

Petr Klézl¹*, Eliška Pospíšilová²*, Jindřich Šonský¹, Robert Grill¹, Katarína Kološtová², Vladimír Bobek^{2,3}

* Autoři se dělí o autorství

¹ Urologická klinika, 3. LF Univerzity Karlovy Praha a FN Královské Vinohrady, Praha

² Oddělení laboratorní genetiky, Centrální Laboratoře, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

³ III. Chirurgická klinika, 1. LF Univerzity Karlovy Praha FN Motol, Praha

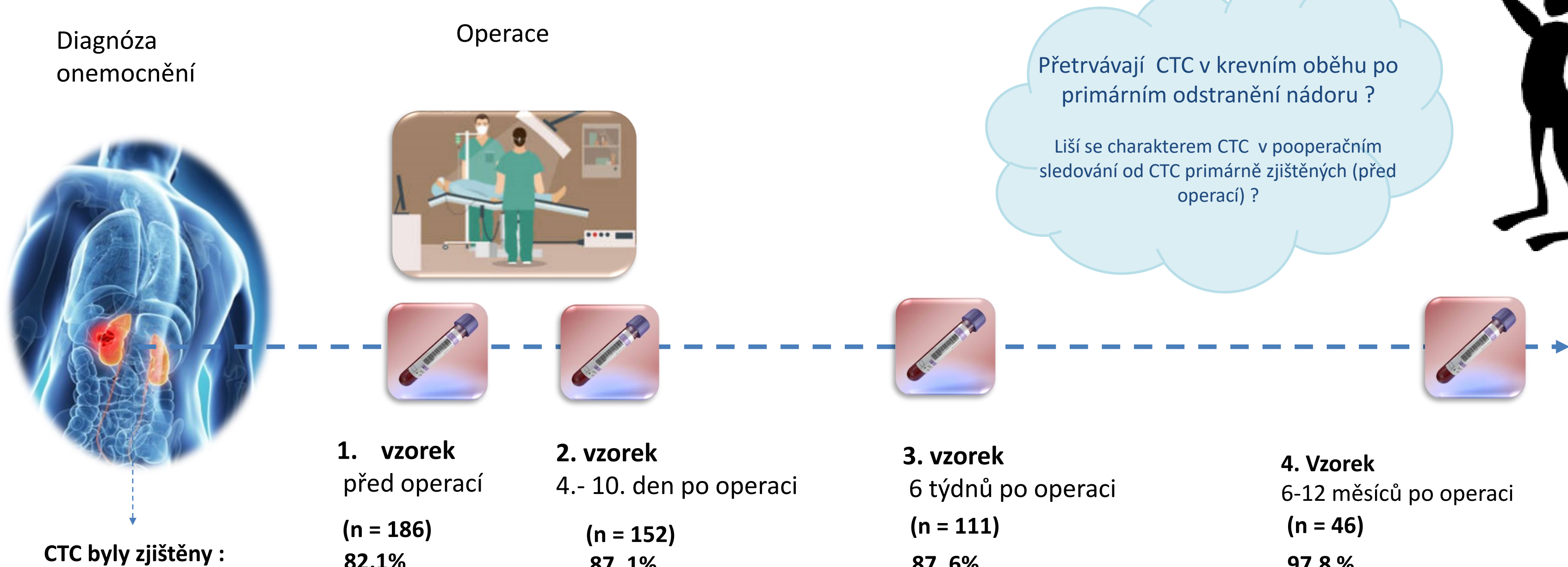
Úvod a cíle

Cirkulující nádorové buňky (CTC) představují spojení mezi primárním nádorem a sekundárními ložisky. Vyšetření CTC patří mezi do skupiny tzv. **LIQUID BIOPSY** testů, které jsou schopné poskytnout detailnější informace o heterogenitě nádorového onemocnění při minimálně invazivním vyšetření, kterým je odběr krve.

Nádory se vyvíjejí a CTC představují možný nástroj při sledování těchto změn v čase. Tak jak je definováno **tekutou dynamickou medicínou** [1], kde pacient je sám sobě kontrolou během léčby můžeme sledovat změny v chování nádorových buněk a předpokládáme možnost personalizace onkologické léčby.

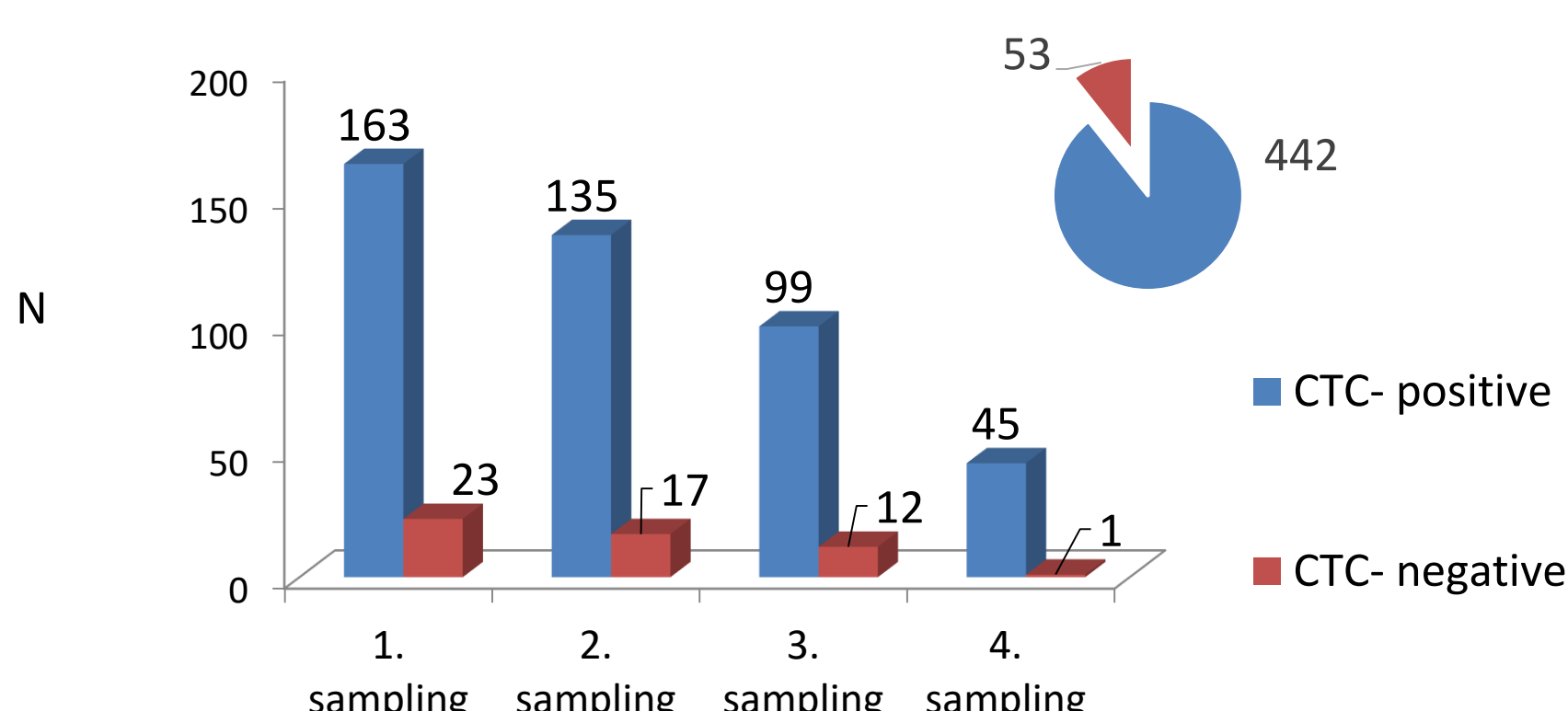
Naše studie byla založena na sledování přítomnosti cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinomem ledviny (světlobuněčný renální karcinom - ccRCC, papilární renální karcinom pRCC) podstupujících operační řešení. Dále byla vyšetřena molekulární charakteristika obohacených buněk pomocí genové exprese.

DESIGN STUDIE – detekce CTC z odběrů periferní krve



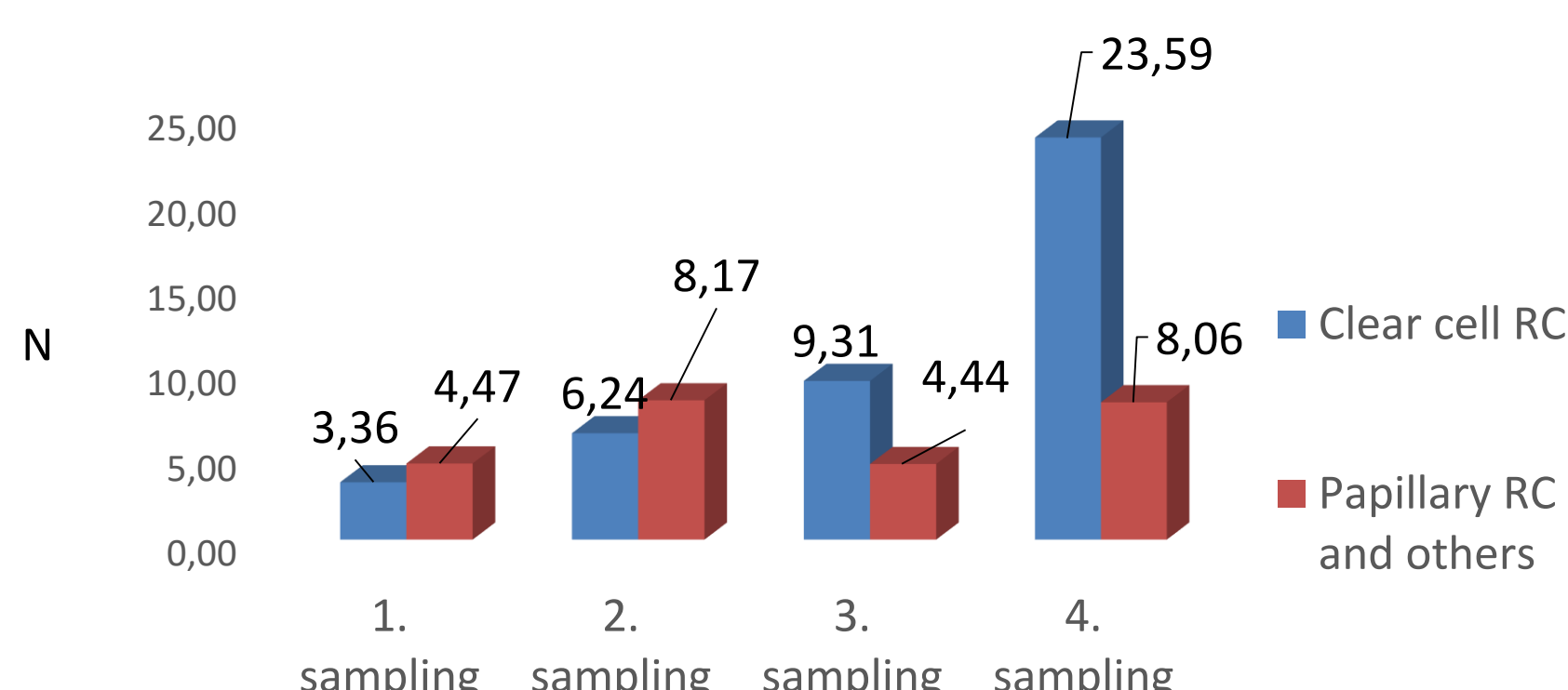
Obr. 1 CTC buňky detekované u pacientů s renálním karcinomem v průběhu jedno ročního sledování 4 vzorky krve. Celkem bylo vyšetřeno 495 vzorků s průměrnou pozitivitou CTC 86,6%.

CTC - pozitivní a negativní vzorky u sledovaných RCC (n = 495)



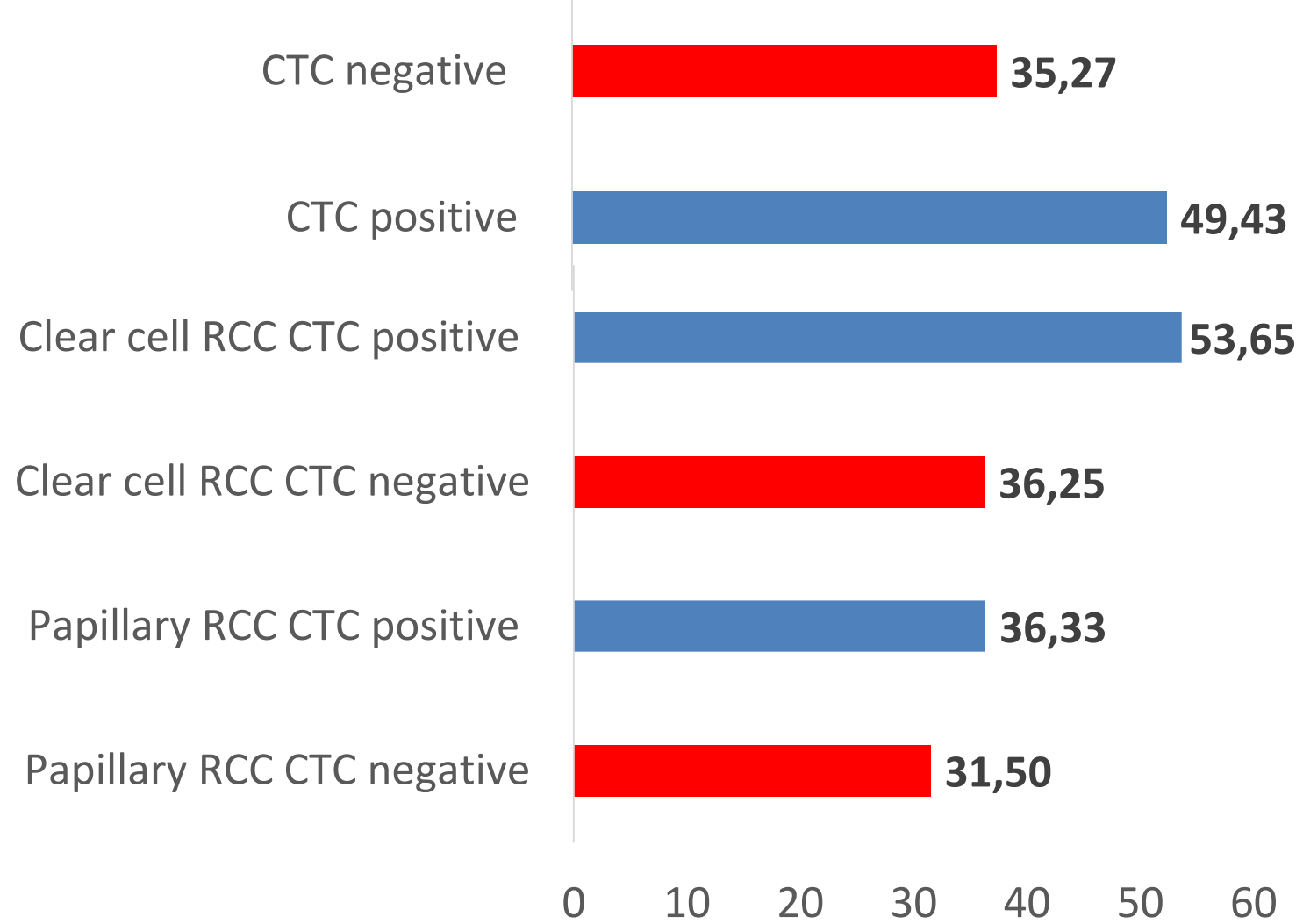
Obr. 2 Počet CTC – (průměr na 1 ml krve) detekovaných u pacientů s karcinomem ledviny v průběhu jedno ročního sledování 4 vzorky krve ukazující rozdíly v množství CTC podle jednotlivých histologických typů.

Průměr počtu CTC na 1 ml krve jednotlivých typů RCC



Obr. 3 Vztah velikosti nádoru a positivity CTC. Celkově bylo u větších nádorů zjištěno více CTC buněk.

Průměrná velikost primárního nádoru, průměr v mm a přítomnost CTC u jednotlivých typů nádorů



Materiál a metody I.

Do souboru bylo zařazeno 186 pacientů (n=186), kteří podstoupili operační řešení pro nádor ledviny v období (2016-2018). Hlavním cílem bylo posoudit míru nádorové diseminace testováním přítomnosti CTC buněk v periferní krvi.

Odběr periferní krve (2 x 8ml, EDTA) v několika časových bodech (viz DESIGN STUDIE), ideálně hodnocení alespoň 3 krevních odběrů. Celkem hodnoceno 495 krevních odběrů (zdvojeně).

K obohacení CTC byl použit protokol obohacení na základě velikosti (size-based separace) pomocí **MetaCell**® [2]. Přítomnost CTC byla hodnocena CYTOMOFOLOGICKY, následovaná molekulární analýzou (qPCR analýza).

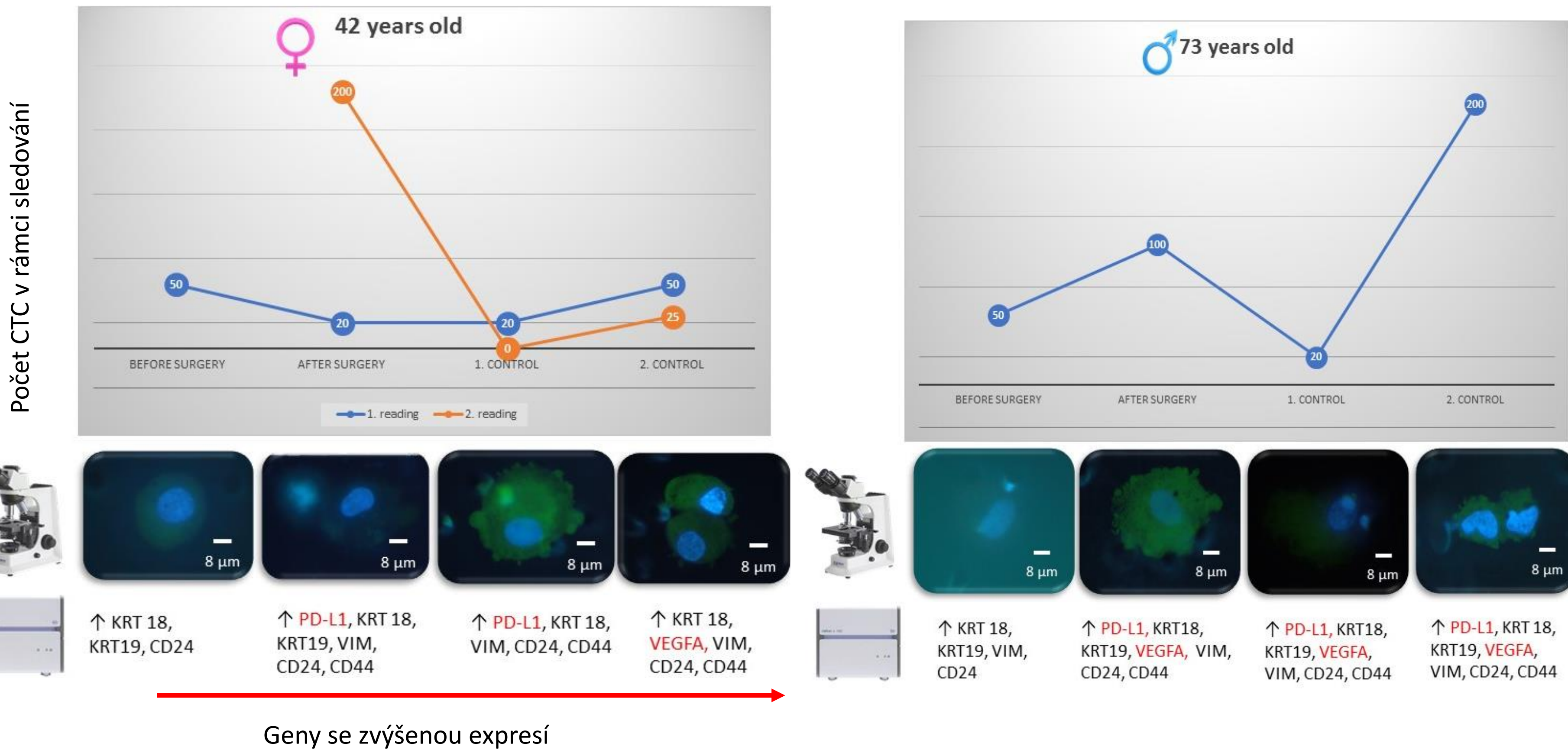
Materiál a metody II. - Dvou stuňová analýza CTC buněk

1. **Cytomorfologické hodnocení** CTC obohacených pomocí by size-based separací na separační membráně po krátké *in vitro* kultivaci.

CTC buňky jsou barveny fluorescenčními barvivy (NucBlue™, Celltracker™) (Obr. 4) a poté jsou mikroskopicky hodnoceny následující parametry: velikost buněk, velikost jader, tvar jader, konzistence chromatinu, přítomnost jadérek, buněčná proliferace a invaze separační membránou.

2. **Molekulární analýza – byla provedena analýza následujících genů qPCR:** ACTB, EPCAM, MUC1, KRT6, KRT7, KRT18, KRT19, VIM, CD24, CD44, CD68, CD45, PD-L1(CD274), VEGF, VEGFR (FLT1), HER2.

Obr. 4 Sledování CTC v průběhu periody jednoho roku. Demonstrujeme změny v průběhu 4 odběrů nejen v počtu buněk, ale i v cytomorfológii a navíc v genové expresi (viz elevované geny u CTC pod grafem). Některé z genů se zvýšenou expresí mohou být použity jako markery indikující specifický typ cílené léčby (např. VEGF, PD-L1). Expres PD-L1 a VEGF jsou zvýrazněny červeně.



Výsledky a závěry

- CTC byly detekovány nezávisle na odběrovém schématu až u 86,7% testovaných vzorků krve u pacientů podstupujících operaci (obr.1.)
- CTC byly detekovány u pacientů s nádory různých typů. Průměrný počet CTC byl lehce vyšší v případě karcinomu ze světlých buněk – ccRCC při srovnání s papilárním renálním renálním karcinomem –pRCC (obr.2).
- Cytomorfologická analýza CTC se skládala z dvojího mikroskopického čtení v různých časových bodech (3. a 5. den po obohacení *in vitro*), prováděného 2 nezávislými vyšetřujícími. Průměrný počet **CTC se zdvojnásobil mezi dnem 3 a 5**, což odpovídá předpokladu rychlosti růstu buněk (1. čtení = 4.18 buněk, 2.čtení = 7.93 buněk)
- Existuje vyšší pravděpodobnost detekce CTC v závislosti na velikosti nádoru ledviny (viz Obr. 3.), zvláště v případě světlobuněčných nádorů. Podobně koreponduje počet CTC s přítomností metastáz či lymfadenopatie.
- Analýza genové exprese objevila zvýšenou expresi genů **KRT18** (keratin 18), **VIM** (vimentin) při srovnání s frakcí bílých krvinek.
- Dále bylo zjištěno, že **charakter CTC se v průběhu sledování mění** (viz Obr. 4). Z léčebného hlediska jsou nejzajímavější změny u zvýšenou expresí VEGF (vascular endothelial growth factor) a/ nebo PD-L1 (Programmed Death ligand 1, CD274) u netypických změn. VEGF a PD- L1 se zvýšenou expresí (Obr 4 legenda pod grafem).
- Oba geny mohou být využity pro indikaci léčby: **VEGF biologickou léčbu a PD-L1 pro imunoterapii.**

1. Silvestris N, Ciliberto G, De Paoli P, Apolone G, Lavitrano ML, Pierotti MA, Stanta G; On the behalf of the "dynamic medicine OECl group". **Liquid dynamic medicine and N-of-1 clinical trials: a change of perspective in oncology research** J Exp Clin Cancer Res. 2017 Sep 13;36(1):128. doi: 10.1186/s13046-017-0598-x. Review.

2. Bobek V, Kolostova K. **Isolation and Characterization of CTCs from Patients with Cancer of a Urothelial Origin**. Methods Mol Biol. 2018;1655:275-286. doi: 10.1007/978-1-4939-7234-0_20.