

## ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA KLINICKÝCH VZORKŮ – CESTA K TRANSLAČNÍMU VÝZKUMU

*Nové pohledy na analytickou chemii\**

LUDMILA MORÁŇOVÁ<sup>a</sup>, MARTIN BARTOŠÍK<sup>a</sup>, JOHANA STRMISKOVÁ<sup>a</sup> a KATEŘINA NOVÁKOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Výzkumné centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO), Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, <sup>b</sup> Banka biologického materiálu (BBM), Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno  
ludmila.moranova@mou.cz

Došlo 23.6.23, přijato 7.8.23.

Elektrochemická detekce biomolekul se neustále posouvá a má velký potenciál využití v klinické praxi. V posledních letech je kladen důraz na přesné a rychlé stanovení biomarkerů na bázi nukleových kyselin – DNA a RNA. Značná část výzkumných projektů však nereflektuje požadavky na demonstraci vyvinutých metod na klinickém materiálu, což jejich aplikační potenciál značně snižuje. Klinický materiál vnáší do výzkumu oproti modelovým vzorkům větší variabilitu a práce s ním vyžaduje specifické podmínky. Problém získávání klinického materiálu pro výzkumné účely z velké části řeší banky biologického materiálu, které mohou nabídnout vzorky a data vhodné pro konkrétní výzkumný záměr.

Klíčová slova: biosenzor, izotermální amplifikační techniky, elektrochemie, biomarker, biobanka

### Obsah

1. Úvod
2. Elektrochemická detekce nádorových biomarkerů na úrovni nukleových kyselin
  - 2.1. DNA nádorové biomarkery
  - 2.2. RNA nádorové biomarkery
3. Výzvy klinického materiálu
4. Síť českých biobank – BBMRI.cz
5. Závěr

### 1. Úvod

Včasná a přesná diagnostika zhoubných nádorových onemocnění má v současné medicíně velký vliv na úspěšnost jejich terapie, neboť zde platí, že čím dříve je nemoc odhalena, tím lépe je léčitelná. K tomuto účelu slouží nádorové biomarkery, které mohou pomoci odhalit škodlivé změny v těle dříve, než se objeví první symptomy<sup>1</sup>.

Nádorové onemocnění je charakteristické nekontrolovaným dělením buněk, čemuž předchází změny na úrovni nukleových kyselin a následně proteinové skladby buněk.



*Ludmila Moráňová pracuje jako výzkumná pracovnice ve Výzkumném centru aplikované molekulární onkologie pod Masarykovým onkologickým ústavem. Titul Ph.D. získala v roce 2022 na Masarykově univerzitě a její závěrečná práce byla oceněna cenou děkana za excelentní výsledky v doktorském studijním programu a rovněž cenou prorektorky pro výzkum a doktorské studium. V době svého studia absolvovala zahraniční stáž na Universidad Complutense de Madrid ve Španělsku pod vedením profesorky Susany Campuzano. Aktuálně je spoluautorkou 14 publikací, h-index 7. V současné době se věnuje vlastnímu výzkumnému projektu zaměřenému na vývoj bioelektrochemických metod pro detekci lidského cytomegaloviru u onkologických pacientů. V roce 2023 získala Cenu Metrohm za nejlepší publikaci mladého chemika v oblasti elektroanalytické chemie.*

Diagnostika nádorových biomarkerů má svá specifika, neboť potřebuje odhalit změny z počátku velmi malého množství buněk. Obecně lze říci, že jsou zde kladeny vyšší nároky na celkovou citlivost metod. Ideální nádorový biomarker musí být jednak vysoce tkáňově specifický, a zároveň schopný rozlišit benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné) onemocnění. Může se jednat o celou škálu molekul od různých typů nukleových kyselin, přes proteiny, lipidy až po nejrůznější metabolity, či signální molekuly. Jejich detekce, často pouze na úrovni změn jejich hladin, může pomoci zachytit již raná stádia nádorových onemocnění, která je potřeba identifikovat co nejméně invazivním způsobem (diagnostický biomarker), nebo charakterizovat případnou odpověď na léčbu (prediktivní biomarker), či chování a vývoj nádoru v průběhu léčby (prognostický biomarker)<sup>1,2</sup>.

V současné době jsou nepoužívanější metody detekce biomarkerů na bázi nukleových kyselin založené na polymerasové řetězové reakci (polymerase chain reaction, PCR), hybridizaci specifických sekvencí (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), nebo sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS). Tyto rutinní techniky, využívající především optické metody, jsou založené na pozorování změny barvy (kolorimetrie), fluorescence (fluorimetrie), luminiscence (luminometrie), a dalších optických vlastností. Obecně je detekce biomarkerů na


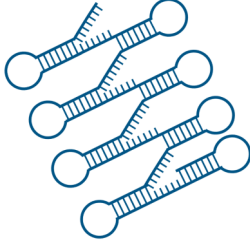

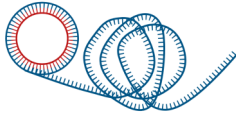
úrovni nukleových kyselin, tj. DNA nebo RNA, časově i finančně náročná a často vyžaduje přesnost stanovení jednoho mutovaného nukleotidu nebo detekci několika málo kopií DNA molekul<sup>3–6</sup>. Z těchto důvodů je patrný výrazný trend ve vývoji biosenzorů, které ve spojení s citlivou elektrochemickou detekcí skýtají řadu výhod, např. vyšší rychlost, nižší finanční a instrumentální náročnost, nebo možnost paralelní detekce více vzorků či biomarkerů najednou. Navíc v kombinaci s inovativními strategiemi, jako jsou izotermální amplifikační techniky (IAT), značené nukleotidy, protilátky, nanomateriály, a specifické hybridizační sondy, je možné dosáhnout ultra-vysoké citlivosti a selektivity<sup>7</sup>.

IAT představují časově efektivnější alternativu klasické PCR, protože celá reakce probíhá při konstantní teplotě. Termocykler potřebný pro PCR tak může být nahrazen termoblokem, nebo v případě čipových technologií odporovým článkem. Za poslední tři dekády bylo vyvinuto několik IAT, z nichž mezi nejčastěji používanými patří tzv. LAMP (loop-mediated isothermal amplification), RPA (recombinase polymerase amplification) a RCA (rolling-circle amplification)<sup>8,9</sup> (porovnání jednotlivých parametrů metod viz tab. I).

LAMP je nejrozšířenější IAT, která vyžaduje 4–6 specifických primerů, a u které dochází ke tvorbě smyček (loop), specifických struktur ve tvaru činky (dumbbell)

Tabulka I

Srovnání podmínek amplifikačních technik – čas reakce, typ amplifikační reakce, počet nutných primerů a schematické zobrazení výsledných produktů reakcí

Reakce	Trvání [min]	Typ	Teplota [°C]	Počet primerů	Produkt
PCR <sup>a</sup>	60–150	cyklická exponenciální	60–95	2	
LAMP <sup>b</sup>	15–60	izotermální exponenciální	60–65	4–6	
RPA <sup>c</sup>	20–40	izotermální exponenciální	37–40	2	
RCA <sup>d</sup>	20–30	izotermální lineární	37–40	1–2	

<sup>a</sup> PCR – polymerase chain reaction, <sup>b</sup> LAMP – loop-mediated isothermal amplification, <sup>c</sup> RPA – recombinase polymerase amplification, <sup>d</sup> RCA – rolling-circle amplification

a amplikonů o různých délkách v průběhu jedné reakce. Při detekci LAMP amplikonů na agarosovém gelu se místo klasického jednoho proužku objevuje žebříček složený z různě dlouhých LAMP produktů. Doba reakce se pohybuje mezi 15–75 minutami, v závislosti na zastoupení analytu a koncentraci vzorku, při teplotě okolo 65 °C (cit.<sup>8,10,11</sup>). Velmi často se metoda využívá pro detekci DNA patogenních agens (bakterií a virů)<sup>10,12–14</sup>. Současně existují také její alternativy, jako qLAMP (kvantitativní/měření v reálném čase) nebo RT-LAMP pro analýzu RNA (reverzní transkripce RNA probíhá jednodívkově ve stejné reakci)<sup>11</sup>. LAMP reakce je oproti PCR méně citlivá k různým inhibitorům běžně přítomným v biologických vzorcích. Nevýhodou této metody je složitější návrh primerů a větší citlivost vůči kontaminacím<sup>8,13</sup>.

RPA reakce vyžaduje jednodušší design primerů, podobných těm pro PCR a stejně tak produkty reakce jsou na gelu vizualizované jako jeden proužek o specifické velikosti. Podstata reakce spočívá v přítomnosti více enzymů, které nahrazují procesy, ke kterým dochází díky cyklickému střídání teplot u klasické PCR. Jedná se konkrétně o rekombinasi, která zajišťuje specifické nasednutí primeru, dále tzv. „single-stranded DNA-binding protein“, tedy protein ukotvující vazbu primeru k DNA templátu, a polymerasu. Reakce obvykle probíhá při 37–42 °C a díky absenci cyklování teplot je celý proces rychlejší, cca 20–30 min (cit.<sup>15</sup>). Nevýhodou této technologie je její vyšší cena způsobená jediným výrobcem vlastním patent (TwistDx).

Poslední zmiňovanou technikou je RCA reakce, která vytváří produkty s desítkami až stovkami tandemových repetice amplifikovaného templátu. Základem je speciálně navržená „padlock“ sonda, jejíž oba konce jsou komplementární k cílové sekvenci DNA nebo RNA a navíc je na svém 5'-konci značena fosfátovou skupinou. Během vazby na cílovou sekvenci dochází k cirkularizaci „padlock“ sondy, oba konce se dostávají do těsné blízkosti, a jsou následně v procesu ligace kovalentně spojeny. Vzniká kruhová DNA, která pak slouží jako templát pro samotnou RCA reakci, a to v přítomnosti primeru a speciální polymerasy. Kromě této klasické varianty existují citlivější varianty RCA typu „hyperbranched RCA“ (využívající alespoň dva různé primery, čímž vzniká rozvětvený RCA produkt), nebo „circle-to-circle RCA“ (C2C RCA, u které probíhá restriční štěpení RCA produktu a vznik dalších kruhových DNA)<sup>16</sup>. Nevýhodou této reakce je víceokrový postup a nutnost relativně drahých fosforylovaných „padlock“ sond.

Spojení IAT s elektrochemickou detekcí představuje zajímavou alternativu k optickému stanovení, zvláště s ohledem na nižší cenu přístrojového vybavení a větší toleranci vůči nejrůznějším kontaminantům.

## 2. Elektrochemická detekce nádorových biomarkerů na úrovni nukleových kyselin

### 2.1. DNA nádorové biomarkery

Konkrétní nádorová onemocnění mohou být u pacientů spojena s výskytem specifických sekvencí DNA, nebo také s nestandardním množstvím pro buňku přirozených sekvencí DNA, ať už na úrovni počtu kopií některých genů, nebo na úrovni jejich exprese, což se projevuje změnou množství mRNA syntetizované při procesu transkripce. Značná část biomarkerů nádorových onemocnění má charakter nukleových kyselin, tj. DNA či RNA. Tento typ makromolekulárních biomarkerů může být přítomen přímo v nádorových buňkách, ale také mimo ně, jako volně cirkulující DNA (ctDNA) v krevním řečišti, či v tělních sekretech<sup>17</sup>.

Nejčastěji zmiňovanou skupinou DNA a RNA nádorových biomarkerů jsou sekvence patřící onkogenům vzniklým aktivující mutací pro buňku přirozených proto-onkogenů či výsledkům inaktivujících mutací nádorových supresorů. Proteinové produkty těchto mutovaných genů zpravidla narušují regulovaný průběh buněčného cyklu a dělení, což vede k nekontrolovatelné proliferaci, která je jednou z hlavních charakteristik nádorových buněk. Vznik onkogenů či ztráta funkce nádorového supresoru mohou být způsobeny tzv. bodovou mutací čili nahrazením jednoho nukleotidu jiným v sekvenci DNA tak, že dojde ke změně významu daného kodonu při zachování čtecího rámce, jako je tomu například u mutovaných forem genů *BRAF* a *KRAS* asociovaných s některými typy nádorů. V genu *BRAF* je aktuálně nejvíce klinicky významná mutace V600E, způsobující na proteinové úrovni aminokyselinovou záměnu valinu za kyselinu glutamovou. Tato mutace se objevuje u více než 85 % případů maligního melanomu a více než 8 % případů kolorektálního karcinomu a má významný vliv na výběr terapeutického přístupu<sup>18,19</sup>. Jeden z projektů naší výzkumné skupiny je zaměřen na vývoj rychlé a snadno proveditelné metody detekce bodových mutací těchto genů<sup>20</sup>.

Zejména u inaktivačních mutací může v daných genech docházet také k delecím, či insercím, většinou vedoucím ke změně čtecího rámce nebo předčasnému vytvoření stop kodonu. V některých případech jsou onkogeny vytvářeny fúzí při chromozomových přestavbách. Nejvýznamnějším fúzním genem pro nádorová onemocnění je *BCR-ABL1*, který je vytvořený translokací chromozomů 9 a 22. Znakem nádorového onemocnění mohou být také standardní sekvence DNA či RNA, které jsou přítomny ve zvýšeném nebo sníženém množství, jako je například zmnožení chromozomů v nádorových buňkách při akutní lymfoblastické leukemii<sup>21</sup>. Na expresní aktivitu genů má vliv také methylace DNA zabraňující transkripci postižených částí řetězce, aniž by došlo ke změnám v samotné sekvenci DNA (cit.<sup>22</sup>). Tento typ epigenetické modifikace DNA může rovněž posloužit jako nádorový biomarker<sup>23</sup>.

U jistých typů nádorových onemocnění byl prokázán vliv patogenních agens na jejich rozvoj. Typickým příkla-

dem jsou onkogenní kmeny lidského papilomaviru (HPV) v rozvoji rakoviny děložního čípku nebo nádorů hlavy a krku, onkomodulační schopnosti lidského cytomegaloviru (hCMV), či Kaposiho sarkomu a B-lymfomu u pacientů infikovaných HIV. V rámci této kategorie nádorových biomarkerů se naše výzkumná skupina zabývá vývojem metod pro detekci DNA biomarkerů onkogenních kmenů HPV, zejména typů 16 a 18, které jsou v nádorových buňkách karcinomu děložního čípku přítomny nejčastěji. Nově se také věnuje vývoji elektrochemických metod pro diagnostiku hCMV v tumorech<sup>24</sup>.

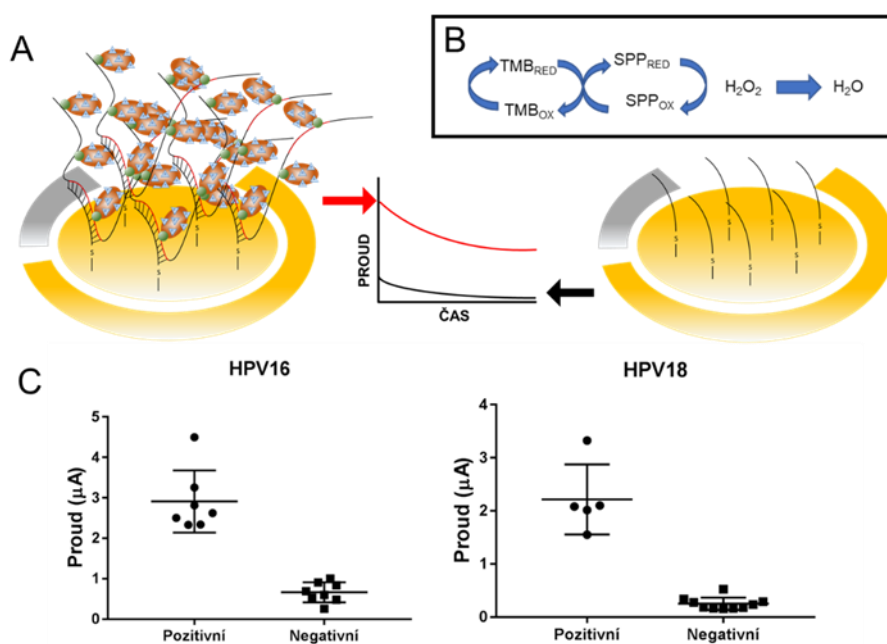
U HPV dochází k rozvoji nádorů po několika měsících až letech po infekci, kdy je virus po celou dobu detegovatelný a vyšetření těchto virů má tedy velký preventivní potenciál. Cílem našeho výzkumu je přitom zvýšit informativní hodnotu diagnostiky z úrovně zjištění přítomnosti virové DNA v klinických vzorcích<sup>10,12,13,25</sup> na úroveň kvantifikace a stanovení transkripční aktivity viru, což by mohlo přispět k lepšímu odhadu reálného rizika rozvoje karcinomu (viz níže část 2.2.).

V roce 2016 byl publikován náš první článek zabývající se detekcí HPV, a to vysoce rizikových kmenů 16 a 18, za použití elektrochemického měření na tištěné uhlíkové elektrodě<sup>25</sup>. Zde popisovaná detekční metoda využívala amplifikaci cílové sekvence pomocí PCR a následnou hybridizaci amplikonů na oligonukleotidové sondy přichycené k magnetickým kuličkám. Na druhý konec amplikonů byla navázána detekční oligonukleotidová sonda ne-

soucí molekulu digoxigeninu (DIG), jehož prostřednictvím se na vzorky mohl navázat komplex křenuvé peroxidasy (horse radish peroxidase, HRP) s antidigoxigeninem. Pro samotné měření byl použit detekční systém sestávající z HRP, hydrochinonu a peroxidu vodíku. Tímto postupem bylo dosaženo spolehlivého rozlišení mezi DNA HPV16 a HPV18. Později byla amplifikace pomocí PCR nahrazena izotermální amplifikační metodou LAMP, při které byl do amplikonů přímo inkorporován DIG-dUTP pro vazbu antiDIG-HRP. Tato pozměněná metoda byla publikována v roce 2018 (cit.<sup>10</sup>) a později byla demonstrována na větším souboru klinických vzorků ( $n = 61$ )<sup>12</sup>. V roce 2021 byla navíc optimalizována metoda aplikována na buněčné lyzáty, čímž bylo prokázáno, že detekce může být provedena i bez předchozí izolace DNA (cit.<sup>13</sup>). Krokem k významnému zjednodušení detekční metody je také modifikace povrchu zlatých pracovních elektrod tak, aby docházelo k přímé hybridizaci (obr. 1). Vzorky se tak pro měření nemusí zpracovávat na magnetických kuličkách, a poté aplikovat na elektrodu, ale mohou být imobilizovány přímo na ní. Tento způsob provedení detekce DNA HPV16 a HPV18 byl publikován v roce 2022 (cit.<sup>14</sup>).

## 2.2. RNA nádorové biomarkery

Molekuly RNA, obdobně jako DNA, představují rozmanitou skupinu nádorových biomarkerů. Díky masiv-



Obr. 1. Detekce HPV viru na tištěné zlaté elektrodě. **A:** V případě, že LAMP reakce proběhla na základě přítomnosti templátu (HPV), došlo k hybridizaci biotin-dUTP značených amplikonů na sondu imobilizovanou na povrchu zlatých elektrod a následně vazbě streptavidinem značené polymerní peroxidasy (SPP). **B:** Při aplikaci elektrochemického substrátu – tetramethylbenzidinu (TMB) – dochází k reakci s SPP, která je měřena amperometricky. **C:** Výsledné proudové odezvy, odečtené po 120 s reakce pro detekci HPV16 a HPV18 pozitivní a negativní pacientky. Upraveno dle cit.<sup>14</sup>

nímu paralelnímu sekvenování nové generace bylo identifikováno velké množství kódujících i nekódujících RNA, jejichž hladina se mění během vzniku nebo progresu nádorového onemocnění. Mezi známé příklady kódujících biomarkerů, tj. mRNA transkriptů, patří např. komerčně dostupný panel padesáti mRNA sekvencí s názvem PAM50 (Prosigna test) pro jednodušší klasifikaci nádorů do jednotlivých podtypů u rakoviny prsu (<https://www.prosigna.com/>). Dalšími potenciálně zajímavými biomarkery jsou virové transkripty E6 a E7 z vysoce rizikových HPV. I když se HPV infekce obvykle stanovuje na úrovni virové DNA, virová E6/E7 mRNA by mohla sloužit jako prognostický biomarker korelující se zvýšenou aktivitou viru a tudíž s vyšším rizikem nádorové transformace napadené tkáně<sup>26</sup>. Proto se i my v současné době věnujeme vývoji elektrochemického testu pro stanovení hladin E6/E7 mRNA pomocí RT-LAMP, magnetických kuliček a elektrochemického měření, a to v kombinaci s monitorováním genu *E2*, který bývá po integraci HPV do hostitelského genomu eliminován<sup>27</sup>.

Nekódující RNA dnes představují obrovskou a rozmanitou skupinu RNA molekul, které regulují řadu fyziologických procesů (např. buněčné dělení, diferenciaci, vývoj a růst orgánů, imunitu nebo metabolismus). Není proto divu, že mají vliv i na patogenezi různých skupin onemocnění, zejména nádorových nebo autoimunitních. Mezi nekódující RNA patří jednak krátké nekódující RNA o délce menší než 200 nukleotidů (obvykle kolem 20–30 nukleotidů), zejména mikroRNA (miRNA), malé interferující RNA (small interfering RNA, siRNA) nebo Piwi-interagující RNA (piwi-interacting RNA, piRNA), a též rozsáhlá skupina tzv. dlouhých nekódujících RNA (long non-coding RNA, lncRNA) o délce větší než 200 nukleotidů<sup>6</sup>.

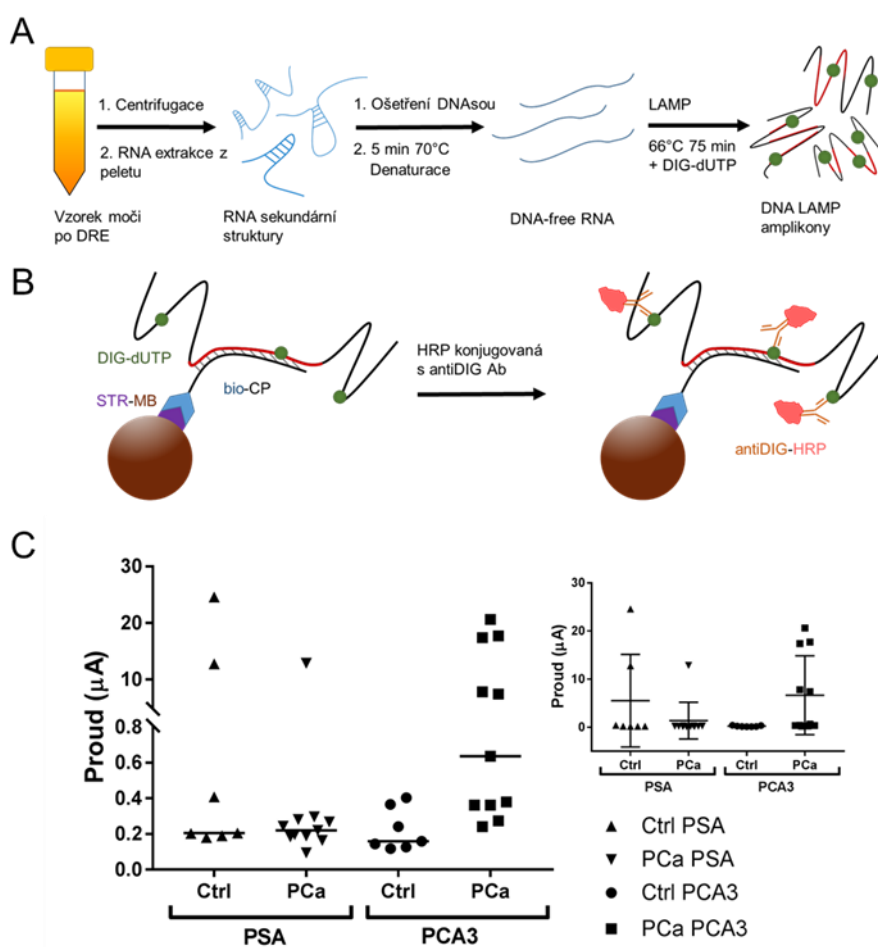
Nejvíce studované jsou zřejmě miRNA – molekuly známé už třicet let<sup>28</sup>, které jsou už delší dobu považovány nejenom za potenciální nádorové biomarkery<sup>29,30</sup>, ale nově i terapeutika<sup>31</sup> nebo terapeutické cíle<sup>32</sup>. Molekuly miRNA dělíme nejčastěji do dvou skupin, a to na tumor supresorové a onkogenní; tumor supresorové miRNA tlumí expresi onkogenů, a oproti zdravé tkáni tak mají v nádorech výrazně sníženou hladinu. Naopak onkogenní miRNA jsou v nádorech nadměrně exprimovány a jejich hladiny jsou vyšší v porovnání se zdravou tkání<sup>3</sup>. Současné metody detekce miRNA, např. RT-PCR, digitální PCR, DNA čipy (microarrays) nebo NGS jsou vysoce citlivé a umožňují paralelní detekci stovek molekul současně; jsou ovšem nákladné z hlediska instrumentace nebo potřebných reagentů, a rovněž časově náročné. Z tohoto hlediska by elektrochemické metody mohly být zajímavou alternativou<sup>33</sup>, což jsme chtěli demonstrovat vlastním vývojem a otestováním dvou různých strategií pro detekci onkogenních miRNA<sup>34,35</sup>. V první strategii jsme použili speciální protilátku S9.6 vůči krátkým hybridním DNA/RNA duplexům pro zachycení cílové miRNA sekvence (pomocí primární DNA sondy) na magnetických kuličkách, a dvě biotinem značené pomocné DNA sondy, které jsou k sobě částečně komplementární, a které po vazbě na primární DNA sondu vytvoří dlouhý řetězec (z toho název

hybridizační řetězová reakce, z angl. „hybridization chain reaction“, HCR). Tuto metodu jsme použili pro detekci panelu tří miRNA (miR-21, let-7a, miR-31) přímo v klinickém materiálu, a to ve stěrech z děložního hrdla žen, a úspěšně ji validovali pomocí digitální PCR (cit.<sup>34</sup>). I druhá strategie zahrnovala magnetické kuličky, ovšem za použití tzv. „His-tag zinc finger“ proteinu, který preferenčně váže dvoušroubovicové RNA duplexy, složené z cílové miR-21 a RNA sondy značené biotinem<sup>35</sup>. Obdobně jako v předchozí strategii, amperometricky měřený proud pocházel z peroxidasové reakce po vazbě streptavidin-HRP konjugátu na biotinem značenou sondu. Strategii jsme úspěšně aplikovali na prsní nádorovou linii MCF-7.

Kromě mikroRNA jsme vyvinuli elektrochemický test pro stanovení dlouhé nekódující RNA s názvem PCA3 (prostate cancer antigen 3), jejíž hladina je zvýšená u naprosté většiny mužů s rakovinou prostaty<sup>36</sup>. Jedná se o biomarker s vyšší specificitou pro nádory prostaty než v případě rutinně stanovovaného PSA (prostatický specifický antigen). Hladina PCA3 byla ve více než 90 % studovaných případů asi 60–100× vyšší než ve zdravé prostatické tkáni<sup>37</sup> a zároveň nedetegovatelná v jiných nádorech<sup>38</sup>. Námí vyvinutý test využíval RT-LAMP reakci pro amplifikaci PCA3 molekul, magnetické kuličky pro zachycení LAMP produktů a námí optimalizované amperometrické detekční schéma (obr. 2)<sup>11</sup>. Kromě prostatických nádorových linií jsme stanovovali PCA3 přímo v moči pacientů s nádorem prostaty (PCa,  $n = 11$ ) a u pacientů s benigním nálezem (Ctrl,  $n = 7$ ), a naše výsledky dobře korelovaly s klinickými daty z onkourologie.

Elektrochemická analýza obou typů nukleových kyselin, tj. DNA a RNA, funguje na velmi podobném principu, ale každá z nich má i svá specifika, která je třeba při vývoji nové metody znát. DNA je mnohem stabilnější, a zejména kratší sekvence DNA (např. PCR aplikony) jsou nenáročné, co se týče manipulace nebo skladování. U dlouhé genomové DNA je potřeba dbát na správné skladování, aby se předešlo její degradaci. Díky dvoušroubovicové struktuře je často nutné vzorek DNA zahřát, aby došlo k rozvolnění (denaturaci) a tím pádem k snadnější hybridizaci s DNA sondami. RNA je mnohem reaktivnější než DNA vzhledem k přítomnosti hydroxylové skupiny na 2'-uhlíku ribosy, a snadno podléhá hydrolytickému štěpení všudypřítomnými RNasami. Neopatrné zacházení proto může vést k nereprodukovatelným výsledkům. RNA tak musí být zpracovávána se zvýšenou opatrností, aby nedošlo k degradaci vzorku. Pro účely amplifikačních reakcí je RNA často přepisována do DNA a dále se oba typy vzorků zpracovávají stejným způsobem. Krátké nekódující mikroRNA jsou v tomto směru výjimkou, jsou relativně stabilní a příliš se nevyužívá jejich přepisu do komplementární sekvence DNA.

Nádorové biomarkery mající diagnostický, prediktivní, či prognostický význam, jsou slibnými cíli pro vývoj detekčních metod, jako jsou nejrůznější typy sekvenování, metody založené na hybridizaci nukleové kyseliny k sondě, či dříve používané metody štěpení nukleových kyselin na specifické fragmenty. V současné době běžně



Obr. 2. **Detekce prostatických nádorových RNA biomarkerů z moči.** **A:** Z moči odebrané po digitální rektální examinaci (DRE) byla izolovaná RNA, která byla ošetřena DNasou a po denuraci byla přidána do LAMP reakce. **B:** Výsledné LAMP amplikony obsahující digoxigeninem značené dUTP (DIG-dUTP) byly hybridizovány na povrch streptavidinových magnetických kuliček (STR-MB) modifikovaných biotinylovanou sondou (bio-CP). Následně došlo k označení peroxidasou konjugovanou s protilátkou proti digoxigeninu (antiDIG-HRP). **C:** Výsledky amperometrických měření (HRP/hydrochinon/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pro oba RNA biomarkery PSA i PCA3 s rozdělením pacientů s časným záchytem nádorového onemocnění (PCa) a benigním onemocněním (Ctrl). K jednoznačné korelaci naměřených výsledků s klinickými daty došlo po kalkulaci poměrů PCA3/PSA (neukázáno). Upraveno z cit.<sup>11</sup> se svolením nakladatelství Elsevier.

používaným metodám detekce nukleových kyselin vládne PCR, i ta má však své nevýhody, a proto je smysluplné se zabývat vývojem možných alternativních diagnostických metod k tomuto zlatému standardu. Nadějným metodickým přístupem v této oblasti jsou IAT následované elektrochemickou detekcí nukleových kyselin, které by mohly nabídnout levnější a rychlejší diagnostiku nádorových biomarkerů.

### 3. Výzvy klinického materiálu

Velká část odborných prací zabývajících se vývojem elektrochemických biosenzorů demonstruje funkčnost

svých postupů pouze na modelovém systému, tj. detekcí syntetických oligonukleotidů, bakteriálních plasmidů nesoucích cílovou sekvenci, nebo komerčně zakoupených purifikovaných proteinů. Často zde lze nalézt i tzv. „spiking“, tedy smíchání cílové molekuly o přesně dané koncentraci s lidskou plasmou, lidským/zvířecím sérem, močí, aj. pro demonstraci použitelnosti v komplexním vzorku. Bohužel, tento model vytváří pouze slabé pozadí a nereflktuje reálnou koncentraci analytu, která je často řádově nižší, a tudíž se signál analyzované molekuly může zcela ztratit. Stále častěji se objevují práce, které využívají buněčné kultury, kde např. pro detekci bodové mutace se jedná o velmi homogenní vzorek s přesně definovaným složením. Z hlediska výskytu mutace se může jednat pou-

ze o homozygotní (100%), nebo heterozygotní (50%) výskyt mutace v celkovém genomu buněčné linie. Takovýto model ovšem nemůže zcela nahradit heterogenní vzorek nádorové tkáně, kde se často mohou nacházet i buňky nenádorové, čímž se ještě více sníží zastoupení stanovovaného analytu<sup>11,20</sup>.

Zvolení správného postupu úpravy vzorků značně napomáhá úspěšné aplikaci biosenzoru. Před samotnou izolací biomarkeru je potřeba biologický materiál homogenizovat, a následně dochází k izolaci frakcí (DNA/RNA/proteiny) nebo konkrétních skupin molekul (miRNA, cfDNA, aj.). Tento krok často hraje klíčovou roli a správně zvolený protokol izolace má velký význam pro finální detekci. Pokud např. zvolíme kolonkovou sadu pro izolaci RNA s cílem detekce miRNA, může se stát, že nám cílová frakce RNA proteče, protože velikost miRNA (21–23 bp) není v zachytovém rozpětí kolonky. Takto připravený vzorek může být mylně vyhodnocen jako negativní. Takovéto omyly mohou být odhaleny stanovením kontrolního biomarkeru – molekuly ze stejné skupiny (např. mRNA, proteiny), která se ve vzorku nachází v hojném zastoupení, a vždy bychom měli být schopni ji detegovat. Z tohoto důvodu je dobré při vývoji metody vždy myslet na kontrolní analyt a pokud možno demonstrovat metody na panelu biomarkerů, které se stanovují i v klinických laboratořích<sup>4</sup>.

Další možnou úpravou metody může být zakoncentrování analytu. V tomto kroku dochází k dočasné imobilizaci na pevný nosič, často v podobě silikátové kolonky nebo magnetických částic. Oba tyto formáty umožňují rovněž promytí imobilizovaného analytu a jeho následnou eluci do menšího objemu. Může tak dojít k redukci objemu vzorků z mililitrů na mikrolitry a současněmu zvýšení koncentrace analytu. K imobilizaci se často využívají protilátky, které dokáží rozeznávat i strukturní motivy, např. 5-methylcytosin pro zachycení methylované DNA, nebo oligonukleotidy, nejčastěji poly-deoxythymín (poly-dT) pro vycytání mRNA nesoucí polyadenylovaný konec – dochází k hybridizaci celé frakce RNA bez ohledu na sekvenční.

Využití reálných vzorků, a to i v menším počtu, otevírá další nedostatečně zpracovanou, často až opomíjenou část publikací – statistiku. U kvalitních prací se setkáváme s reprodukovatelností, statistickými odchylkami, a dalšími statistickými parametry, avšak bez více rozmanitých vzorků nelze stanovit hodnoty jako specifitu, či senzitivitu vyvinutého testu. Tyto chybějící informace způsobené často právě absencí klinického materiálu snižují aplikační potenciál elektrochemických stanovení.

Použití a aplikace klinického materiálu ve vývoji biosenzorů může být náročné a často může výzkum značně zkomplikovat, avšak prokázání funkčnosti metodik na opravdu reálných vzorcích napomáhá k cestě translačního výzkumu. Ne všechna výzkumná pracoviště mají tyto možnosti, a proto jsou velmi často odkázána na různé formy spolupráce, pro které příprava reálných vzorků nemusí být prioritou. Alternativou mohou být banky biologického materiálu, které dokáží poskytnout nejen expertní služby,

klinický materiál, ale i potřebná data přesně dle požadavků výzkumného záměru.

#### 4. Síť českých biobank – BBMRI.cz

Existuje stále větší snaha o zavádění aktuálních vědeckých poznatků do klinické praxe, realizace ovšem nebývá vždy rychlá a překážky v získávání klinických vzorků se na tomto zpoždění jednoznačně podílí.

Právě pro posílení translačního výzkumu, vývoje nových detekčních metod, personalizované medicíny a zejména zvýšení dostupnosti klinického materiálu vznikla velká výzkumná infrastruktura (VVI) zaměřená na dlouhodobé skladování biologického materiálu a dat neboli biobanking, známá pod názvem Síť českých biobank (BBMRI.cz<sup>39</sup>), kam v současnosti spadá 8 českých výzkumných institucí (Masarykova univerzita; Univerzita Karlova a její lékařské fakulty v Praze, Hradci Králové a Plzni; Revmatologický ústav; Ústav hematologie a krevní transfúze, Univerzita Palackého a Masarykův onkologický ústav, který tuto národní síť koordinuje). Zároveň je tato česká síť biobank součástí evropského konsorcia BBMRI-ERIC (aktuálně zastupuje 23 států). V rámci tohoto konsorcia vznikla i řada online nástrojů a jedním z nich je největší katalog vzorků na světě<sup>40</sup>, v němž si lze přehledně zobrazit participující biobanky a zjistit jaké vzorky/diagnózy/materiály jsou k dispozici. Pomocí online komunikačního nástroje Negotiator<sup>41</sup> je možno si poměrně jednoduše a obratně domluvit rezervaci materiálu s příslušnými biobankami. Vzorky/data si lze v katalogu Directory podle potřeby vytrždit (dle materiálu, diagnózy, regionu, věku, biobanky, apod.) a následně poslat souhrnný požadavek do komunikačního nástroje Negotiator (zde je nutná registrace). V tomto nástroji se vyplní náležitosti konkrétní žádosti (popis projektu, řešitel, délka trvání, specifikace vzorků – počty a typ, souhlas etické komise, atp.) a poté je žádost rozeslána vybraným biobankám, které se vyjádří k množství a dostupnosti požadovaných vzorků. Tento systém zpřehledňuje a zjednodušuje hromadnou komunikaci mezi žadatelem a biobankou.

Mezi další zajímavé a dostupné služby poskytované touto velkou infrastrukturou vědcům i firmám patří kromě klinických vzorků a dat také možnost prospektivního sběru či doplnění informací/vzorků pro navazující projekty.

Je důležité si uvědomit, že právě kvalita testovaného materiálu je klíčová pro opakovatelnost, důvěryhodnost a robustnost výsledků výzkumu. Klinické vzorky dlouhodobě skladované v biobankách jsou zpracovávány standardizovanými postupy a certifikovanými metodami odborně proškoleným personálem, tak aby byla zachována excellentní kvalita materiálu.

#### 5. Závěr

Vývoj alternativních metod pro detekci nádorových biomarkerů, nejen na úrovni nukleových kyselin, se dostává v posledních letech do popředí, a to i díky nedávné

pandemii SARS-CoV-2. Se skokovým nárůstem potřebných vyšetření se ukázalo, že zlatý standard PCR nemusí být vždy dostatečný a je zapotřebí rychlejších a efektivnějších metod, které by bylo možno použít i na méně vybavených pracovištích. Tento celosvětový impuls snad napomůže rychlejšímu vývoji biosenzorů a v budoucnu lepší dostupnosti levných diagnostických testů na základě kombinace IAT s elektrochemií. Pro správný vývoj a posun biosenzorů k translačnímu výzkumu je nezbytné zapojení i reálných vzorků, které nemusí být vždy k dispozici přímo v dané výzkumné instituci. Zdrojem cenného a potřebného klinického materiálu mohou být i biobanky, které skladují vzorky různých materiálů a diagnóz ve vysoké kvalitě včetně asociovaných dat.

Posun vývoje biosenzorů může v budoucnu přispět k zlepšení diagnostiky jak nádorových onemocnění, tak v rámci preventivních programů a tím i lepší zdravotní péči.

*Tato práce byla podpořena MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805), MŠMT LM2023033, NÚVR (EXCELES, LX22NPO5102), a AZV ČR (NU21-08-00078, NU21-08-00057, NU23J-08-00006).*

#### Seznam zkratk

BCR-ABL1	breakpoint cluster region-abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma
DIG	digoxigenin
FISH	fluorescence in situ hybridization
hCMV	lidský cytomegalovirus
HPV	lidský papilomavirus
HRP	horse radish peroxidase
IAT	izotermální amplifikační technika
KRAS	K-rat sarcoma virus
LAMP	loop-mediated isothermal amplification
PCR	polymerase chain reaction
NGS	next generation sequencing
RCA	rolling-circle amplification
RPA	recombinase polymerase amplification

#### LITERATURA

- Calzone K. A.: *Semin. Oncol. Nurs.* 28, 122 (2012).
- Aghabozorgi A. S., Bahreyni A., Soleimani A., Bahrami A., Khazaei M., Ferns G. A., Avan A., Hassani S. M.: *Biochimie* 157, 64 (2019).
- Bartosik M., Jirakova L.: *Klin. Onkol.* 31, 93 (2018).
- Bartosik M., Jirakova L.: *Curr. Opin. Electrochem.* 14, 96 (2019).
- Bartosik M., Hrstka R., Jirakova L.: *Klin. Onkol.* 31, 89 (2018).
- Moranova L., Bartosik M.: *Klin. Onkol.* 32, 65 (2019).
- Aliofkhazraei M., Ali N., v knize: *Comprehensive Materials Processing* (Saleem Hashmi, Gilmar Ferreira Batalha, Chester J. Van Tyne, Bekir Yilbas, ed.), str. 245. Elsevier, Oxford 2014.
- Bodulev O. L., Sakharov I. Y.: *Biochemistry* 85, 147 (2020).
- Deng H., Gao Z.: *Anal. Chim. Acta* 853, 30 (2015).
- Bartosik M., Jirakova L., Anton M., Vojtesek B., Hrstka R.: *Anal. Chim. Acta* 1042, 37 (2018).
- Moranova L., Stanik M., Hrstka R., Campuzano S., Bartosik M.: *Talanta* 238, 123064 (2022).
- Anton M., Moranova L., Hrstka R., Bartosik M.: *Anal. Methods* 12, 822 (2020).
- Izadi N., Sebuyoya R., Moranova L., Hrstka R., Anton M., Bartosik M.: *Anal. Chim. Acta* 1187, 339145 (2021).
- Sebuyoya R., Moranova L., Izadi N., Hrstka R., Moran L., Anton M., Bartosik M.: *Biosens. Bioelectron.* X 12, 100224 (2022).
- Lobato I. M., O'Sullivan C. K.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 98, 19 (2018).
- Xu L. L., Duan J. X., Chen J. M., Ding S. J., Cheng W.: *Anal. Chim. Acta* 1148, 238187 (2021).
- Sarhadi V. K., Armengol G.: *Biomolecules* 1, 1021 (2022).
- Ondraskova K., Sebuyoya R., Moranova L., Holcakova J., Vonka P., Hrstka R., Bartosik M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 415, 1065 (2023).
- Dankner M., Rose A. A. N., Rajkumar S., Siegel P. M., Watson I. R.: *Oncogene* 37, 3183 (2018).
- Sebuyoya R., Valverde A., Moranova L., Strmiskova J., Hrstka R., Montiel V., Pingarron J. M., Barderas R., Campuzano S., Bartosik M.: *Sens. Actuators, B* 394, 134375 (2023).
- Cortés-Ciriano I. a 279 spoluautorů: *Nat. Genet.* 52, 331 (2020).
- Müller D., Györfy B.: *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1877, 188722 (2022).
- Martisoava A., Holcakova J., Izadi N., Sebuyoya R., Hrstka R., Bartosik M.: *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4247 (2021).
- Mihelson N., McGavern D. B.: *Viruses* 13, 1264 (2021).
- Bartosik M., Durikova H., Vojtesek B., Anton M., Jandakova E., Hrstka R.: *Biosens. Bioelectron.* 83, 300 (2016).
- Manavi M., Hudelist G., Fink-Retter A., Gschwantler-Kaulich D., Pischinger K., Czerwenka K.: *Int. J. Gynecol. Cancer* 18, 285 (2008).
- Collins S. I., Constandinou-Williams C., Wen K., Young L. S., Roberts S., Murray P. G., Woodman C. B.: *Cancer Res.* 69, 3828 (2009).
- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V.: *Cell* 75, 843 (1993).
- He B. X. a 10 spoluautorů: *Int. J. Biol. Sci.* 16, 2628 (2020).
- Mo M. H., Chen L., Fu Y. B., Wang W., Fu S. W.: *J. Cancer* 3, 432 (2012).
- Romano G., Acunzo M., Nana-Sinkam P.: *Cancers* 13, 1526 (2021).



32. Shah M. Y., Calin G. A.: *WIREs RNA* 5, 537 (2014).
33. Bartosik M., Hrstka R.: *Rev. Anal. Chem.* 36, 20160022 (2017).
34. Jirakova L., Hrstka R., Campuzano S., Pingarron J. M., Bartosik M.: *Electroanalysis* 31, 293 (2019).
35. Povedano E. a 10 spoluautorů: *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 5031 (2020).
36. Wright C. M., v knize: *Epigenetic Cancer Therapy* (Steven G. Gray, ed.), str. 91. Academic Press, Boston 2015.
37. de Kok J. B., Verhaegh G. W., Roelofs R. W., Hessels D., Kiemeny L. A., Aalders T. W., Swinkels D. W., Schalken J. A.: *Cancer Res.* 62, 2695 (2002).
38. Bussemakers M. J., van Bokhoven A., Verhaegh G. W., Smit F. P., Karthaus H. F., Schalken J. A., Debruyne F. M., Ru N., Isaacs W. B.: *Cancer Res.* 59, 5975 (1999).
39. <https://www.bbmri.cz>, staženo 15. 6. 2023.
40. <https://directory.bbmri-eric.eu>, staženo 15. 6. 2023.
41. <https://negotiator.bbmri-eric.eu/>, staženo 15. 6. 2023.

**L. Moráňová<sup>a</sup>, M. Bartošik<sup>a</sup>, J. Strmisková<sup>a</sup>, and K. Nováková<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*RECAMO, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno*, <sup>b</sup>*BBM, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic*): **Electrochemical Analysis of Clinical Samples – a Path to Translational Research**

Precise diagnostics of cancer or other diseases is crucial when selecting proper treatment. Personalized medicine puts high demands on the accuracy of nucleic acid biomarkers analysis, where subtle differences at the nucleotide level are often involved. Isothermal amplification techniques offer new possibilities of DNA and RNA amplification without using PCR, and their combination with electrochemistry provide a promising fast and cost-effective alternative diagnostic tool. Although electrochemical biosensors are still insufficiently applied to clinical material, thus hindering their development, recent advancements show great promise in translational research. Banks of biological material (biobanks) are specialized workplaces focused on the long-term preservation and processing of clinical material and offer a wide range of expert services, primarily for research purposes, in particular the provision of biological samples and associated pseudonymized data. Their involvement in the field of electrochemical biosensors can facilitate application of electrochemical methods into clinical laboratories and expand the portfolio of currently used diagnostic methods.

**Keywords:** biosensor, isothermal amplification techniques, electrochemistry, biomarker, biobank

*Acknowledgment*

*This work was supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (MMCI,00209805), the project BBMRI.cz no. LM2023033, National Institute for Cancer Research (EXCELES, LX22NPO5102) and grants AZV ČR (NU21-08-00078, NU21-08-00057, NU23J-08-00006).*



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.