

## Abstrakt:

### **Úvod:**

Přes celkově klesající incidenci představuje kolorektální karcinom (CRC) stále jednu z nejčastějších malignit s vysokou úmrtností. Zavedení fluidní biopsie do klinické praxe by zvýšilo množství informací o konkrétní nádorovém onemocnění, které by lékaři mohli využít při léčbě CRC. U jiných typů malignit pozorujeme rostoucí trend ve využívání tekuté biopsie, konkrétně circulating tumor DNA (ctDNA), v různých způsobech praktického využití, ze kterého by v budoucnu mohli profitovat i pacienti s CRC.

### **Metodologie:**

Byly provedeny dvě studie, ve kterých byla k identifikaci a analýze cirkulujících vzácných struktur (cirkulující nádorové buňky a jiné cirkulující nebuněčné struktury) použita platforma HDSCA (High-Definition Single Cell Assay). V prvním šetření byla použita první generace platformy HDSCA sledující tři markery (CK, CD45 a DAPI). Následně byl stanoven počet nalezených podtypů cirkulujících buněk. Byla také provedena analýza dynamiky počtu těchto buněk mezi provedenými odběry. Tyto údaje byly následně korelovány s dostupnými klinickými údaji, včetně přežití pacientů bez progresu (PFS) a celkového přežití (OS). Při druhém šetření byly použity dva protokoly třetí generace platformy HDSCA. Protokol Landscape využíval pro čtvrtý imunofluorescenční (IF) kanál vimentin a CD31, zatímco protokol zaměřený na CDX2 pro čtvrtý kanál využíval CDX2 jako specifický marker pro colon a rektum. I zde byl stanoven počet cirkulujících vzácných struktur a analýza dynamiky počtu těchto struktur mezi odběry. Oproti první studii však byl kladen důraz na identifikaci a popis vzácných podtypů buněk a struktur nalezených díky novým markerům v protokolu.

### **Výsledky:**

Naše první šetření prokázalo určitou korelaci hladin cirkulujících nádorových buněk (CTC) a přežití, která by mohla mít dopad na prognózu a predikci. V časovém bodě jeden měsíc po operaci koreloval vyšší počet CTC-CKtotal/ml s horším OS ( $p = 0,0492$ , HR = 1,02) a vyšší hladina HD-CTCs/ml naznačovala horší PFS ( $p = 0,0468$ , HR = 1,03). Podobná korelace byla zjištěna i pro dynamiku CTC mezi časovými body. Vyšší nárůst hladiny HD-CTC/ml než 49,77 mezi vzorkem před resekcí a vzorkem po resekci byl spojen s horším OS ( $P_{BC} = 0,0270$ ,  $p = 0,8464$ , HR = 0,99). Zvýšení CTC-Apoptotic o více než 12,28 buněk/ml mezi vzorky před a po resekci bylo spojeno se zkrácením PFS pacientů ( $p = 0,0024$ , HR = 1,01).

Druhé šetření dokázalo identifikovat a popsat specifické vzácné buňky a struktury. Nejprve byly pomocí protokolu Landscape kategorizovány dva buněčné podtypy nejen na základě přítomnosti nově přidaných markerů, ale také na základě morfologie. Předpokládáme, že populace buněk s tečkovaným vzorcem exprese CD45/CD31, která je morfologicky rozmanitá, zejména v různých tvarech a poměru jader a plazmy, je populací megakaryocytů.

Kromě toho předpokládáme, že buňky, které vykazují vláknitý signál vimentinu spolu s tečkovaným signálem CD45/31 a vyznačují se také vyšší mírou tvorby shluků, jsou populací cirkulujících endoteliálních buněk.

Další zjištěnou vzácnou strukturou byly onkosomy. Z morfologického hlediska se onkosomy vyskytovaly jak v kontaktu s blízkými jadernými buňkami (48,91 % všech onkosomů), tak jako oddělená vzácná událost (51,09 % všech onkosomů). Po zpracování a centrifugaci byly nalezeny v buněčné frakci periferní krve a z hlediska velikosti mohly být velké jako WBC nebo menší (~10  $\mu\text{m}$ ). Fenotyp onkosomů byl homogenní v celém tvaru s rovnoměrným rozložením IF signálu. Většina onkosomů také exprimovala signál CK.

Zajímavé poznatky přinesla také multi-assay analýza, při které jsme srovnávali preparáty z jednoho vzorku pacienta zpracované dvěma zmíněnými protokoly. Například nezjištěná korelace mezi populací CD45/CD31 z protokolu s barvením Landscape a populací CD45 z protokolu s barvením CDX2 ( $p = 0,645$ ,  $\tau = 0,12$ ) znamená, že důležitým markerem pro odlišení těchto populací buněk je s největší pravděpodobností marker CD31.

#### **Závěr:**

Ukázalo se, že platforma HDSCA v sobě skrývá více informací pro potenciální využití v klinické praxi než jen prostý výčet buněk epiteliálního původu. Cirkulující buňky a struktury obsahují větší množství dat a informací, které lze dále analyzovat a korelovat s klinickými údaji. Pokud se to potvrdí v prospektivní studii s větším souborem a vyváženou a stratifikovanou populací, lze platformu HDSCA (a tedy i tekutou biopsii) využít pro výběr léčby/odpovědi na ni a prognózu u CRC. Také jsme ukázali, že neselekční přístup platformy HDSCA může také zvýšit porozumění nádorové patofyziologii rozšířením seznamu samostatných podtypů buněk, které mohou ovlivňovat maligní procesy.

**Klíčová slova:** tekutá biopsie, cirkulující nádorová buňka, bezbuněčná DNA, cirkulující nádorová DNA, CTC, cfDNA, ctDNA, kolorektální karcinom, CRC, HDSCA,

high-definition single cell assay.

