenglykolem

Prvním úkolem bylo navázat PEG na magnetické částice Dynabeads-COOH a PGMA-COOH a ověřit, že skutečně došlo k vazbě. Proto jsme použili k vazbě PEG s navázaným biotinem (ve trojici) a jako slepé vzorky jsme použili PEG bez biotinu a roztok bez přidání PEGu. Vazbu PEG jsme prováděli podle kapitoly č. 3.2.

Pro stanovení navázaného PEG jsme využili biospecifické vazby streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou a biotinu, jež byl součástí PEGu. Postupovali jsme podle kapitoly č. 3.3. Výsledky účinnosti vazby PEG na magnetické částice jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka 3.: Výsledky vazby PEG na magnetické částice.

částice	1. opakování			2. opakování		
	Průměr A (492 nm) *	Neg. k. (PEG) A (492 nm)	Neg. k. (částice) A (492 nm)	Průměr A (492 nm) *	Neg. k. (PEG) A (492 nm)	Neg. k. (částice) A (492 nm)
Dynabeads	0,825	0,165	0,162	0,905	0,115	0,105
PGMA	0,874	0,285	0,338	0,869	0,249	0,296

* hodnoty vypočtené ze tří nezávislých měření

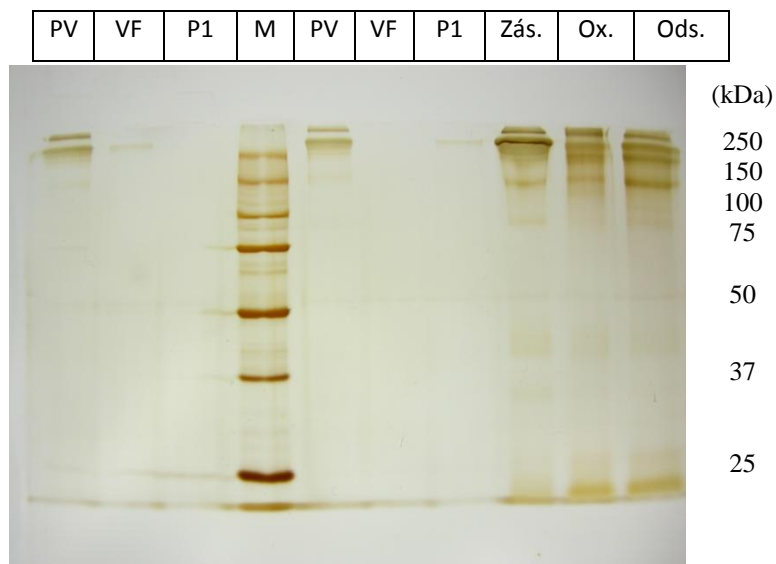
Naměřené hodnoty potvrdily, že PEG byl úspěšně navázán na magnetické částice Dynabeads-COOH a PGMA-COOH. Částice PGMA-COOH modifikované PEGem byly použity na další experimenty. Absolutní množství PEGu navázaného na povrch částic nebylo stanovováno. Přítomnost kovalentně navázaného PEGu na povrchu částic byla opakovaně potvrzena.

5.2 Testování různých způsobů vazby IgG na částice povrchově modifikované polyetylenglykolem

Dalším úkolem bylo porovnat účinnost různých metod kovalentní vazby modelových IgG pomocí funkčních skupin karboxylových, hydrazidových nebo hydroxylových přítomných na částicích. Pro tento úkol jsme si připravili dostatečné množství částic PGMA-COOH s vázaným PEGem s příslušnou funkční skupinou podle postupu v kapitole č. 3.2. Konkrétně jsme pro povrchovou modifikaci částic použili PEGy o molekulové hmotnosti 3400 kDa s koncovou funkční skupinou karboxylovou, hydrazidovou nebo hydroxylovou. Podle typu terminální funkční skupiny na konci molekul PEGu jsme navrhli způsob kovalentní vazby ligandu (nespecifické lidské IgG). Reakční podmínky byly nastaveny tak, že se k 0,5 mg PEG částic přidávalo 50 µg IgG a výsledná směs byla doplněna na 0,5 ml reakčního objemu.

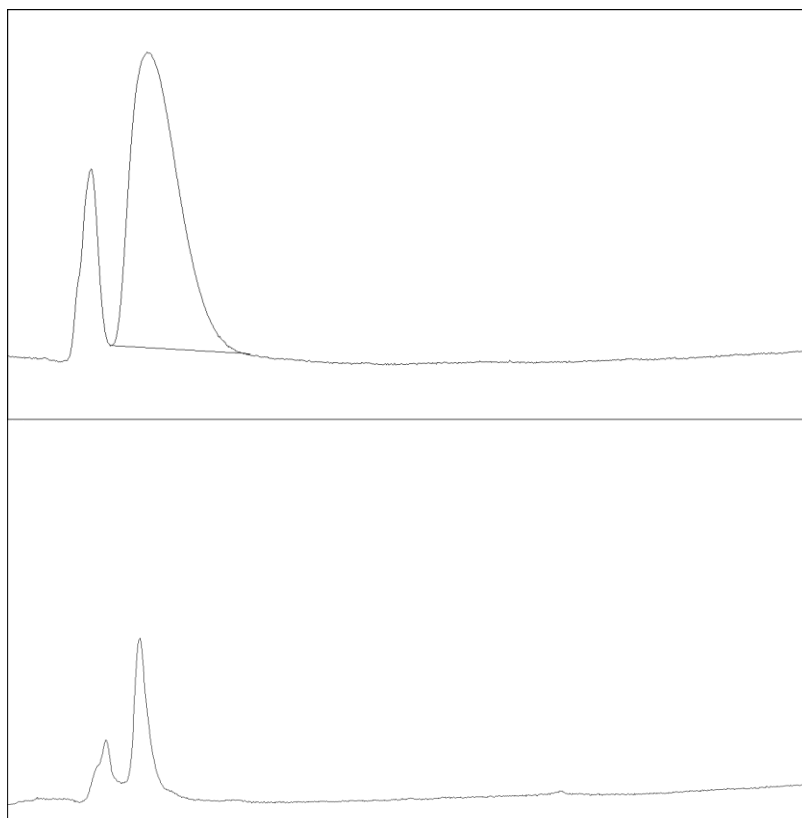
Při vazbě IgG pomocí karboxylové skupiny jsme porovnávali jednokrokovou a dvoukrokovou metodu vazby s použitím EDAC nebo s použitím EDAC a sulfo-NHS. Při vazbě IgG přes hydrazidovou skupinu jsme porovnávali účinnost vazby neodsolených a odsolených protilátek IgG po oxidaci (odstranění NaIO₄) a při vazbě protilátek IgG přes hydroxylovou skupinu jsme porovnávali účinnost vazby při použití kyanoborohydridu sodného nebo triacetoxyborohydridu sodného pro stabilizaci vazby. Postupovali jsme podle návodu v kapitole č. 3.4. Celkem jsme provedli imobilizaci IgG na modifikované částice třemi typy PEGu třikrát.

Stanovení účinnosti vazby na povrchově modifikované částice jsme provedli nepřímým porovnáním množství IgG v původním vzorku, ve vazebné frakci a v promývacích frakcích pomocí metody SDS-PAGE popsané v kapitole č. 3.7. Gely jsme barvili dusičnanem stříbrným podle postupu v kapitole č. 3.8 a vyhodnocovali pomocí softwaru ImageJ. Ukázka gelu je na obrázku č. 20 a příklad denzitometrického vyhodnocení gelu je na obrázku č. 21. Záznamy všech gelů jsou uvedeny v přílohách č. P1 – P12. Všechny výsledky po denzitometrickém vyhodnocení byly shrnuty formou tabulky č. 4 – 11, kde je uvedena účinnost vazby IgG na částice v %.



Obrázek 20.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydroxylovou funkční skupinou (1. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: Metoda se stabilizací kyanoborohydridem sodným (vlevo) a se stabilizací triacetoxyborohydridem sodným (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, M – molekulový marker, Zás. – zásobní roztok IgG, Ox. – IgG po oxidaci, Ods. – IgG po odsolení.



Obrázek 21.: Densitometrické vyhodnocení dvoukrokové metody vazby IgG přes karboxylovou funkční skupinu s použitím EDAC a sulfo-NHS původního vzorku (nahore) a vazebné frakce (dole).

Výsledky účinnosti vazby vyjádřené v procentech byly odečteny z plochy píků příslušných molekul před a po vazbě na nosič. Z rozdílu v účinnosti vazeb bylo stanoveno i přibližné množství IgG vyvázaného na nosič.

Tabulka 4.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes karboxylovou skupinu jedнокrokovou metodou s použitím EDAC

	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	9250	100	68	30055	100	67	27335	100	50
VF	2983	32		10029	33		13796	50	
P1	0	0		0	0		0	0	
P2	0	0		0	0		0	0	

Tabulka 5.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes karboxylovou skupinu jedнокrokovou metodou s použitím EDAC a sulfo-NHS

	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	24143	100	100	13770	100	100	83964	100	100
VF	0	0		0	0		0	0	
P1	0	0		0	0		0	0	
P2	0	0		0	0		0	0	

Tabulka 6.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes karboxylovou skupinu dvoukrokovou metodou s použitím EDAC

	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	9905	100	37	30314	100	8	46862	100	ND
VF	3732	38		16249	54		35714	76,2	
P1	2012	20		9812	32		10176	21,7	
P2	516	5		1747	6		2429	5,2	

ND - nedetekováno

Tabulka 7.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes karboxylovou skupinu dvoukrokovou metodou s použitím EDAC a sulfo-NHS

	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	25565	100	30	31275	100	21	47305	100	78
VF	12705	50		13697	44		2797	6	
P1	4808	19		10686	34		6556	14	
P2	364	1		464	2		1246	3	

Tabulka 8.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes hydrazidovou skupinu bez odsolením zoxidovaných protilátek.

	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	14408	100	100	35863	100	100	27979	100	100
VF	0	0		0	0		0	0	
P1	0	0		0	0		0	0	
P2	0	0		0	0		0	0	

Tabulka 9.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes hydrazidovou skupinu s odsolením zoxidovaných protilátek.

	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	18783	100	100	19930	100	100	16633	100	100
VF	0	0		0	0		0	0	
P1	0	0		0	0		0	0	
P2	0	0		0	0		0	0	

Tabulka 10.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes hydroxylovou skupinu se stabilizací kyanoborohydridem sodným.

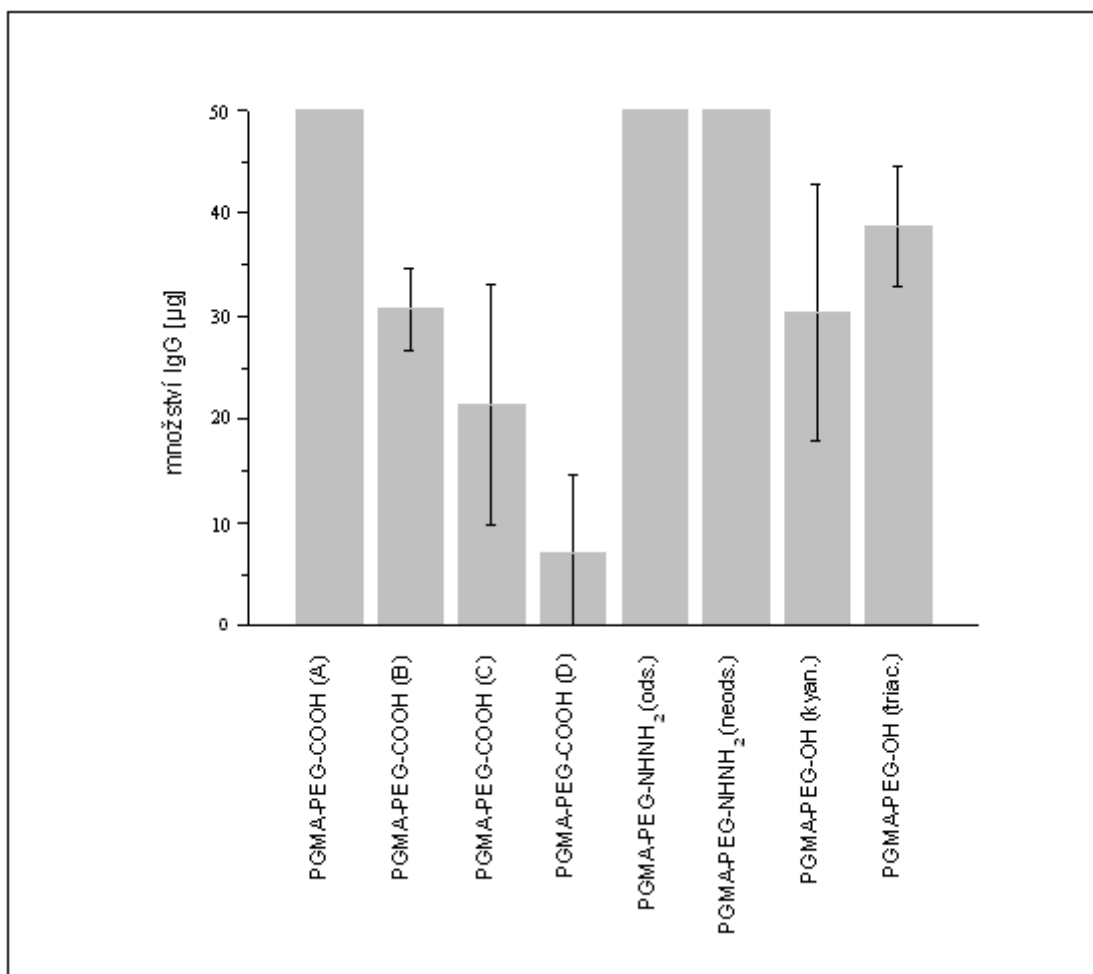
	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	17344	100	88	30030	100	71	24264	100	23
VF	2044	12		8775	29,2		13214	55	
P1	0	0		0	0		4184	17	
P2	-	-		0	0		1241	5	

Tabulka 11.: Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby přes hydroxylovou skupinu se stabilizací triacetoxyborohydridem sodným.

	1. opakování			2. opakování			3. opakování		
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	28907	100	87	37481	100	86	38262	100	60
VF	0	0		0	0		6029	16	
P1	3789	13		2795	8		6379	17	
P2	-	-		2619	7		2892	8	

Na základě dosažených výsledků, tj. množství IgG navázaných na 0,5 mg modifikovaných částic PGMA, byl sestaven graf č. 1, kde jsme porovnávali účinnost

vazby molekul IgG podle způsobu vazby a typu funkční skupiny, na kterou vazba probíhala.



Graf 1.: Porovnání účinnosti různých metod vazby IgG na 0,5 mg povrchově modifikovaných částic polyetylenglykolem s karboxylovými, hydrazidovými nebo hydroxylovými terminálními skupinami.

(A) jedнокrokově s EDAC a sulfo-NHS; (B) jedнокrokově s EDAC; (C) dvoukrokově s EDAC a sulfo-NHS; (D) dvoukrokově s EDAC; (ods.) s odsolením protilátek; (neods.) bez odsolení protilátek; (kyan.) se stabilizací kyanoborohydridem sodným; (triac.) se stabilizací triacetoxyborohydridem sodným

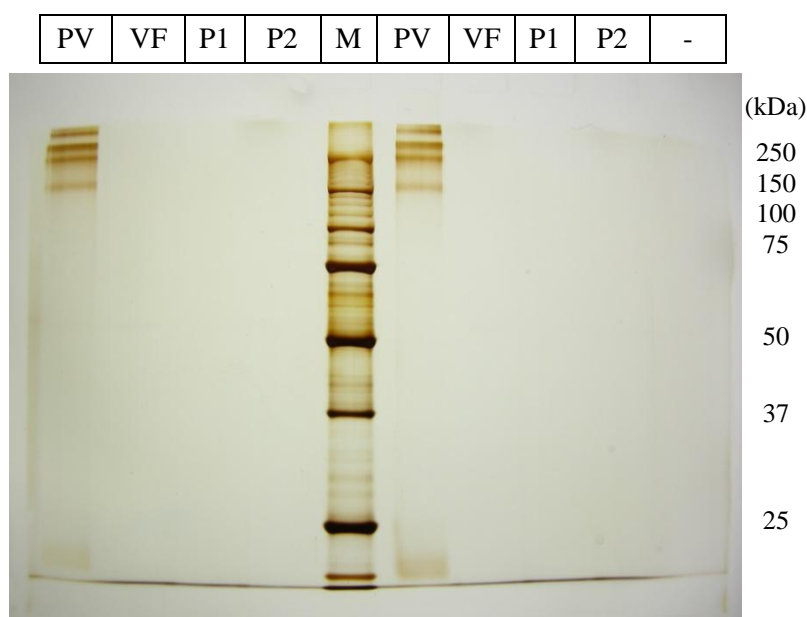
Z naměřených hodnot vyplývá, že neúčinnější metoda vazby IgG na povrchově modifikované částice polyetylenglykolem přes karboxylovou skupinu je jedнокroková metoda s použitím EDAC a sulfo-NHS, kde se navázalo vždy maximální možné množství IgG, tj. 50 µg IgG na 0,5 mg nosiče. Přes hydrazidovou skupinu se také navázalo vždy 50 µg imobilizovaných IgG a při vazbě přes hydroxylovou skupinu je účinnější použít jako stabilizační činidlo triacetoxyborohydrid sodný, na který se navázalo v průměru 40 µg. Nejméně IgG se navázalo při použití dvoukrokové metody vazby přes karboxylovou skupinu za použití EDAC, průměrně pouze 20 µg.

5.3 Optimalizace vazby IgG na částice s různým množstvím polyetylenglykolu

Dalším úkolem bylo ověřit, jestli množství použitého PEGu při povrchové modifikaci bude mít vliv na množství následně vázaných IgG.

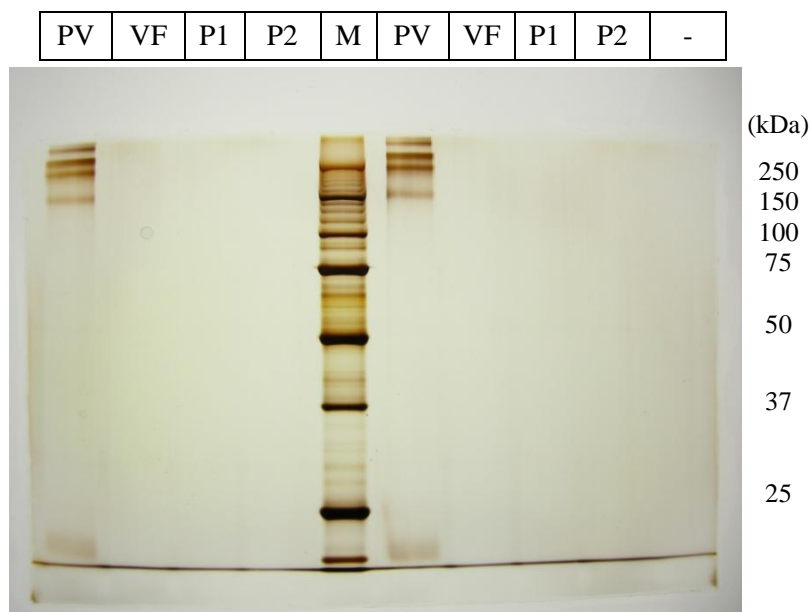
Pro optimalizaci jsme si vybrali jeden typ PEGu s hydrazidovými funkčními skupinami. Množství PEGu jsme zvolili tak, aby poměr funkčních skupin částic a PEGu byl následující: 1:1, 1:2,5 a 1:5. Postupovali jsme podle návodu v kapitole č. 3.2. Následně jsme na připravený nosič vázali modelové protilátky podle postupu v kapitole č. 3.4.2 s krokem odsolení protilátek. Vše se provádělo ve dvojicích.

Stanovení množství navázaných IgG na povrchově modifikované částice jsme provedli nepřímo porovnáním množství IgG v původním vzorku, vazebné frakci a promývacích frakcích pomocí metody SDS-PAGE popsané v kapitole č. 3.7. Gely jsme obarvili dusičnanem stříbrným podle postupu v kapitole č. 3.8 a vyhodnocovali pomocí softwaru ImageJ. Jednotlivé gely jsou na obrázcích č. 22-24.



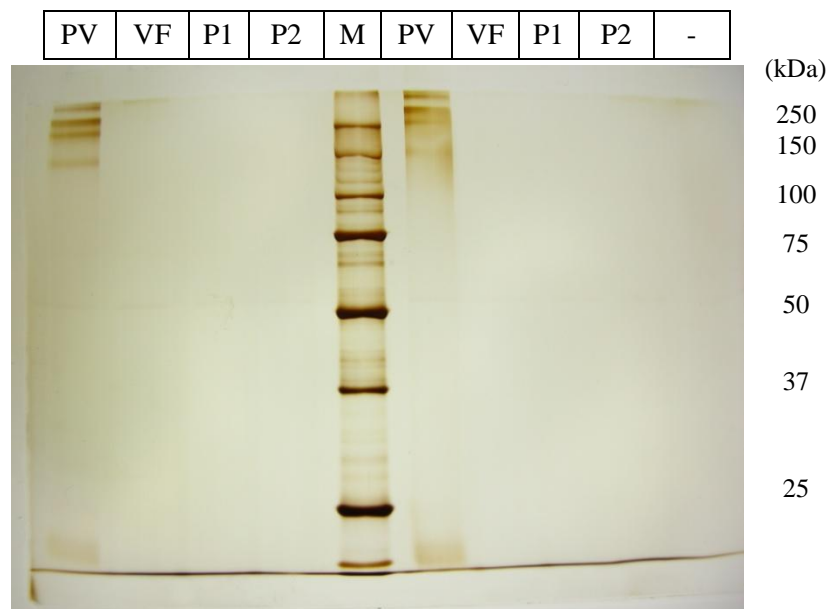
Obrázek 22.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydrazidovou funkční skupinou, s poměrem funkčních skupin částic a PEGu 1:1.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: První provedení (vlevo) a druhé provedení (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



Obrázek 23.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydrazidovou funkční skupinou, s poměrem funkčních skupin částic a PEGu 1:2,5.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: První provedení (vlevo) a druhé provedení (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



Obrázek 24.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydrazidovou funkční skupinou, s poměrem funkčních skupin částic a PEGu 1:5.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: První provedení (vlevo) a druhé provedení (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.

Výsledky účinnosti vazby vyjádřené v procentech byly odečteny z ploch píků příslušných protilátek a jsou uvedeny v tabulce č. 12 – 14.

Tabulka 12.: *Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby modelových IgG na částice, na které byl vázán PEG s poměrem funkčních skupin částic a PEGu 1:1.*

	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	24893	100	100	25697	100	100
VF	0	0		0	0	
P1	0	0		0	0	
P2	0	0		0	0	

Tabulka 13.: *Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby modelových IgG na částice, na které byl vázán PEG s poměrem funkčních skupin částic a PEGu 1:2,5.*

	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	21686	100	100	28263	100	100
VF	0	0		0	0	
P1	0	0		0	0	
P2	0	0		0	0	

Tabulka 14.: *Denzitometrické vyhodnocení účinnosti vazby modelových IgG na částice, na které byl vázán PEG s poměrem funkčních skupin částic a PEGu 1:5.*

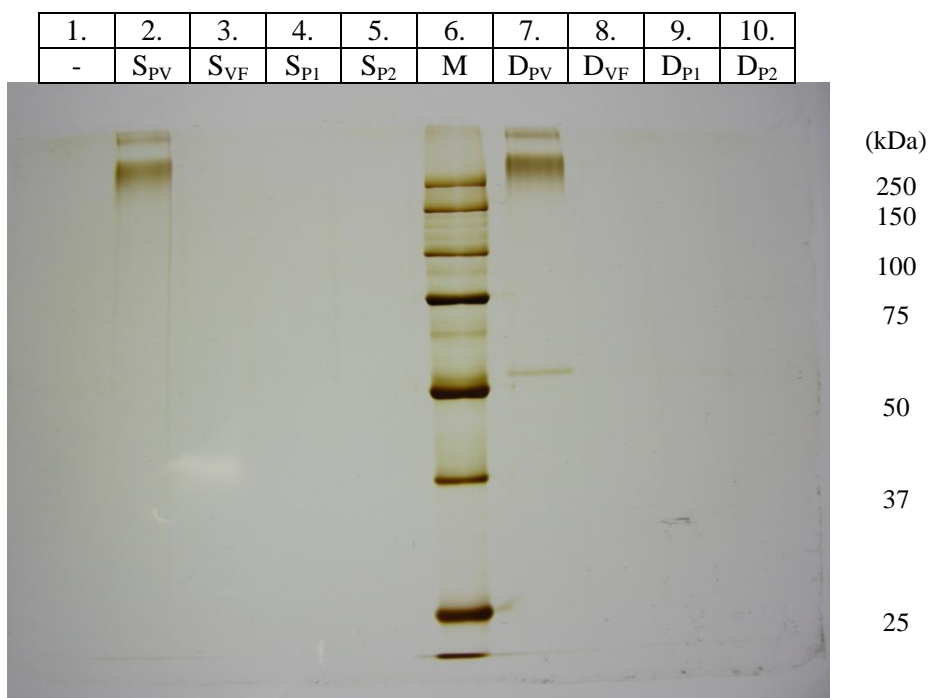
	plocha píku	% z celku	% nav. IgG	plocha píku	% z celku	% nav. IgG
PV	16052	100	100	15065	100	100
VF	0	0		0	0	
P1	0	0		0	0	
P2	0	0		0	0	

Z naměřených výsledků je patrné, že množství navázaného PEGu na magnetických částicích vůbec neovlivňuje účinnost vazby přidaných IgG na částice.

5.4 Porovnání účinnosti vazby specifických protilátek anti-p53 na magnetické částice Sera-Mag a Dynabeads

S cílem ověřit, zda protilátky kovalentně navázané na nosič si zachovávají vazebnou specifitu a afinitu, byl pro následující pokusy vybrán biospecifický pár protein p53 a anti-p53 IgG. Naším úkolem bylo navázat monoklonální nebo polyklonální specifické protilátky proti proteinu p53 na magnetické částice Sera-Mag a Dynabeads a porovnat účinnost vazby. Postupovali jsme podle kapitoly č. 3.1.

Stanovení účinnosti vazby monoklonálních protilátek anti-p53 IgG jsme ověřili metodou SDS-PAGE podle postupu v kapitole č. 3.7. Do každé jamky bylo dávkováno 15 μ l výsledné směsi příslušného vzorku a roztoku G v poměru 1:1. Gely jsme následně obarvili dusičnanem stříbrným podle postupu v kapitole č. 3.8. Obarvený gel je na obrázku č. 25.



Obrázek 25.: SDS-PAGE původních vzorků IgG, vazebných a promývacích frakcí po imobilizaci monoklonálních protilátek na magnetické částice Sera-Mag-COOH a Dynabeads-COOH.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. neobsazená pozice; 2. S_{PV} – Sera-Mag - původní vzorek; 3. S_{VF} – Sera-Mag - vazebná frakce; 4. S_{P1} – Sera-Mag - 1 promývací frakce; 5. S_{P2} – Sera-Mag - druhá promývací frakce; 6. M – marker; 7. D_{PV} – Dynabeads - původní vzorek; 8. D_{VF} – Dynabeads - vazebná frakce; 9. D_{P1} – Dynabeads - 1 promývací frakce; 10. D_{P2} – Dynabeads - druhá promývací frakce.

Množství navázaného IgG jsme vyhodnotili denzitometricky pomocí softwaru ImageJ. Určili jsme plochy píků IgG v jednotlivých frakcích a odečtením nenavázaných IgG ve vazebné frakci a promývacích frakcích od IgG v původním vzorku jsme určili procento navázaných protilátek. Data jsou uvedena v tabulce č. 15.

Tabulka 15.: Denzitometrické vyhodnocení separovaných roztoků získaných při imobilizaci monoklonálních IgG na částice Sera-Mag-COOH a Dynabeads-COOH.

Sera-Mag	Plocha píku	IgG ve frakci [%]	Navázané IgG [%]	Dynabeads	Plocha píku	IgG ve frakci [%]	Navázané IgG [%]
PV	35210	100	99	PV	43608	100	99
VF	254	1		VF	574	1	
P1	46	0		P1	0	0	
P2	0	0		P2	0	0	

Další metoda pro stanovení účinnosti vazby byl BCA test. Byl připraven zásobní roztok 2 µg/ml a z něho byla připravena kalibrační řada o koncentracích IgG 200, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 µg/ml. Pro stanovení jsme použili 150 µl vzorku, ke kterému jsme přidali 150 µl pracovního roztoku. Celkový objem reakční směsi byl 300 µl a pro fotometrické stanovení jsme odpipetovali do mikrotitrační destičky 200 µl. Postupovali jsme podle návodu v kapitole č. 3.9.

Nejdříve jsme si z hodnot kalibrační řady sestavili graf a stanovily rovnici regrese, kde je koncentrace udána v µg IgG/150 µl roztoku:

$$A = 0,108 \cdot c_{(\mu\text{g IgG}/150 \mu\text{l roztoku})} + 0,0048$$

Maximální hodnota R^2 pro tuto závislost byla stanovena na 0,9975. Ve všech stanoveních IgG jsme používali tuto rovnici a dosazením příslušných absorbancí jsme vypočetli koncentraci IgG.

Pokusili jsme se stanovit množství navázaných IgG v původních vzorcích, vazebných frakcích a promývacích frakcích, výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 16.

Tabulka 16.: Výsledky nepřímého stanovení navázaných protilátek anti-p53 pomocí BCA testu.

Dynabeads	A (570 nm)	A (570 nm) – slepý vzorek	A (570 nm) – bez slepého vzorku	Sera-Mag	A (570 nm)	A (570 nm) – slepý vzorek	A (570 nm) – bez slepého vzorku
PV	0,783	0,865	ND	PV	0,719	0,865	ND
VF	2,983	3,013	ND	VF	2,983	3,013	ND
P1	0,341	0,112	ND	P1	0,336	0,112	ND
P2	0,120	0,112	ND	P2	0,121	0,112	ND
P3	0,106	0,112	ND	P3	0,122	0,112	ND
P4	0,112	0,112	ND	P4	0,108	0,112	ND
P5	0,105	0,112	ND	P5	0,122	0,112	ND

ND – nelze stanovit

Z vysoké absorbance slepých vzorků je zřejmé, že dochází k interferenci s činidly používaných při vazbě protilátek, a proto tímto způsobem nemůžeme validně stanovit množství IgG v jednotlivých frakcích.

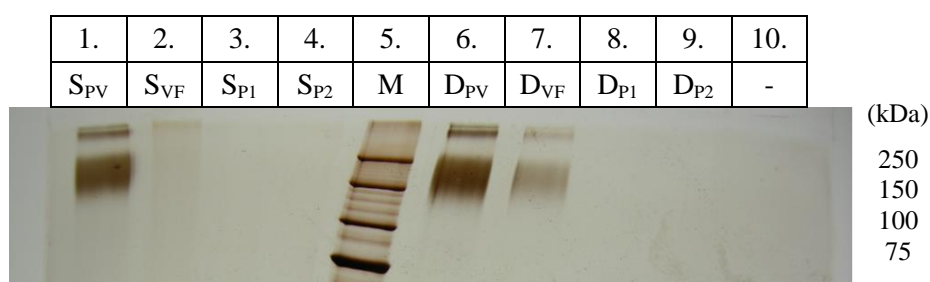
Pokusili jsme se stanovit množství navázaných IgG také přímo na částicích stejnou metodou. Postupovali jsme podle návodu v kapitole č. 3.9. Test byl prováděn pomocí alikvotů 100 µg nosiče, které byly resuspendovány ve 150 µl PBS pufru a k nim bylo poté přidáno 150 µl pracovního roztoku, celkový objem roztoku byl 300 µl. Z této reakční směsi bylo vzato 200 µl do jamky pro změření absorbance při vlnové délce 570 nm. Výsledky stanovení účinnosti vazby IgG na částicích BCA testem jsou uvedeny v tabulce č. 17.

Tabulka 17.: Výsledky přímého stanovení navázaných protilátek anti-p53 IgG testem BCA.

Částice	A (570 nm)	A (570 nm) – slepý vzorek	A (570 nm) – bez slepého vzorku	µg IgG/ 100µg nosiče	µg IgG/mg nosiče
Sera-Mag	0,812	0,206	0,606	5,6	56
Dynabeads	0,778	0,098	0,680	6,3	63

Stanovení účinnosti vazby polyklonálních protilátek IgG anti-p53 metodou SDS-PAGE jsme provedli podle postupu v kapitole č. 3.7. Do každé jamky bylo dávkováno 15 µl výsledné směsi příslušného vzorku a roztoku G v poměru 1:1. Gel jsme následně obarvili dusičnanem stříbrným podle postupu v kapitole č. 3.8. Obarvený gel je na obrázku č. 26.

Množství navázaného IgG jsme vyhodnotili denzitometricky pomocí softwaru ImageJ. Určili jsme plochy píků IgG v jednotlivých frakcích a odečtením nenavázaných IgG ve vazebné frakci a promývacích frakcích od IgG v původním vzorku jsme určili procento navázaných protilátek, výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 18.



Obrázek 26.: SDS-PAGE původních vzorků IgG, vazebných a promývacích frakcích po imobilizaci polyklonálních protilátek na magnetické částice Sera-Mag-COOH a Dynabeads-COOH.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. S_{PV} – Sera-Mag - původní vzorek; 2. S_{VF} – Sera-Mag - vazebná frakce; 3. S_{P1} – Sera-Mag - 1 promývací frakce; 4. S_{P2} – Sera-Mag - druhá promývací frakce; 5. M – marker; 6. D_{PV} – Dynabeads - původní vzorek; 7. D_{VF} – Dynabeads - vazebná frakce; 8. D_{P1} – Dynabeads - 1 promývací frakce; 9. D_{P2} – Dynabeads - druhá promývací frakce.

Tabulka 18.: Denzitometrické vyhodnocení separovaných roztoků získaných při imobilizaci polyklonálních IgG na částice Sera-Mag-COOH a Dynabeads-COOH.

Sera-Mag	Plocha píku	IgG ve frakci [%]	Navázané IgG [%]	Dynabeads	Plocha píku	% IgG z celku	Navázané IgG [%]
PV	44492	100	98	PV	60641	100	79
VF	982	2		VF	19501	21	
P1	0	0		P1	0	0	
P2	0	0		P2	0	0	

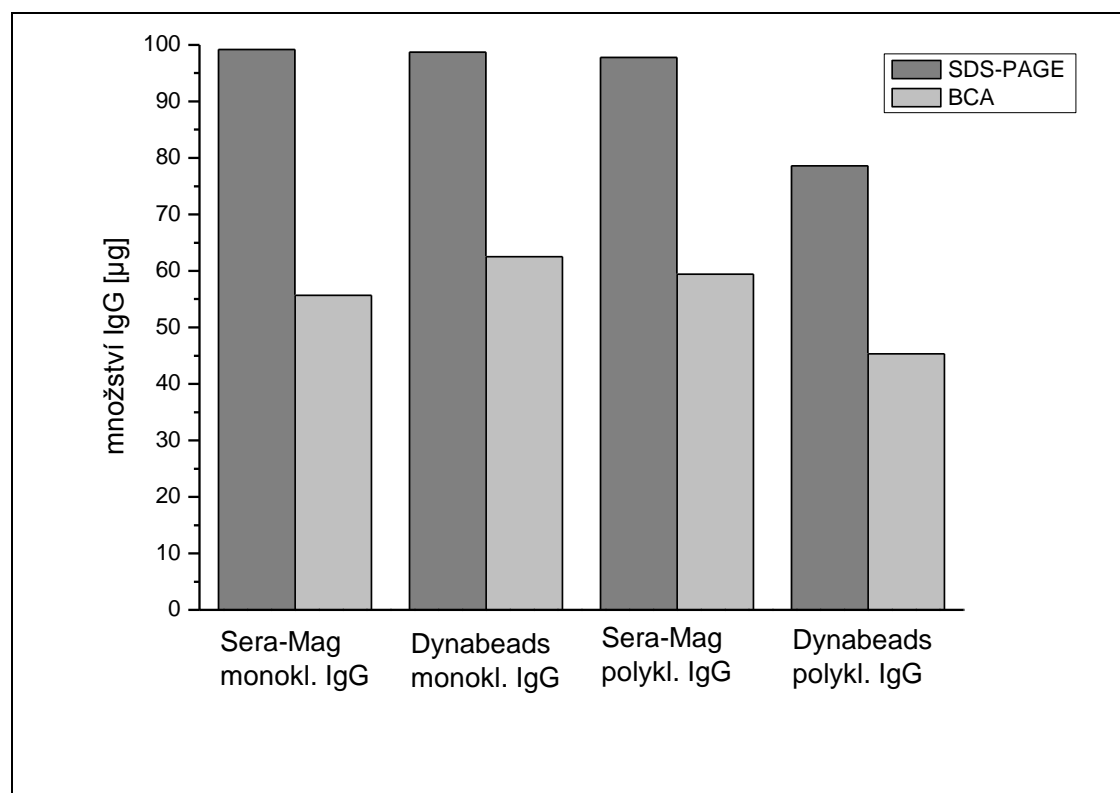
Stanovení účinnosti vazby polyklonálních protilátek anti-p53 jsme provedli pomocí testu Micro BCA podle postupu v kapitole č. 3.9 stejným způsobem jako

stanovení účinnosti vazby monoklonálních protilátek. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 19.

Tabulka 19.: Výsledky přímého stanovení navázaných polyklonálních protilátek anti-p53 IgG testem BCA.

Částice	A (570 nm)	A (570 nm) – slepý vzorek	A (570 nm) – bez slepého vzorku	μg IgG/ 100μg nosiče	μg IgG/mg nosiče
Sera-Mag	0,852	0,206	0,646	5,9	59
Dynabeads	0,592	0,098	0,494	4,5	45

Dále jsme provedli porovnání účinnosti vazby monoklonálních a polyklonálních protilátek na magnetické částice Sera-Mag a Dynabeads. Výsledky jsou znázorněny v grafu č. 2.



Graf 2.: Porovnání účinnosti vazby monoklonálních a polyklonálních IgG na 1 mg magnetických částic Sera-Mag a Dynabeads, hodnoceno pomocí metod BCA a SDS-PAGE.

Z grafu vyplývá, že polyklonální protilátky se na částice Dynabeads navázali pouze ze tří čtvrtin, což potvrzuje jak SDS-PAGE, tak i přímé stanovení IgG na

částicích pomocí Micro BCA testu. V ostatních případech došlo k navázání téměř všech protilátek. Z grafu je také patrné, že při stanovování množství IgG na magnetických částicích má Micro BCA test nižší odezvu, než bychom očekávali. Vzhledem ke zkušenostem z předcházejícího výzkumu prováděného v laboratoři imunochemie, jsme výsledky stanovené pomocí SDS-PAGE použili k dalšímu hodnocení a výsledky získané z testu BCA vzhledem k možným interferencím pouze jako orientační.

5.5 Vazba specifických protilátek anti-p53 na magnetické částice PGMA modifikované polyetylglykolem

Dále jsme si připravili imunosorbent pro izolaci proteinu p53 z buněčného lyzátu. Nejprve jsme modifikovali částice PGMA-COOH PEG s karboxylovou, hydrazidovou nebo hydroxylovou terminální funkční skupinou. Postupovali jsme podle návodu v kapitole č. 3.2. Potom jsme navázali na modifikované částice protilátky anti-p53 metodami, které nám vyšly jako nejúčinnější v kapitole č. 5.2. Přes karboxylovou skupinu jsme provedli vazbu protilátek anti-p53 podle návodu v kapitole č. 3.4.1 jedнокrokovou metodou s použitím sulfo-NHS a EDAC. Při vázání IgG přes hydrazidovou funkční skupinu jsme postupovali podle kapitoly č. 3.4.2 a provedli jsme odsolení zoxidovaných protilátek anti-p53. Přes hydroxylovou skupinu jsme vážali IgG podle kapitoly č. 3.4.3 a jako stabilizační činidlo jsme požili triacetoxyborohydrid sodný. Množství navázaných protilátek na nosičích jsme si již neověřovali.

5.6 Izolace proteinu p53 z buněčného lyzátu

Dalším úkolem naší práce bylo porovnat nosiče bez povrchové úpravy s nosiči s povrchovou úpravou polyetylglykolem a ověřit, že připravené imunosorbenty jsou schopné specifické izolace. K tomuto účelu jsme použili biospecifický pár protein p53 a protilátky anti-p53.

5.6.1 Izolace proteinu p53 z lyzátu imunosorbentem bez povrchové úpravy

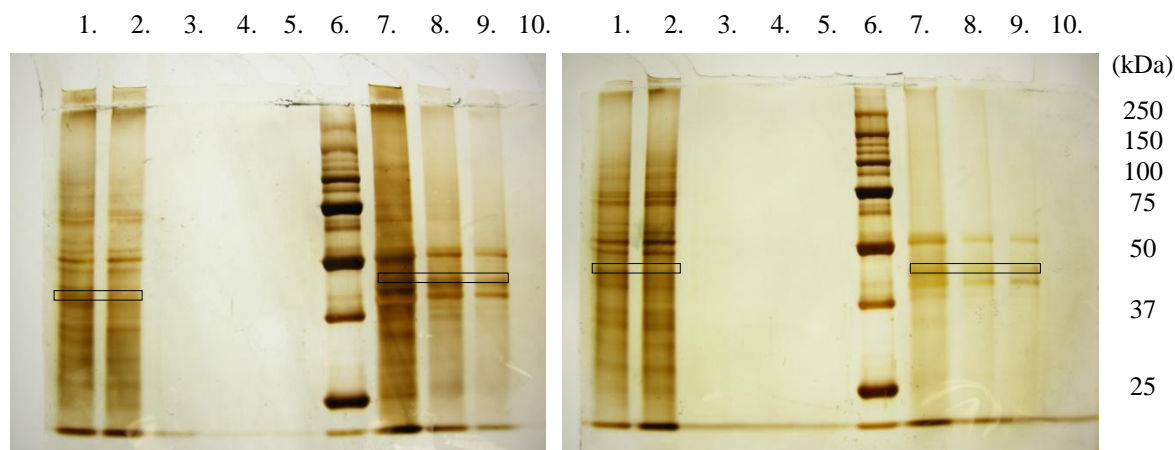
Při izolaci proteinu p53 imunosorbentem bez povrchové úpravy jsme pracovali s nosiči připravenými a charakterizovanými v kapitole č. 5.4. Izolaci proteinu jsme provedli podle návodu v kapitole č. 3.5.1. Vyhodnocení účinnosti izolace proteinu p53 jsme prováděli pomocí metody SDS-PAGE popsané v kapitole č. 3.7 a gely jsme následně obarvili dusičnanem stříbrným podle postupu v kapitole č. 3.8.

Pro orientaci uvádíme tabulku č. 20, ve které jsou uvedeny jednotlivé izoformy proteinu p53.

Tabulka 20.: Přehled izoform proteinu p53 předpokládáných v buněčném lyzátu.

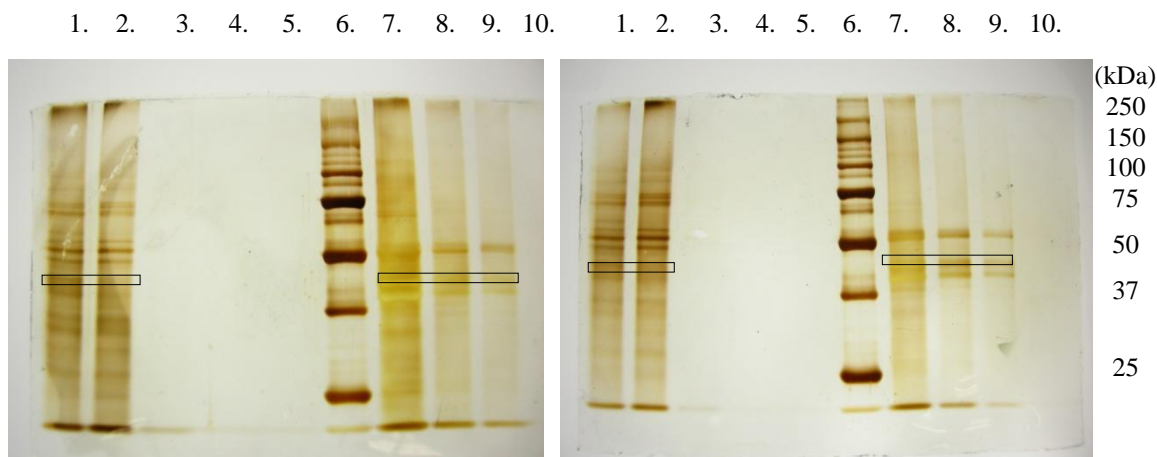
Izoforma	Mr	Označení
1	43,653	p53alfa
2	37,826	p53beta
3	38,501	p53gama
4	39,320	Del40-p53alfa
5	33,493	Del40-p53beta
6	34,168	Del40-p53gama
7	29,553	Del133-p53alfa
8	23,726	Del133-p53beta
9	24,401	Del133-p53gama

Nejdříve jsme použili nosiče k izolaci proteinu p53 z lyzátu MDA MB-468, což je lyzát obsahující značné množství proteinu p53, abychom si ověřili, že se protein p53 váže na protilátky imunosorbentů. Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 27 – 28.



Obrázek 27.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu MDA MB-468 částicemi Sera-Mag (vlevo) a Dynabeads (vpravo) s imobilizovanými monoklonálními protilátkami.

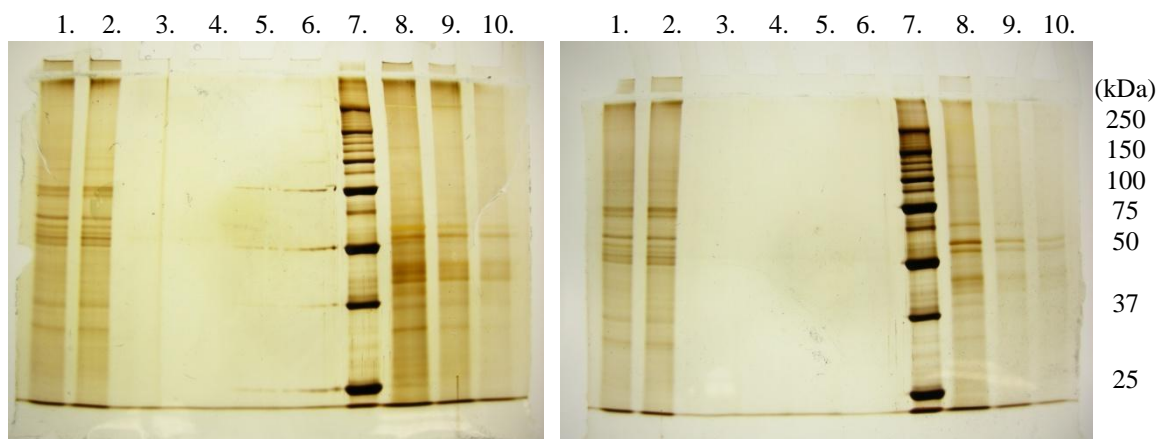
Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce, 10. – prázdná pozice. Izolovaný protein p53 je označen rámečkem.



Obrázek 28.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu MDA MB-468 částicemi Sera-Mag (vlevo) a Dynabeads (vpravo) s imobilizovanými polyklonálními protilátkami.

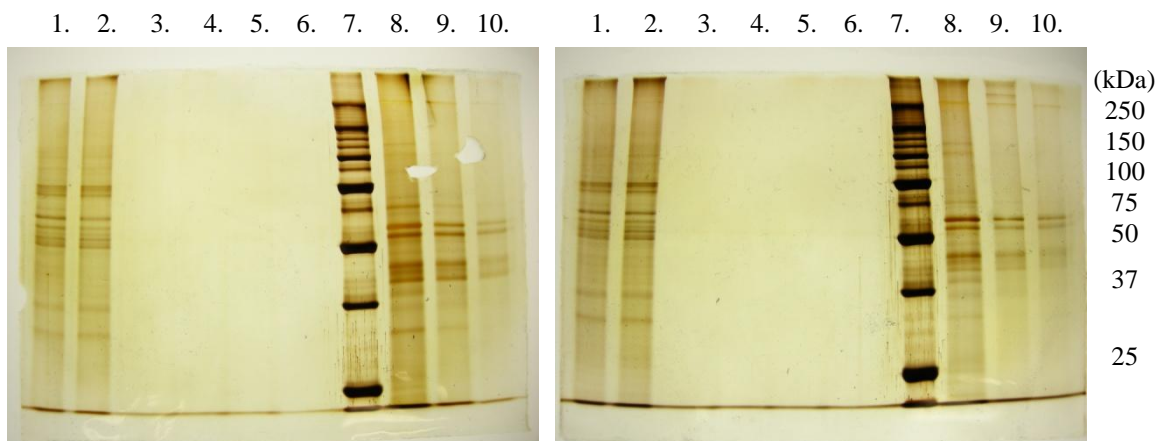
Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce. Izolovaný protein p53 je označen rámečkem.

Poté jsme se stejnými imunosorbenty provedli izolaci proteinu p53 z lyzátu buněk H1299, který neobsahoval žádný protein p53. Toto jsme provedli proto, abychom mohli posoudit míru nespecifické sorpce. Výsledné gely jsou na obrázcích č. 29 – 30, je na nich jasně patrná velká míra nespecifické sorpce nespecificky vázaných proteinů.



Obrázek 29.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu H1299 částicemi Sera-Mag (vlevo) a Dynabeads (vpravo) s imobilizovanými monoklonálními protilátkami.

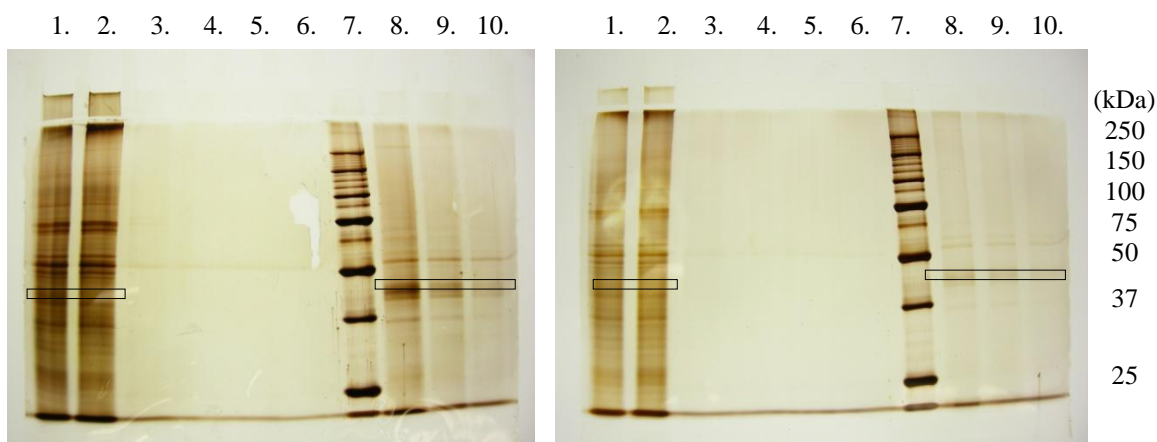
Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – promývací frakce s 1M NaCl, 7. – molekulový marker, 8. – první eluční frakce, 9. – druhá eluční frakce, 10. – třetí eluční frakce.



Obrázek 30.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu HI299 částicemi Sera-Mag (vlevo) a Dynabeads (vpravo) s imobilizovanými polyklonálními protilátkami.

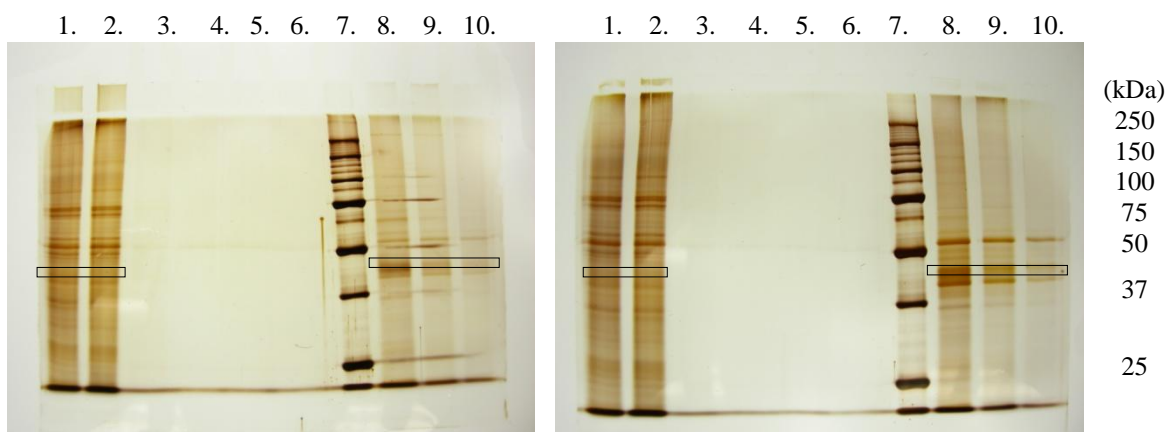
Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – promývací frakce s 1M NaCl, 7. – molekulový marker, 8. – první eluční frakce, 9. – druhá eluční frakce, 10. – třetí eluční frakce.

Dále jsme provedli znovu izolaci proteinu p53 z lyzátu MDA MB-468, abychom si ověřili, jestli naše imunisorbenty ztrácí schopnost specifické izolace při opakovaném použití. Gely jsou na obrázcích č. 31 a 32.



Obrázek 31.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu MDA MB-468 částicemi Sera-Mag (vlevo) a Dynabeads (vpravo) s imobilizovanými monoklonálními protilátkami.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – promývací frakce s 1M NaCl, 7. – molekulový marker, 8. – první eluční frakce, 9. – druhá eluční frakce, 10. – třetí eluční frakce. Izolovaný protein p53 je označen rámečkem.



Obrázek 32.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu MDA MB-468 částicemi Sera-Mag (vlevo) a Dynabeads (vpravo) s imobilizovanými polyklonálními protilátkami.

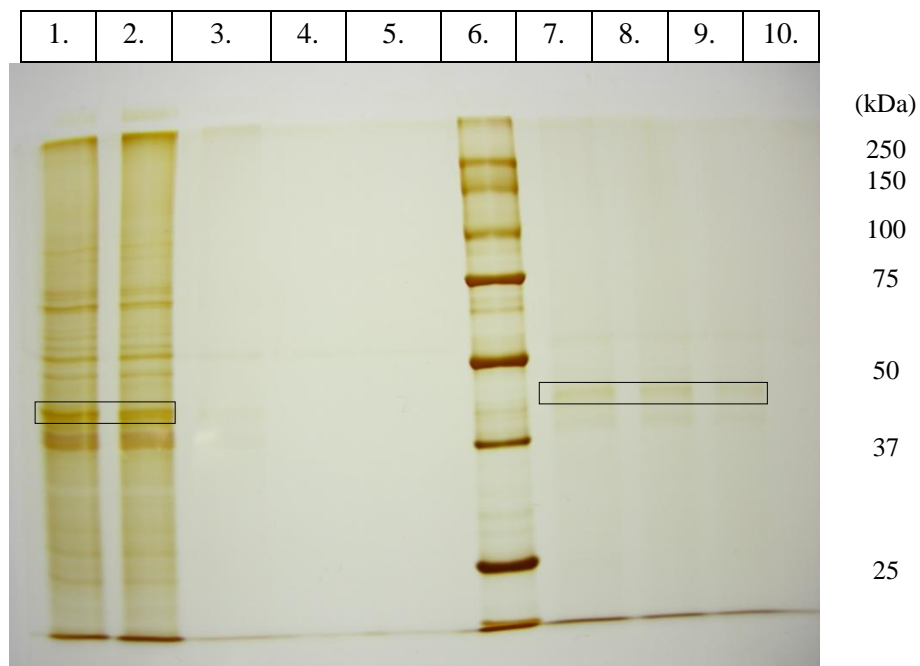
Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – promývací frakce s 1M NaCl, 7. – molekulový marker, 8. – první eluční frakce, 9. – druhá eluční frakce, 10. – třetí eluční frakce. Izolovaný protein p53 je označen rámečkem.

Z obarvených gelů je patrné, že nemodifikované imunosorbenty účinně izolují protein p53 z buněčných lyzátů, a to i při opakovaném použití. Míra nespecifické sorpce je však vysoká.

5.6.2 Izolace proteinu p53 z lyzátu imunosorbentem povrchově modifikovaným polyetylglykolem

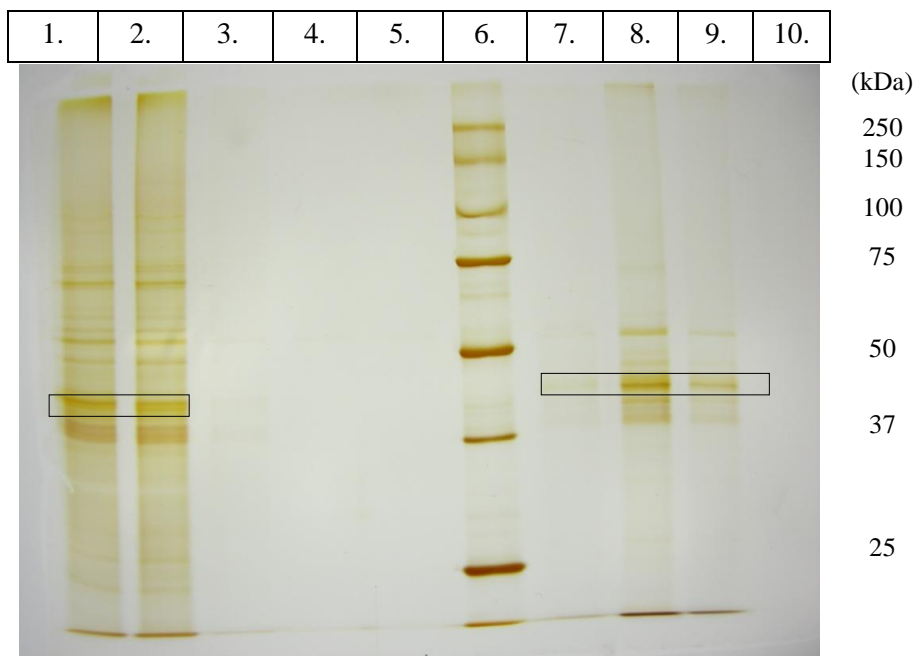
Izolaci proteinu p53 jsme provedli podle návodu v kapitole č. 3.5.2. Vyhodnocení míry nespecifické sorpce a izolace proteinu p53 jsme prováděli pomocí metody SDS-PAGE popsané v kapitole č. 3.7 a gely jsme následně obarvili dusičnanem stříbrným podle postupu v kapitole č. 3.8.

Stejně nosiče jsme použili pro izolace proteinu p53 z lyzátu MCF7, který obsahuje protein p53. Tímto jsme si chtěli ověřit, že připravené imunosorbenty specificky vážou protein p53. Výsledné gely jsou na obrázcích č. 33 – 35, je na nich vidět izolovaný protein p53 a mírná nespecifická sorpce ostatních proteinů.



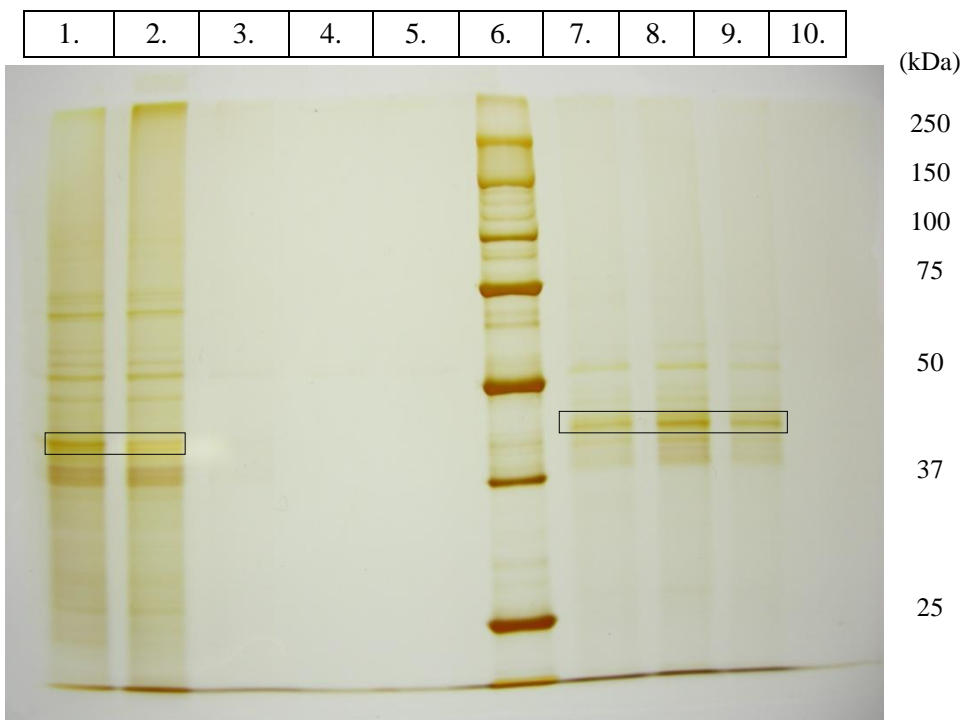
Obrázek 33.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu MCF7 částicemi PGMA-PEG-anti-p53 s vazbou monoklonálních protilátek přes karboxylovou skupinu.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce. Izolovaný protein p53 je označen rámečkem.



Obrázek 34.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu MCF7 částicemi PGMA-PEG-anti-p53 s vazbou monoklonálních protilátek přes hydrazidovou skupinu.

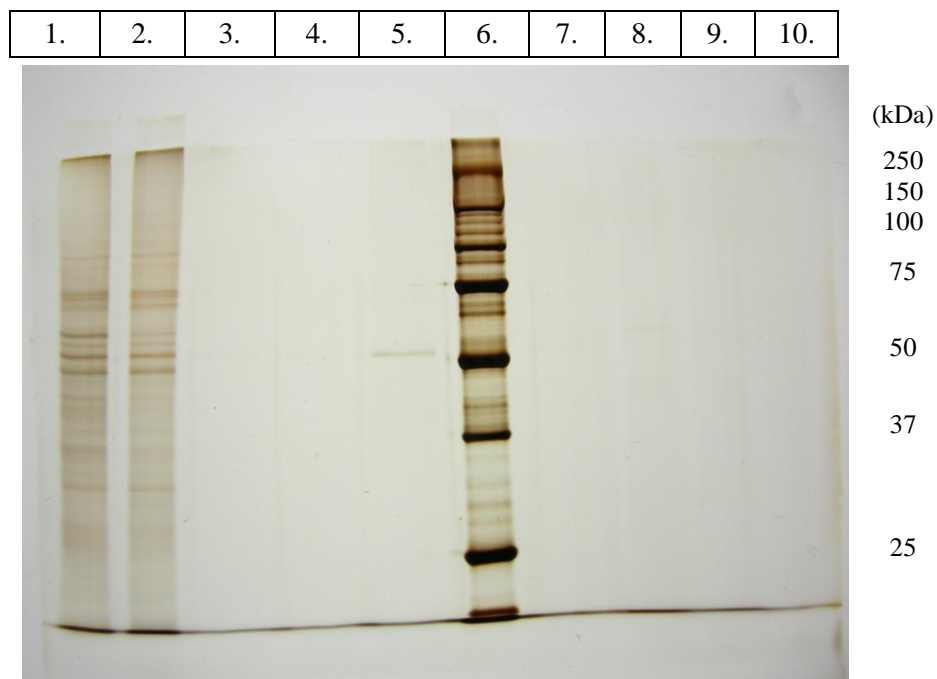
Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce. Izolovaný protein p53 je označen rámečkem.



Obrázek 35.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu MCF7 částicemi PGMA-PEG-anti-p53 s vazbou monoklonálních protilátek přes hydroxylovou skupinu.

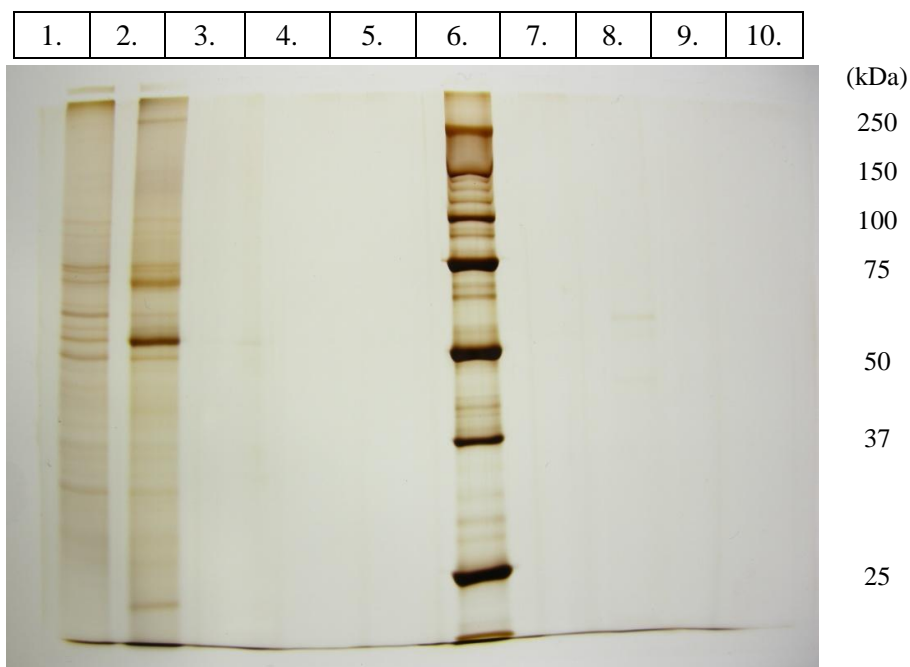
Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce. Izolovaný protein p53 je označen rámečkem.

Pro ověření negativní sorpce jsme použili lyzát H1299, který neobsahoval protein p53. Výsledek tohoto ověření je znázorněn na obrázcích č. 36 – 38.



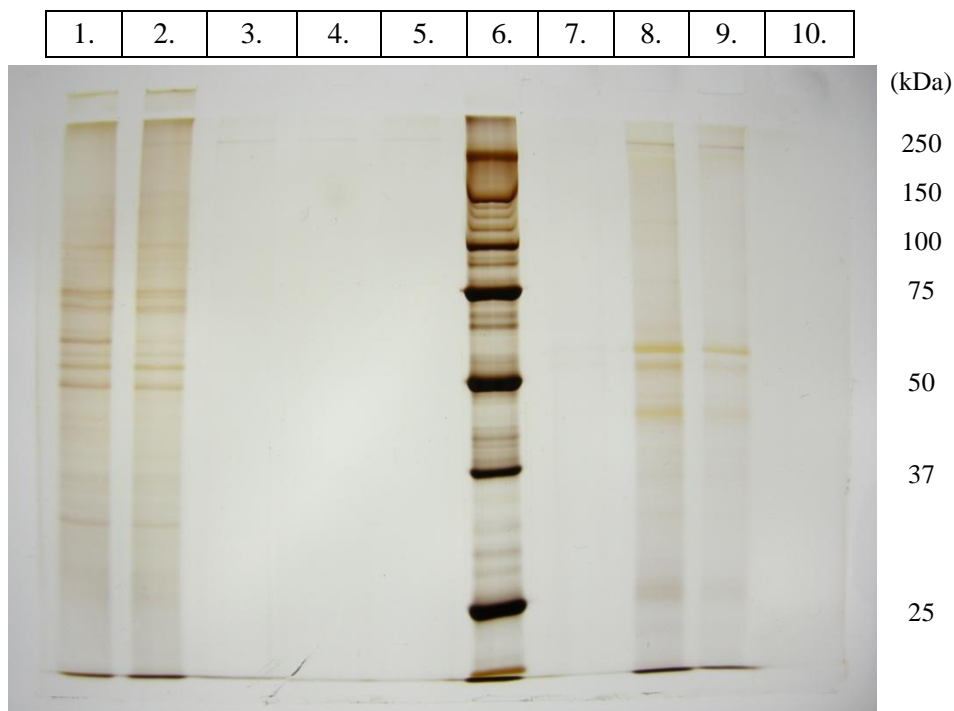
Obrázek 36.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu HI299 částicemi PGMA-PEG-anti-p53 s vazbou monoklonálních protilátek přes karboxylovou skupinu.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce.



Obrázek 37.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu HI299 částicemi PGMA-PEG-anti-p53 s vazbou monoklonálních protilátek přes hydrazidovou skupinu.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce.



Obrázek 38.: SDS-PAGE izolace proteinu p53 z lyzátu HI299 částicemi PGMA-PEG-anti-p53 s vazbou monoklonálních protilátek přes hydroxylovou skupinu.

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis gelu: 1. – původní vzorek, 2. – vazebná frakce, 3. – první promývací frakce, 4. – druhá promývací frakce, 5. – třetí promývací frakce, 6. – molekulový marker, 7. – první eluční frakce, 8. – druhá eluční frakce, 9. – třetí eluční frakce.

U modifikovaných částic jsme nepozorovali v eluční frakci přítomnost nespecificky vázaných proteinů. Pouze u nosiče (viz obrázek č. 38), kde byly protilátky anti-p53 vázány přes hydroxylovou skupinu byla pozorována v jednom opakování zvýšená nespecifická sorpce. Pro validní posouzení kvality nosičů by bylo nutné provést další experimenty.

Opakované použití u modifikovaných nosičů nebylo testováno.

5.7 Vazba specifických protilátek anti-EpCAM na magnetické částice PGMA modifikované polyetylenglykolem

Dále jsme si připravili imunosorbent pro izolaci buněk z buněčné suspenze. Nejprve jsme modifikovali částice PGMA-COOH PEGem s hydrazidovou terminální funkční skupinou. Na 0,5 mg částic jsme navázali 0,85 mg PEGu o molekulové hmotnosti 3400 Da. Postupovali jsme podle návodu v kapitole č. 3.2. Potom jsme navázali na modifikované částice 50 μ g zoxidovaných a odsolených protilátek anti-EpCAM podle návodu v kapitole č. 3.4.2.

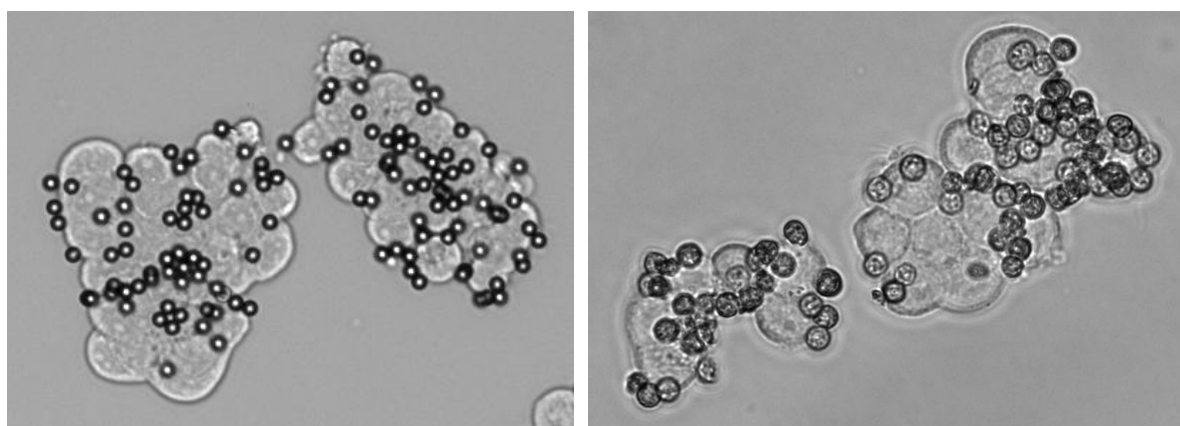
Množství navázaných protilátek na nosiči jsme si již nestanovovali, protože jsme z dřívějšího experimentu měli ověřeno, že se na PEGem modifikované částice přes hydrazidovou skupinu váží vždy všechny protilátky.

5.8 Porovnání připraveného imunosorbentu a komerčně dostupného pro imunomagnetickou separaci buněk

Naším posledním úkolem bylo ověřit, jestli připravený imunosorbent váže buňky exprimující molekulu EpCAM, posoudit míru nespecifické sorpce buněk neexprimujících na svém povrchu antigen EpCAM a porovnat ho s komerčně dodávaným imunosorbentem Dynabeads Epithelial Enrich, který má též kovalentně vázané anti-EpCAM protilátky.

0,5 miligramu nosiče jsme vždy smíchali s 1 ml suspenze buněk o příslušné hustotě. Po třiceti minutách jsme buněčnou suspenzi pozorovali ve světelném mikroskopu a hodnotili tvorbu tzv. rozet. Jednalo se o útvary, které vytvářejí magnetické částice se specifickými protilátkami kolem EpCAM pozitivních buněk.

Nejdříve jsme provedli imunomagnetickou separaci buněk MCF7 (2×10^6 /ml, buňky exprimující EpCAM) pomocí komerčního imunosorbentu Dynabeads Epithelial Enrich a námi připraveným imunosorbentem PGMA-PEG-anti-EpCAM podle postupu v kapitole č. 3.6. Poté jsme počítali množství rozet v Bürkerově komůrce ve všech velkých čtvcích celkem třikrát. Výsledky jsou uvedené v tabulce č. 21. Světelná mikroskopie rozet je ukázána na obrázku č. 39.



1

2

Obrázek 39.: Světelná mikroskopie rozet buněk MCF7 a imunisorbentů

Světelná mikroskopie; 1. Dynabeads Epithelial Enrich, 20x; 2. PGMA-PEG-anti-EpCAM, 40x

Tabulka 21.: Počítání rozet buněk MCF7 a imunisorbentů.

	Dynabeads Epithelial Enrich	PGMA-PEG-anti-EpCAM
1	178	117
2	193	122
3	178	113
průměr	183	117

Z tabulky vyplývá, že námi připravený imunisorbent váže buňky s nižší účinností, než imunisorbent komerčně vyráběný.

Dále jsme provedli imunomagnetickou separaci buněk Jurkat (1×10^6 /ml, buňky neexprimující molekulu EpCAM) a směsi buněk MCF7 (1×10^4 /ml) značených FITC a buněk Jurkat (1×10^6 /ml) oběma imunisorbenty podle kapitoly č. 3.6. Výsledky těchto separací jsou uvedeny v tabulce č. 22 a 23.

Tabulka 22.: Počet rozet při imunomagnetické separaci buněk Jurkat.

imunosorbent	Jurkat
PGMA-PEG-anti-EpCAM	0
Dynabeads Epithelial Enrich	0

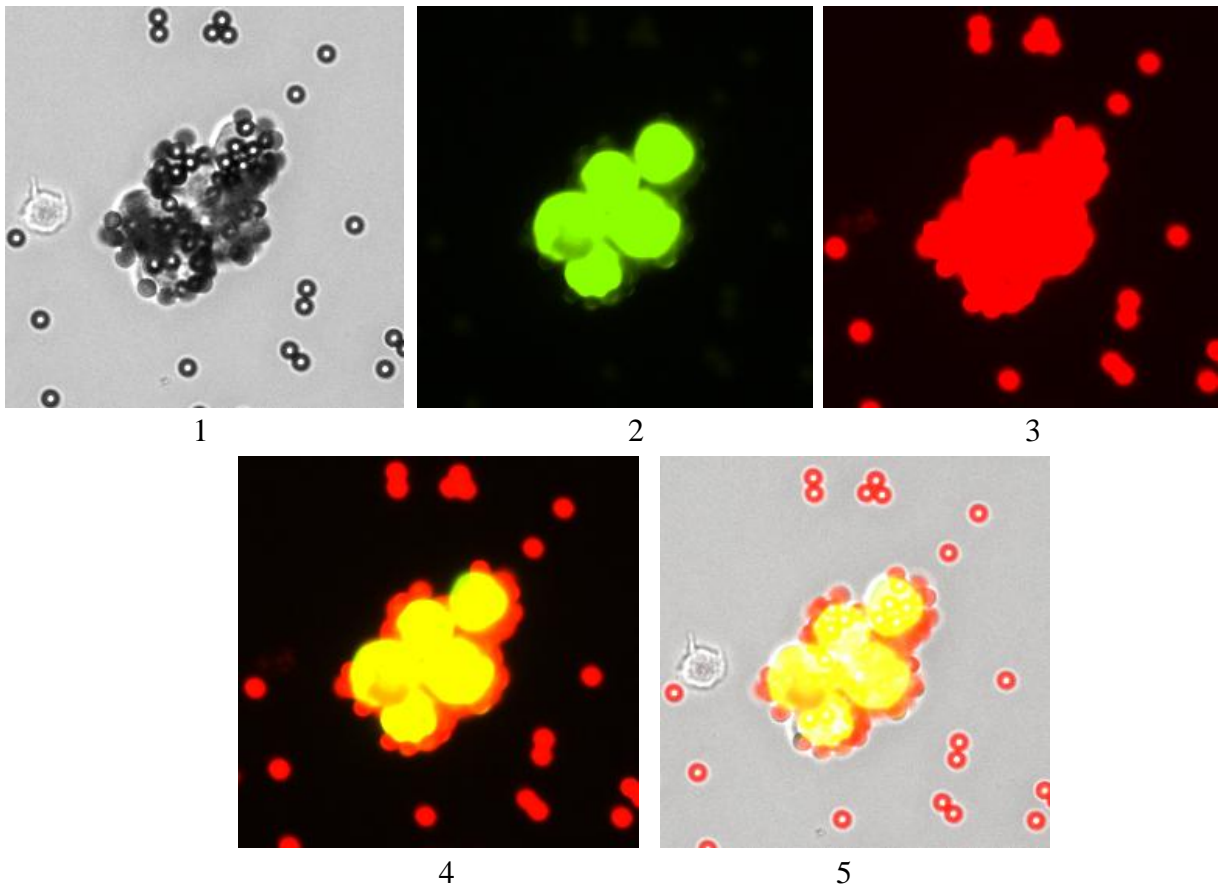
Tabulka 23.: Počet rozet při imunomagnetické separaci buněk MCF7 a Jurkat.

imunosorbent	fluoreskující buňky (MCF7)	nefluoreskující buňky (Jurkat)
PGMA-PEG-anti-EpCAM	2	2
Dynabeads Epithelial Enrich	3	1

Z důvodu nízkého počtu buněk byla směs 20 x zakoncentrována a následně jsme provedli opětovné počítání buněk v 6 zorných polích (3x3 čtverce / zorné pole) z celkového počtu 16 zorných polí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 24. Rozety buněk linie MCF7 a magnetických částic jsou ukázány na obrázku číslo 40 a 41.

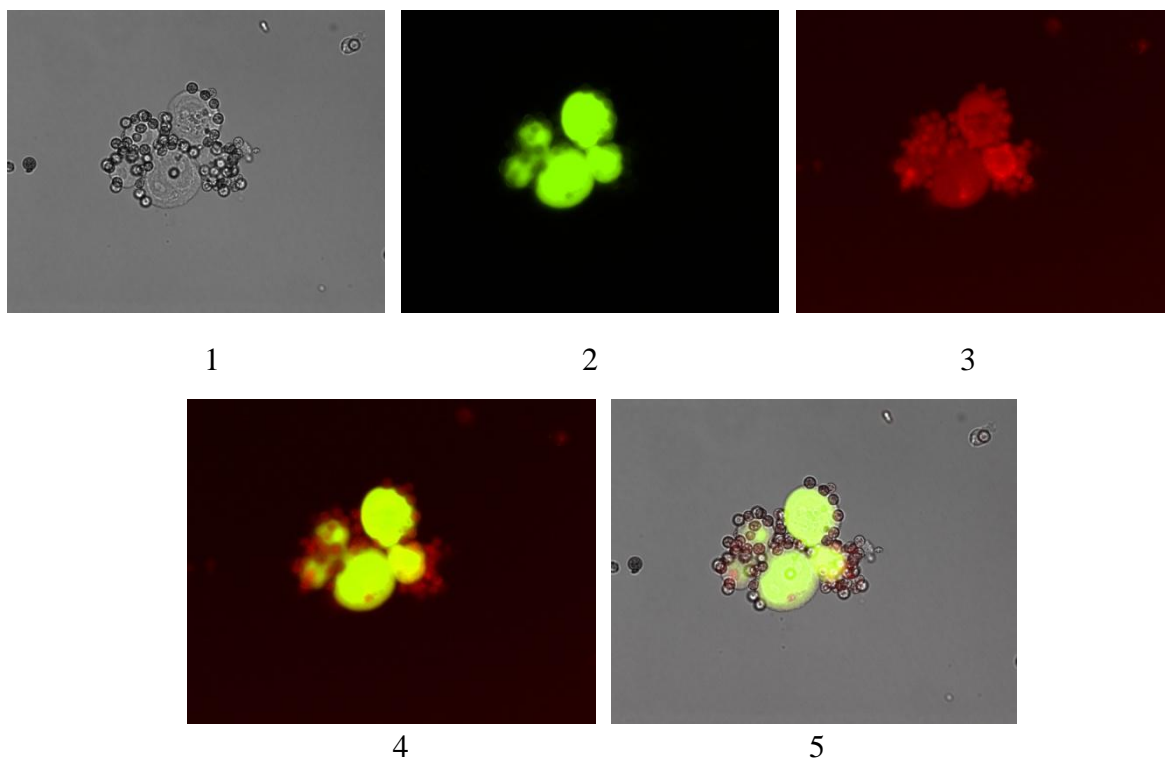
Tabulka 24.: Počet rozet při imunomagnetické separaci buněk MCF7 a Jurkat po zakoncentrování.

imunosorbent	fluoreskující buňky (MCF7)	nefluoreskující buňky (Jurkat)
PGMA-PEG-anti-EpCAM	33	100
Dynabeads Epithelial Enrich	30	2



Obrázek 40.: Světelná a fluorescenční mikroskopie rozety buněk MCF7 a částic Dynabeads Epithelial Enrich

Mikroskopie imunomagnetické separace; 1. světelná mikroskopie, 60x; 2. FITC filtr (zelená – buňky), 60x; 3. TRITC filtr (červená – částice), 60x; 4. spojení 2. a 3., 60x; 5. spojení 1., 2. a 3., 60x.



Obrázek 41.: Světelná a fluorescenční mikroskopie rozety buněk MCF7 a částic PGMA-PEG-anti-EpCAM

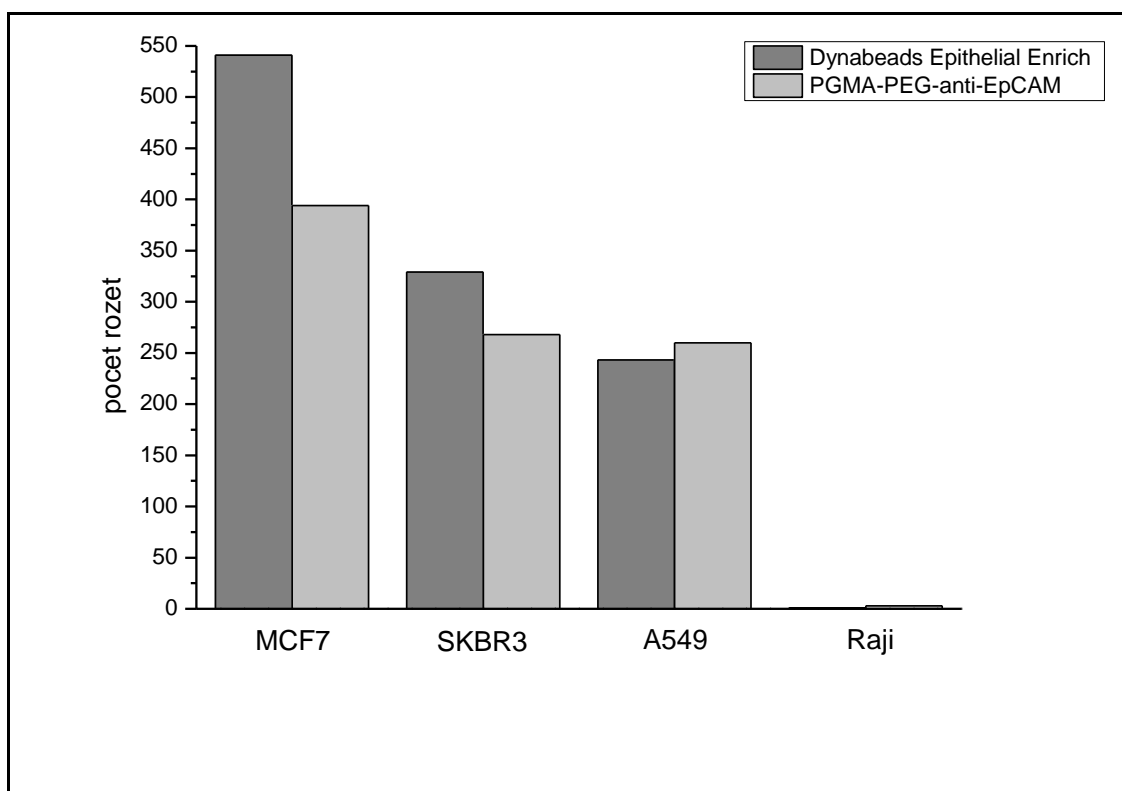
Mikroskopie imunomagnetické separace; 1. světelná mikroskopie, 60x; 2. FITC filtr (zelená – buňky), 60x; 3. TRITC filtr (červená – částice), 60x; 4. spojení 2. a 3., 60x; 5. spojení 1., 2. a 3., 60x.

Ze suspenze buněk Jurkat po imunomagnetické separaci nebyly nalezeny žádné rozety. Tento výsledek značí nízkou míru nescifické sorpce na zkoumané imunosorbenty. Při izolaci buněk ze směsného vzorku jsme detekovali buňky MCF7 značené fluorescenčně. Při této izolaci byla však pozorována nescifická sorpce buněk Jurkat ve větší míře u námi připraveného imunosorbentu.

Nakonec jsme provedli porovnání imunosorbentů při izolaci buněk s různou expresí molekuly EpCAM podle kapitoly č. 3.6. V buněčné suspenzi bylo vždy 2×10^6 buněk/1ml. V tabulce č. 25 je vyjádřena míra exprese molekuly EpCAM buněčných linií. Porovnání imunosorbentů podle počtu rozet uvádí graf č. 3.

Tabulka 25.: Míra exprese molekuly EpCAM používaných buněčných linií.

Buněčná linie	Míra exprese molekuly EpCAM
MCF7	+++
SKBR3	++
A549	+
Raji	-



Graf 3.: Porovnání imunosorbentů podle počtu rozet při imunomagnetické separaci buněčných linií s různou mírou exprese molekuly EpCAM.

Při počítání rozet po imunomagnetické separaci různých buněčných linií se námi vyvinutý imunosorbent téměř vyrovnal komerčně dodávanému, míra nespecifické sorpce byla u obou nosičů minimální.

6 ZÁVĚR

Tématem diplomové práce bylo vyvinout nový imunosorbent s minimální nespecifickou sorpcí pro izolaci cirkulujících nádorových buněk a jeho následné porovnání s komerčně dodávaným nosičem.

Povrch magnetických částic jsme proto modifikovali polyetylenglykolem, abychom dosáhli minimální nespecifické sorpce. Dále jsme optimalizovali množství polyetylenglykolu k dosažení maximální účinnosti následné vazby protilátek. Došli jsme ovšem k výsledku, že na množství polyetylenglykolu nezáleží.

Dále jsme porovnávali účinnost vazby modelových IgG na modifikované magnetické částice přes karboxylovou, hydrazidovou a hydroxylovou skupinu. Vybrali jsme nejúčinnější metodu vazby přes každou funkční skupinu, kterou jsme používali k následné vazbě specifických protilátek anti-p53.

Potom jsme porovnali nespecifickou sorpci povrchově modifikovaného imunosorbentu s nemodifikovaným imunosorbentem a schopnost těchto nosičů specificky vázat protein p53 z lyzátů buněčných linií imobilizovanými specifickými protilátkami anti-p53. U povrchově modifikovaných částic byla nespecifická sorpce výrazně nižší. K izolaci proteinu p53 došlo při použití povrchově modifikovaného i nemodifikovaného imunosorbentu, bohužel nejsme schopni kvantifikovat množství imobilizovaného proteinu p53. Schopnost izolace proteinu p53 imunosorbenty zůstává zachována i při opakovaném použití.

Nakonec jsme porovnali schopnost izolace buněk s povrchovým antigenem EpCAM a nespecifickou sorpcí buněk bez tohoto antigenu námi připraveného imunosorbentu s komerčně dostupným nosičem. Schopnost specificky izolovat buňky ze směsných vzorků byla u obou imunosorbentů srovnatelná, nespecifická sorpce však byla u námi připraveného imunosorbentu vyšší. Při porovnání schopnosti imunosorbentů specificky izolovat buňky s různou mírou exprese molekuly EpCAM byla účinnost srovnatelná.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Who.int* [online]. 2013 [cit. 2013-3-16]. Challenges Facing Cancer Control Programmes. Dostupné z <http://www.who.int/cancer/media/en/410.pdf>
- [2] *Linkos.cz* [online]. 2013 [cit. 2013-3-16]. Co musíte vědět. Dostupné z <http://www.linkos.cz/zdroje-informaci/co-musite-vedet/>
- [3] *Svod.cz* [online]. 2013 [cit. 2013-3-16]. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Dostupné z <http://www.svod.cz/?sec=analzy>
- [4] REJTHAR A., VOJTĚŠEK B.: *Obecná patologie nádorového růstu*. Grada, Praha 2002.
- [5] MLADOŠEVIČOVÁ, B.: *Patofyziológia nádorových ochorení*. In HULÍN et al. *Patofyziológia*. Slovak Academic press, s.r.o., Bratislava 1998, s. 120.
- [6] MAČÁK J., Bořivoj V.: *Obecná patologie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2002.
- [7] COTRAN R. S. et al. *Robbins pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders, Philadelphia 1999.
- [8] FIALOVÁ B., BOUCHAL J., EHRMANN J.: *Buněčný cyklus, onkogeny a nádorové supresory*. [online]. 2013 [cit. 2013-3-4]. Dostupné z http://ustavpatologie.upol.cz/_data/section-1/81.pdf
- [9] LURJE, G. et al. Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies: current techniques and clinical implications. *Journal of Oncology*. 2010, ISSN: 1687-8469.
- [10] LUZZI, K. J. et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology*. 1998, č. 153, 3, s. 865-873. ISSN: 0002-9440.
- [11] FIDLER, I. J. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Research*. 1990. č. 50, 19, s. 6130- 6138. ISSN: 0099-7013.
- [12] RIETHDORF, S., PANTEL, K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology*. 2008, č. 75, 2, s. 140-148. ISSN: 1423-0291.
- [13] ELLIS, L. M., FIDLER, I. J. Angiogenesis and Metastasis. *European Journal of Cancer*. 1996, č. 32, 14, s. 2451-2460. ISSN: 0959-8049.

- [14] FEHM, T. et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*. 2005, č. 7, 2, s. 171-185. ISSN: 1465-3249.
- [15] TIBBE, A. G. J., MILLER, M. C., TERSTAPPEN, L. W. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry part A*. 2007, č. 71, 3, s. 154-162. ISSN: 1552-4930.
- [16] SLEIJFER, S. et al. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation?. *European Journal of Cancer*. 2007, č. 43, 18, s. 2645-2650. ISSN: 0959-8049.
- [17] LUZZI, K. J. et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology*. 1998, č. 153, 3, s. 865-873. ISSN: 0002-9440.
- [18] CHRISTOFORI, G. New signals from the invasive front. *Nature*. 2006, č. 441, 7092, s. 444-450. ISSN: 0028-0836.
- [19] VOULGARI, A., PINTZAS, A., Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, č. 1786, 2, s. 75-90. ISSN: 0304-4165.
- [20] MAEDA, M., JOHNSON K. R., WHEELLOCK, M. J. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *Journal of Cell Science*. 2005, č. 118, 5, s. 873-887. ISSN: 1477-9137.
- [21] NIEMAN, M. T. et al. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherine expression. *The Journal of Cell Biology*. 1999, č. 147, 3, s. 631-644. ISSN: 1540-8140.
- [22] VISVADER, J. E., LINDEMAN G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*. 2008, č. 8, 10, s. 755-768. ISSN: 1474-175X.
- [23] COLLINS, A. T. et al. Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Research*. 2005. č. 65, 23, s. 10946-10951. ISSN: 0099-7013.
- [24] MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008, č. 133, 4, s. 704-715. ISSN: 0092-8674.
- [25] HOLLIER, B. G., EVANS, K., MANI, S. A. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2009, č. 14, 1, s. 29-43. ISSN: 1573-7039.

- [26] CHEN, C. et al. Evidence for epithelial-mesenchymal transition of cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2011, č. 6, 1, ISSN: 1932-6203.
- [27] BIDDLE, A. et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Research*. 2011, č. 71, 15, s. 5317-5326. ISSN: 0099-7013.
- [28] CHEN, CH. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem(-like) cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters*. 2012. č. 7, ISSN: 1872-7980.
- [29] STOTT, S. L., et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 2010, č. 107, 43, s. 18392-18397. ISSN: 0027-8424
- [30] PALUMBO, J. S. et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell mediated elimination of tumor cells. *Blood Journal*. 2005, č. 105, 1, s. 178-185. ISSN: 1528-0020.
- [31] NIERODZIK, M. L., KARPATKIN, S. Thrombin induced tumor growth, metastasis, and angiogenesis: evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*. 2006, č. 10, 5, s. 355-362. ISSN: 1535-6108.
- [32] HOU, J. M., et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *American Journal of Pathology*. 2011, č. 178, 3, s. 989-996. ISSN: 0002-9440.
- [33] IM, J. H. et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Research*. 2004, č. 64, 23, s. 8613-8619. ISSN: 0099-7013.
- [34] AL-MEHDI, A. B. et al. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature Medicine*. 2000, č. 6, 1, s. 100-102. ISSN: 1078-8956.
- [35] ERPENBECK, L., et al. Inhibition of platelet GPIb alpha and promotion of melanoma metastasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010, č. 130, 2, s. 576-586. ISSN: 0022-202X.
- [36] NAGRATH, S., et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007, č. 450, s. 20-27. ISSN: 0028-0836.
- [37] RACK, B. K. et al. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010. č. 28, 15, s. 1003-1010. ISSN: 1527-7755.

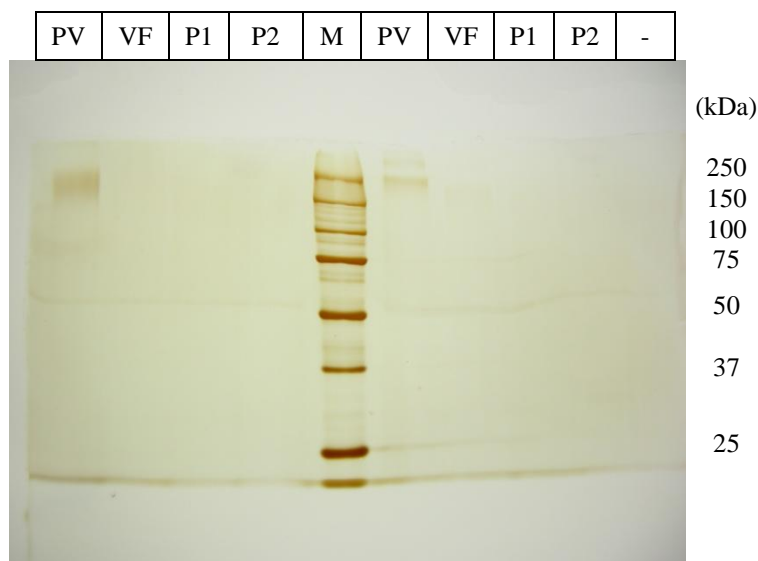
- [38] ALIX-PANABIERES, C., REITHDORF, S., PANTEL, K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clinical Cancer Research*. 2008, č. 14, 16, s. 5013-5021. ISSN: 1557-3265.
- [39] *Cellsearchctc.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-16]. The CELLSEARCH® CTC Test-Clinical Studies. Dostupné z <https://www.cellsearchctc.com/significance-ctcs/ctc-clinical-studies>
- [40] *Cellsearchctc.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-16]. The CELLSEARCH® CTC Test in metastatic breast cancer. Dostupné z <https://www.cellsearchctc.com/clinical-applications/mbc-clinical-trials-case-studies>
- [41] ALLAN, A. L., KEENEY, M. Circulating Tumor Cell Analysis: Technical and Statistical Considerations for Application to the Clinic. *Journal of Oncology*. 2010, ISSN: 1687-8469.
- [42] DEVRISE, L. A., et al. Circulating tumor cells as pharmacodynamic biomarker in early clinical oncological trials. *Cancer Treatment Reviews*. 2011, č. 37, 8, s. 579-589. ISSN: 0305-7372.
- [43] MOSTERT, B. et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2011, č. 127, 1, s. 33-41. ISSN: 1573-7217.
- [44] MENG, S., et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clinical Cancer Research*. 2004, č. 10, 24, s. 8152-8162. ISSN: 1557-3265.
- [45] PACHMANN, K. Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2005, č. 11, s. 5657-5658. ISSN: 1557-3265
- [46] PATERLINI-BRECHOT, P., BENALI, N. L. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters*. 2007, č. 253, 2, s. 180-204. ISSN: 1872-7980.
- [47] DESITTER, I., et al. A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells. *Anticancer Research*. 2011, č. 31, 2, s. 427-442. ISSN: 1791-7530.
- [48] *Screencell.com* [online]. 2013 [cit. 2013-3-28]. Non-invasive technology for isolating Rare Circulating Cells. Dostupné z <http://www.screencell.com/technology/>
- [49] *Screencell.com* [online]. 2013 [cit. 2013-3-28]. Rapid and Simple Isolation of Circulating Tumor Cells for clinical and Research Applications Using Screencell®. Dostupné z <http://www.screencell.com/wp-content/uploads/2013/01/ScreenCell-White-Paper.pdf>

- [50] VONA, G. et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer: perspectives of highly sensitive diagnostic detection. *Hepatology*. 2004, č. 39, 3, s. 792-797.
- [51] HOFMAN, V. et al. Preoperative Circulating Tumor Cell Detection Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method for Patients with Lung Cancer Is a New Prognostic Biomarker: perspectives of highly sensitive diagnostic detection. *Clinical Cancer Research*. č. 17,4, s. 827-835
- [52] ZHENG, S. et al. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood: perspectives of highly sensitive diagnostic detection. *Biomedical Microdevices*. 2011, č. 13, 1, s. 203-213.
- [53] HENRY, K. L., et al. Portable Filter-Based Microdevice for Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells. *Clinical Cancer Research*. 2010, č. 16, 20, s. 5011-5018. ISSN: 1557-3265.
- [54] *Greinerbioone.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-8]. OncoQuick® instruction manual. Dostupné z <http://www.greinerbioone.com/en/row/articles/literatures/manuals/>
- [55] *Greinerbioone.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-8]. Enrichment of disseminated, circulating tumour cells from peripheral blood. Dostupné z http://www.greinerbioone.com/en/row/articles/catalogue/article-groups/283_11/
- [56] Tan, S. J., et al. Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood. *Biomedical Microdevices*. 2009, č. 11, 4, s. 883-892. ISSN: 1572-8781.
- [57] *Stemcell.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-12]. RosetteSep™ Human Circulating Epithelial Tumor Cell Enrichment Cocktail. Dostupné z <http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/Tumor-Cell-Enrichment-Cocktail.aspx>
- [58] *Stemcell.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-12]. RosetteSep® Product Information Sheet. Dostupné z http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/C/6/E/4/A/28583_PIS_1_0_0.pdf
- [59] *Stemcell.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-12]. Cell Separation In As Little As 15 Minutes. Dostupné z http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/0/A/28960_CellSeparation.pdf
- [60] DE BONO, J. S. et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008, č. 14, 19, s. 6302-6309. ISSN: 1557-3265.

- [61] ALLARD, W. J. et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clinical Cancer Research*. 2004, č. 10, 20, s. 6897-6904. ISSN: 1557-3265.
- [62] *Invitrogen.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-15]. CELLection™ Epithelial Enrich. Dostupné z http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/collection_epithelial_enrich_manual.pdf
- [63] *Invitrogen.com* [online]. 2013 [cit.2013-4-15]. CELLection™ Epithelial Enrich. Dostupné z <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/16203>
- [64] *Miltenyibiotec.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-22]. Cancer research. Dostupné z <https://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001900/IM0001977.ashx>
- [65] *Miltenyibiotec.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-22]. CD326 (EpCAM) Tumor Cell Enrichment and Detection Kit, human. Dostupné z <https://www.miltenyibiotec.com/Products-and-Services/MACS-Flow-Cytometry/Reagents/Kits-and-assays/CD326-EpCAM-Tumor-Cell-Enrichment-and-Detection-Kit-human.aspx>
- [66] KÖNIQSBERG, R. et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. 2011, č. 50, 5, s. 700-710. ISSN: 1651-226X.
- [67] *Adnagen.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-9]. Detection of Circulating Tumor Cells. Dostupné z http://www.adnagen.com/cfscripits/main_technology.cfm?auswahl=01.25
- [68] *Adnagen.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-9]. AdnaTest ColonCancerDetect. Dostupné z http://www.adnagen.com/m088v01_upload/110622%20EN%20ColonDetect_Mail.pdf
- [69] ALIX-PANABIÉRES, C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent results in cancer research*. 2012, č. 195, s. 69-76. ISSN: 0080-0015.
- [70] ALIX-PANABIÉRES, C. et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2009, č. 11, 3, s. 39-49. ISSN: 1573-7217.

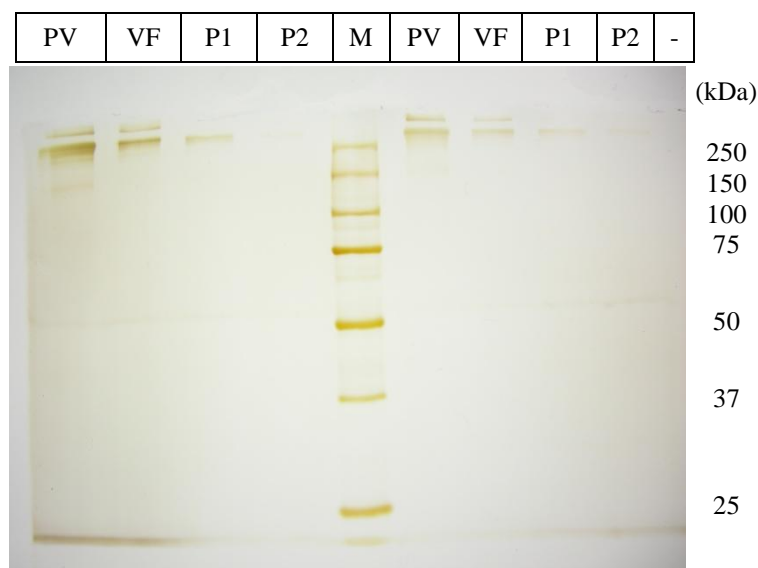
- [71] ZABAGLO, L. et al. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells. *Cytometry part A*. 2003, č. 55, 2, s. 102-108. ISSN: 1552-4930.
- [72] RING, A. E. et al. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *British Journal of Cancer*. 2005, č. 92, 5, s. 906-912. ISSN: 0007-0920.
- [73] PACHMANN, K. et al. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Research*. 2005, č. 7, 6, s. 975-979. ISSN: 1573-7217.
- [74] SEQUIST, L. V., et al. The CTC-Chip. *Journal of Thoracic Oncology*. 2009, č. 4, 3, s. 281-283.
- [75] *Sciencedaily.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-28]. Second-Generation Device More Effective in Capturing Circulating Tumor Cells. Dostupné z <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/10/101012151242.htm>
- [76] *Biocept.com* [online]. 2013 [cit. 2013-4-28]. CEE™-Cell Enrichment and Extraction. Dostupné z <http://www.biocept.com/cee%E2%84%A2-cell-enrichment-and-extraction-0>
- [77] PECOT, C. V. et al. Redefining CTCs: Detection of cytokeratin-negative circulating tumor cells (CTCs). *Cancer Research*. 2011, č. 71, 8, s. 1553- 1558. ISSN: 0099-7013.
- [78] MIKOLAJCZYK S. D. et al. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative CTC in Peripheral Blood. *Journal of Oncology*. 2011, ISSN: 1687-8469
- [79] SALIBA, A.-E. et al. Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays: perspectives of highly sensitive diagnostic detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, č. 107, 33, s. 14524-14529
- [80] AUTEBERT, J. et al. Microfluidic: An innovative tool for efficient cell sorting. *Methods*. 2012, č. 57, 3, s. 297-307.
- [81] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, č. 227, s. 680-685. ISSN: 0028-0836.
- [82] OAKLEY B. R., KIRSCH, D. R., MORRIS N. R. A simplified ultra sensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1980, č. 105, 1, s. 361-363. ISSN: 0003-2697.

8 PŘÍLOHY



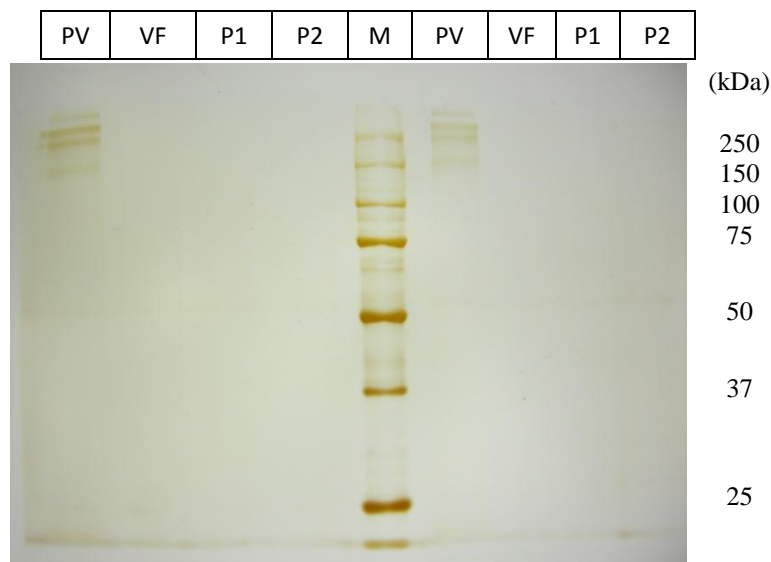
Obrázek P1.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s karboxylovou funkční skupinou jednokrokovou metodou (1. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda s použitím EDAC (vlevo) a s použitím EDAC a sulfo-NHS (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



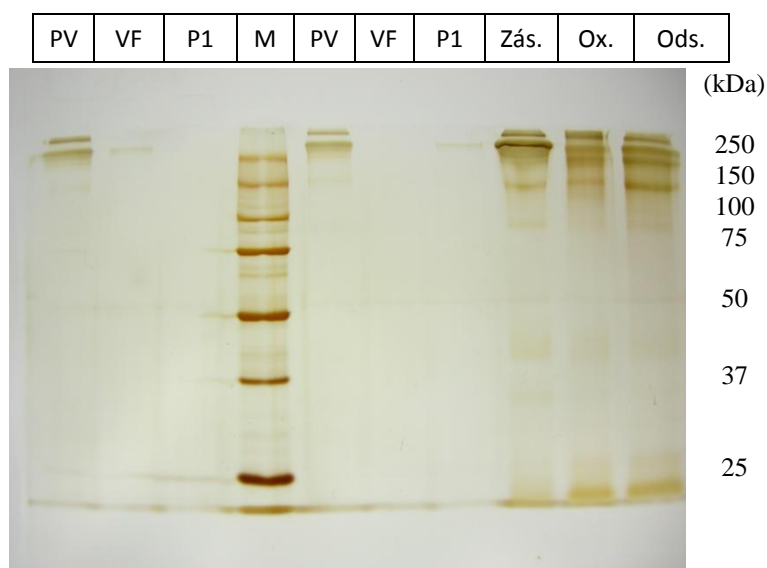
Obrázek P2.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s karboxylovou funkční skupinou dvoukrokovou metodou (1. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda s použitím EDAC (vlevo) a s použitím EDAC a sulfo-NHS (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



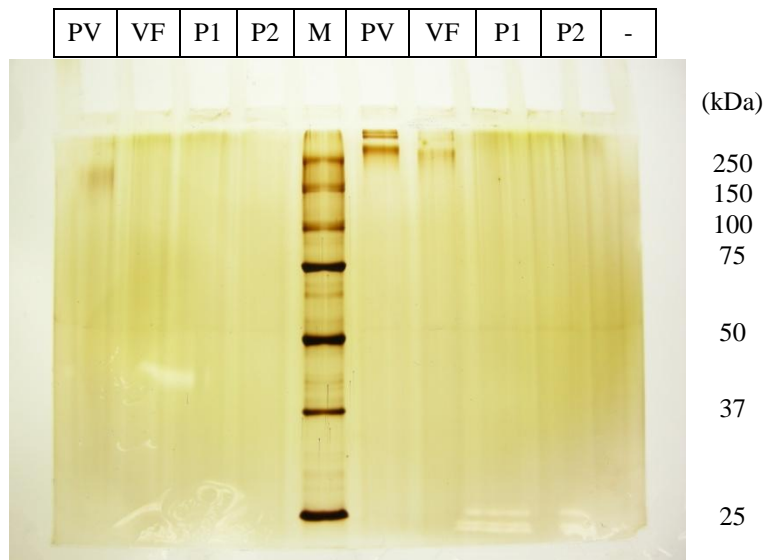
Obrázek P3.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydrazidovou funkční skupinou (1. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda bez odsolení zoxidovaných protilátek (vlevo) a s odsolením zoxidovaných protilátek (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



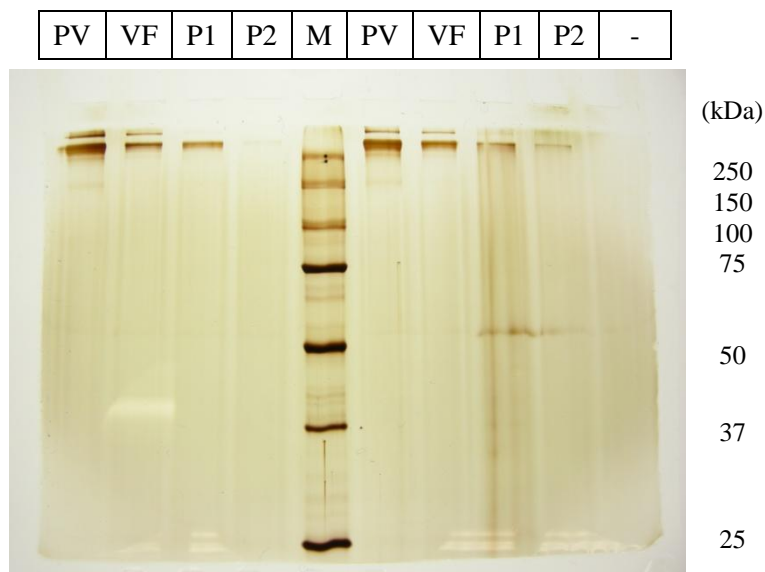
Obrázek P4.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydroxylovou funkční skupinou (1. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda se stabilizací kyanoborohydridem sodným (vlevo) a se stabilizací triacetoxyborohydridem sodným (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, M – molekulový marker, Zás. – zásobní roztok IgG, Ox. – IgG po oxidaci, Ods. – IgG po odsolení.



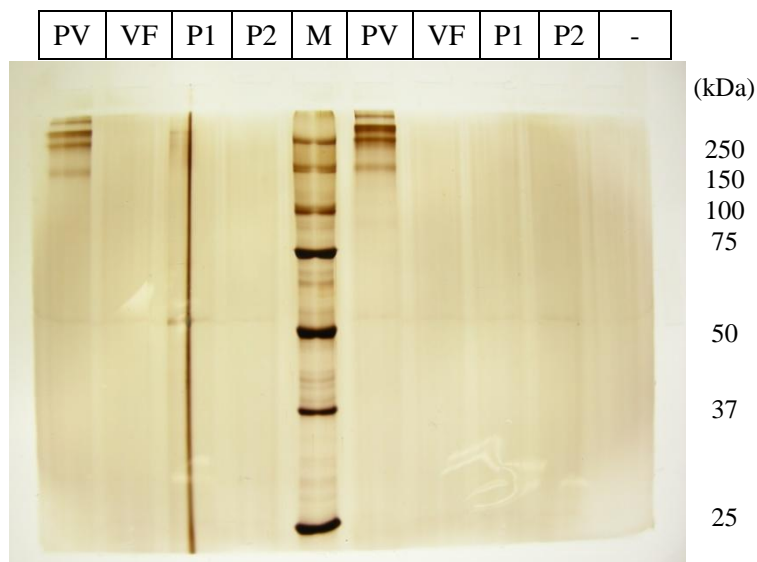
Obrázek P5.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s karboxylovou funkční skupinou jednokrokovou metodou (2. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda s použitím EDAC (vlevo) a s použitím EDAC a sulfo-NHS (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



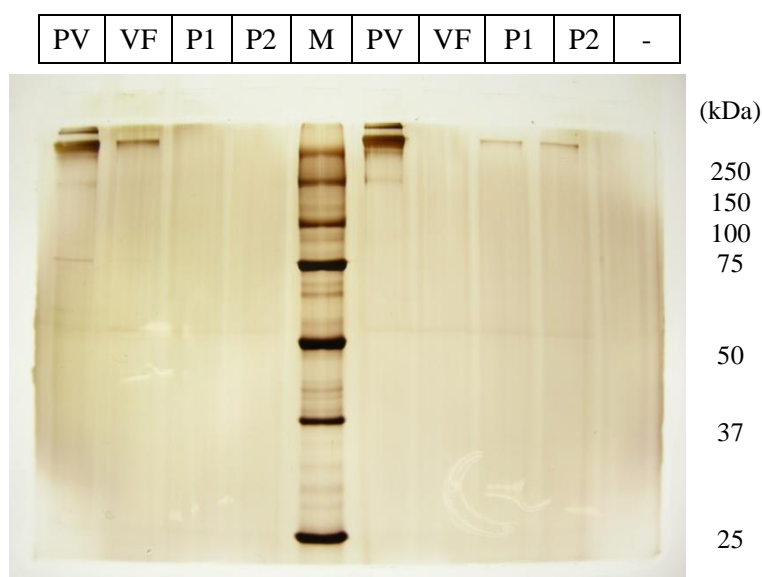
Obrázek P6.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s karboxylovou funkční skupinou dvoukrokovou metodou (2. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda s použitím EDAC (vlevo) a s použitím EDAC a sulfo-NHS (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



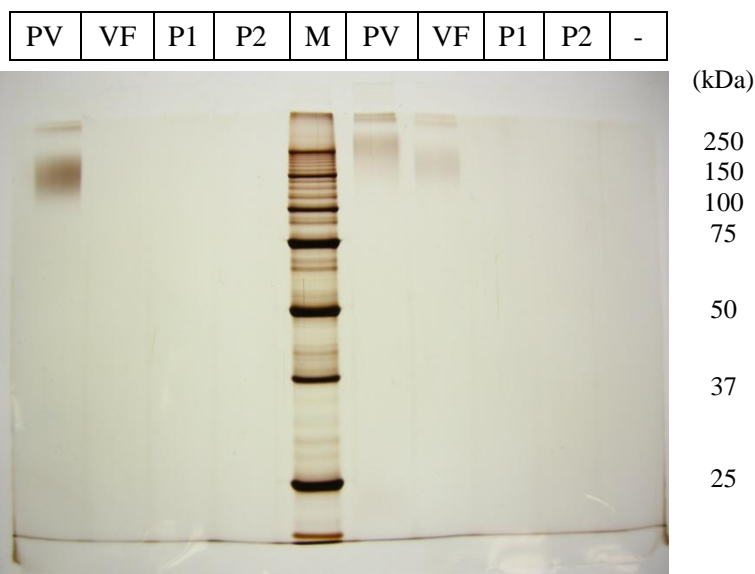
Obrázek P7.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydrazidovou funkční skupinou (2. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda bez odsolení zoxidovaných protilátek (vlevo) a s odsolením zoxidovaných protilátek (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



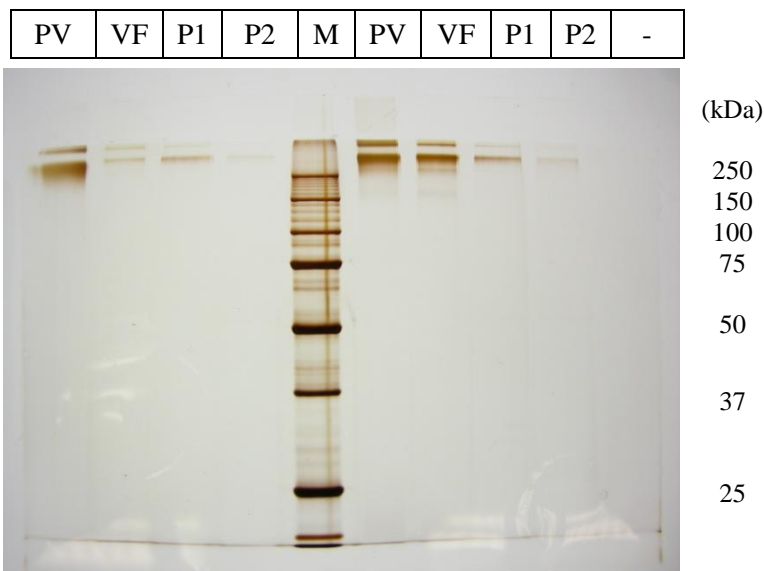
Obrázek P8.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydroxylovou funkční skupinou (2. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda se stabilizací kyanoborohydridem sodným (vlevo) a se stabilizací triacetoxyborohydridem sodným (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



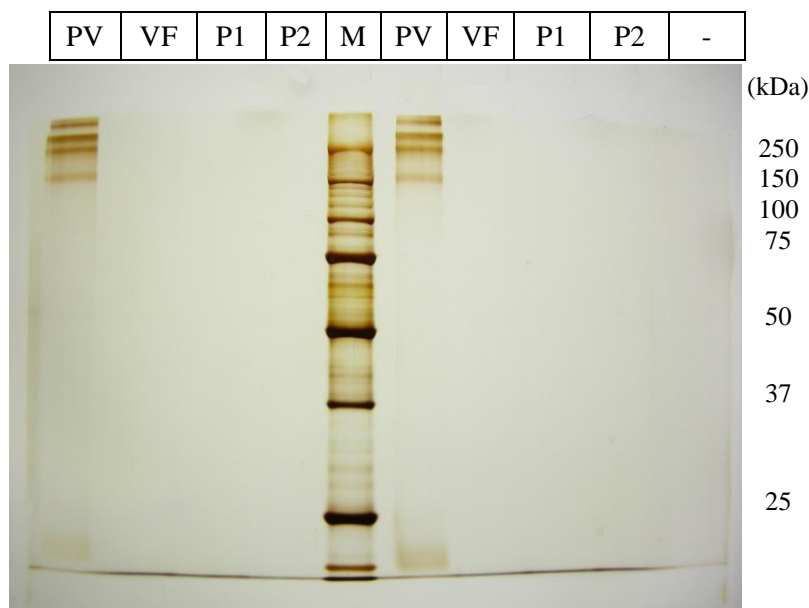
Obrázek P9.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s karboxylovou funkční skupinou jedнокrokovou metodou (3. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda s použitím EDAC (vlevo) a s použitím EDAC a sulfo-NHS (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



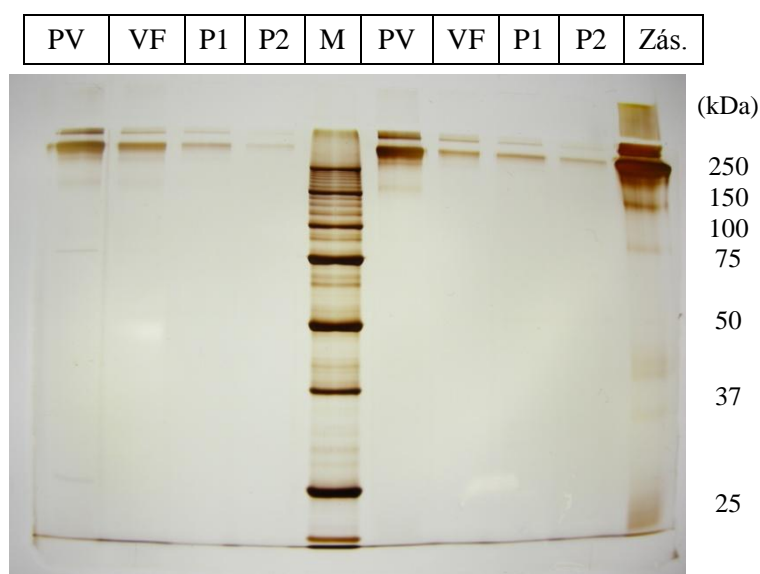
Obrázek P10.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s karboxylovou funkční skupinou dvoukrokovou metodou (3. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda s použitím EDAC (vlevo) a s použitím EDAC a sulfo-NHS (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



Obrázek P11.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydrazidovou funkční skupinou (3. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda bez odsolení zoxidovaných protilátek (vlevo) a s odsolením zoxidovaných protilátek (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker.



Obrázek P12.: SDS-PAGE roztoků ligandu (IgG) před a po vazbě molekul IgG na nosič s hydroxylovou funkční skupinou (3. opakování).

Podmínky analýzy: 10% gel; vložené napětí při separaci 180 V; doba separace 50 minut; barvení 20% roztokem dusičnanu stříbrného. Popis: Metoda se stabilizací kyanoborohydridem sodným (vlevo) a se stabilizací triacetoxyborohydridem sodným (vpravo); PV – původní vzorek, VF – vazebná frakce, P1 – první promývací frakce, P2 – druhá promývací frakce, M – molekulový marker, Zás. – zásobní roztok IgG.