

Komparativní analýza fenotypu nádorových buněk v moči a výplachu močového měchýře odebraných v průběhu TURB

Otavová K. ¹, Koladiya A. ², Zachoval R. ^{1, 3, 4}, Matěj R. ^{3, 4, 5}, Ogan B. ², Drbal K. ²



¹ Thomayerova nemocnice, Oddělení urologie, Praha 4, Česká republika
² Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie, Praha 2, Česká republika
³ Univerzita Karlova, 1. Lékařská fakulta, Praha 2, Česká republika
⁴ Univerzita Karlova, 3. Lékařská fakulta, Praha 10, Česká republika
⁵ Thomayerova nemocnice, Oddělení patologie a molekulární medicíny, Praha 4, Česká republika



Úvod

Mezi nově diagnostikovanými pacienty s karcinomem močového měchýře (BCa) je 75% pacientů zachyceno ve stadiu pTa nebo pT1 (NMIBC). Z nich bude v průběhu pěti let až 80% vysoce rizikových pacientů recidivovat a až 45% progredovat do invazivního stadia infiltrujícího svalovou vrstvu měchýře (MIBC). V diagnostice dnes chybí neinvazivní vyšetření, které by časně odhalilo tyto pacienty s vysokým rizikem progresu. Cytologické vyšetření moči není vzato v úvahu jako prediktor rizika.

V naší studii využíváme kombinaci cytologického vyšetření v kombinaci s multiparametrickou průtokovou cytometrií (FCM) k vyšetření tělních tekutin získaných od pacientů – moč, výplach močového měchýře při cystoskopii a transuretrální resekci tumoru močového měchýře (TURB).

Metody

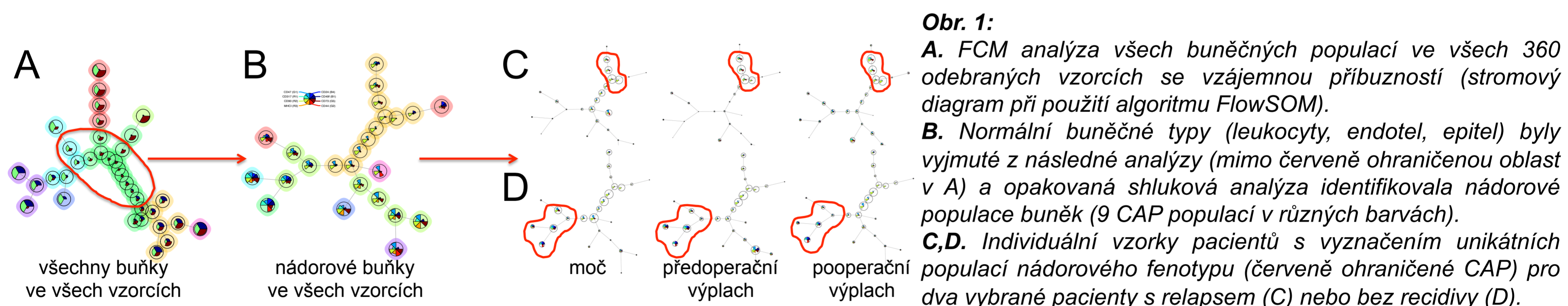
Z FCM dat jsme v moči a výplachu od 90 pacientů v průběhu 18 měsíců identifikovali specifické buněčné populace nádorových buněk na základě jejich povrchového fenotypu (tzv. CAP) a pomocí automatické hierarchické shlukové analýzy algoritmy FlowSOM a tSNE. Přítomnost a početnost CAP jsme následně statisticky vyhodnotili vzhledem k riziku recidivy a progresu onemocnění.

Výsledky

Naše studie odhalila vysoký počet jaderných buněk v analyzovaných tělních tekutinách (Tab.1), která byla u všech testovaných vzorků vyšší než 10 000 buněk, vyjma tří vzorků. To je mezní hodnota, kterou jsme si stanovili jako minimální pro další experimentální analýzu detailního fenotypu přítomných nádorových buněk.

Počet buněk ve vzorcích:	Moč	Předoperační výplach	Peroperační výplach	Pooperační výplach
Průměr jaderných buněk / mL	3 935	15 195	9 362	4 871
Minimum jaderných buněk / vzorek	354	14 987	12 897	9 211
Maximum jaderných buněk / vzorek	6 026 545	32 603 721	31 789 563	14 764 094

Tab. 1: Počty buněk odebraných vzorků, které byly následně analyzované pomocí FCM.



Právě přítomnost specifických populací nádorových buněk s diferenciální expresí kmenových znaků (CD90, CD44, CD49f, CD24, CD73) nebo znaků vlastních tkání (CD47, MHC-I) a dalších povrchových receptorů, například znaků zánětu a angiogeneze (Obr. 1), jsme korelovali s klinickým průběhem onemocnění a cytologickými nálezy v moči u pacientů s recidivujícím NMIBC, ale nikoli u nerecidivujících pacientů. Stanovili jsme statistickou významnost síly predikce přítomnosti definovaných CAP populací vzhledem k času do recidivy, případně progresu, spolu s klasickou histopatologií vzorku (TNM a variantní histologie) získaného z TURB, které v důsledku krátkého intervalu sledování nebyly signifikantní.

Závěr

Buněčné populace nádorových buněk, které identifikujeme FCM analýzou v moči a výplachu močového měchýře, jsou testovatelnými biomarkery rizika recidivy a mohou vylepšit stávající stratifikaci pacientů s NMIBC. Nicméně výsledky naší studie musí být validované v delší časovém úseku. Během 18 měsíců, kdy studie probíhala, ještě nelze stanovit statisticky významné riziko progresu, protože během 2 let progreduje jen méně než 5% NMIBC pacientů do stadia MIBC. Proto plánujeme další pokračování této prospektivní studie a její rozšíření na více jak 300 NMIBC pacientů ve dvou centrech v České republice.