

Abstrakt

Kolorektální karcinom (CRC) je celosvětově třetím nejčastějším nádorovým onemocněním – je odpovědný za téměř 10 % všech nově diagnostikovaných nádorů a je druhou nejčastější příčinou úmrtí spojeného s nádory v Evropě. Paleta biomarkerů použitelných pro výběr vhodné terapie, cílené léčby a pro prognózu přežívání je stále omezená. Vzhledem k tomu, že CRC je heterogenní onemocnění, různé části nádoru mohou mít odlišné molekulární charakteristiky, které se mohou měnit během léčby nebo progresu onemocnění. Tyto místní nebo časové rozdíly není možné efektivně monitorovat prostřednictvím klasické biopsie. Pro umožnění detekce nádorové evoluce je potřebný neinvazivní a opakovaně dostupný biomarker. Tento biomarker mohou představovat cirkulující nádorové buňky (CTC), jelikož reprezentují solidní nádor v krevním řečišti. Bylo prokázáno, že EpCAM pozitivní CTC mají prognostický efekt u pacientů s CRC, ale jejich plný potenciál nebyl dosud prozkoumán. S využitím metody HD-SCA jsme mohli analyzovat celé spektrum CTC a klasifikovat je jako běžné CTC (HD-CTC), CTC s menším jádrem (CTC-Small), CTC s nízkou expresí epiteliálního znaku cytokeratinu (CTC-LowCK) a CTC podstupující apoptózu a tedy uvolňující DNA (CTC-cfDNA produkující). Navíc jsme detekovali a analyzovali CTC clustery (CTCC). Analýza zahrnovala nejen morfologické charakteristiky a počty jednotlivých kategorií CTC, ale také variabilitu počtu kopií (CNV) na úrovni jednotlivých buněk.

V první části této studie jsme se zaměřili na vyčíslení všech podkategorií CTC a CTCC zjištěných v krvi pacientů s CRC ve stadiu IV před a po chirurgickém odstranění nádorové tkáně. Cílem bylo charakterizovat a definovat podskupinu CTC spojenou s metastázami nebo zkráceným přežíváním. Na rozdíl od předchozích publikací jsme nezaznamenali asociaci HD-CTC s přežitím, ale pozorovali jsme, že přítomnost CTC-Small buněk v pooperačním odběru byla spojena s kratším celkovým přežíváním (OS, $p = 0,040$). Tato zjištění nejsou v souladu s běžnou literaturou. To může být způsobeno detekční metodou, která není založená na identifikaci CTC pomocí EpCAM positivity, či může být tento efekt specifický pro českou patientskou kohortu.

Nicméně počet detekovaných CTCC před chirurgickým zákrokem byl spojen s kratším OS ($p = 0,021$). Přítomnost metastatického rozsevu do vzdálených orgánů v době diagnostiky CRC (M1 vs. M0) byla spojena s vyšším průměrným počtem buněk v CTCC ($p = 0,035$), což naznačuje, že větší CTCC mohou být spojeny s tvorbou metastáz.

V druhé části této studie jsme izolovali a analyzovali jednotlivé HD-CTC z předoperačních náběrů a také jednotlivé buňky z otiskových preparátů nádorových tkání. Po celogenomové amplifikaci jsme využili sekvenování nové generace pro stanovení a porovnání CNV profilů. Cílem bylo studium klonality v rámci CTC (dvě nebo více jednotlivých buněk vykazujících podobné CNV) a rozlišení agresivních CTC od méně invazivních CTC. Dále jsme porovnali CNV profily CTC a buněk pocházejících

z nádorové tkáně, abychom získali poznatky o vývoji nádoru. Po analýze 136 individuálních HD-CTC z 11 pacientů však nebyla klonalita detekována. Ve srovnání s tím analýza jednotlivých buněk z otiskových preparátů odhalila klonalitu u 83,3 % testovaných pacientů. Srovnání CNV mezi buňkami tkáně primárního nádoru a metastatickým ložiskem ukázalo podobné klonální profily s malými dodatečnými změnami v jaterních metastázách.

Závěrem můžeme říci, že se nám podařilo identifikovat a analyzovat čtyři morfologicky odlišné skupiny CTC, což ukazuje jejich vysokou heterogenitu v CRC. Chybějící souvislost počtu HD-CTC s přežitím může být způsobena jednak omezeními danými naší kohortou, ale i také kvůli možné nesprávné identifikaci endoteliálních buněk jako HD-CTC. Tato studie slouží jako předběžná studie pro budoucí projekty zaměřené jak na detekci CTC v ranných stádiích CRC, tak na charakterizaci CTC a buněk v CTCC prostřednictvím multiplexové proteinové analýzy.