

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Experimentální medicína



**MUDr. Otakar Čapoun, FEBU**

**Detekce cirkulujících nádorových buněk a jejich klinická aplikace  
u pacientů s biopticky ověřeným karcinomem prostaty**

*Detection of circulating tumour cells and their clinical application in patients with bioptically proven  
prostate cancer*

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. MUDr. Viktor Soukup, Ph.D., FEBU

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 12. října 2018

Otakar Čapoun

Podpis

**Identifikační záznam:**

ČAPOUN, Otakar. *Detekce cirkulujících nádorových buněk a jejich klinická aplikace u pacientů s biopticky ověřeným karcinomem prostaty. [Detection of circulating tumour cells and their clinical application in patients with bioptically proven prostate cancer]*. Praha, 2018; 94s., 5 příloh. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Urologická klinika. Vedoucí práce Soukup, Viktor.

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat za trpělivost, vstřícnost a inspirující odborné vedení svému školiteli doc. MUDr. Viktorovi Soukupovi, Ph.D., FEBU.

Kolegyním z Laboratoře klinické imunologie a alergologie, ÚLBLD VFN a 1.LF UK v Praze, Mgr. Veronice Mikulové, Ph.D. a Ing. Markétě Škereňové, děkuji za provedení laboratorních analýz a obrazovou dokumentaci nádorových buněk a také za odbornou spolupráci na grantovém projektu nezbytném pro dokončení mé disertační práce.

Ing. Stanislavovi Kormundovi za statistické zpracování dat a vlastní statistickou přípravu během mnohaleté spolupráce.

Poděkovat bych chtěl také Mgr. Kataríně Kološtové, Ph.D. z Oddělení nádorové biologie 3. LF UK a FNKV Praha, se kterou jsem mohl konzultovat přípravu a poté i průběh grantového projektu.

Děkuji také prof. MUDr. Tomáši Hanušovi, DrSc. a prof. MUDr. Janu Dvořáčkovi, DrSc., současnému a bývalému přednostovi Urologické kliniky VFN a 1.LF UK v Praze, za dosavadní vedení v mém postgraduálním vzdělávání a možnost zaměřit se speciálně na problematiku onkourologie. Děkuji také za poskytnutí cenných rad a připomínek při přípravě této práce, která vychází z předchozích nebo současných projektů, probíhajících na našem klinickém pracovišti.

Dále poděkování patří primáři MUDr. Liborovi Zámečnickovi, Ph.D., FEBU, FECSM za podporu v mé činnosti a odbornou záštitu mých vlastních projektů.

V neposlední řadě patří velký dík mé manželce za trpělivost a podporu, kterou mi věnovala pro mou vědeckou práci.

## **OBSAH**

<b>ABSTRAKT</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	10
<b>1. KARCINOM PROSTATY</b> .....	12
1.1. Epidemiologie karcinomu prostaty v České republice .....	12
1.2. Etiopatogeneze karcinomu prostaty .....	14
1.3. Diagnostika karcinomu prostaty .....	14
1.4. Stádia a rizikové skupiny karcinomu prostaty .....	15
1.5. Možnosti léčby karcinomu prostaty podle klinických stádií .....	17
1.5.1. Léčba lokalizovaného karcinomu prostaty .....	17
1.5.2. Léčba lokálně pokročilého karcinomu prostaty .....	18
1.5.3. Léčba metastatického karcinomu prostaty .....	18
1.6. Kastrálně rezistentní karcinom prostaty .....	18
1.6.1. Prognóza kastrálně rezistentního karcinomu prostaty .....	19
1.6.2. Prognostické parametry kastrálně rezistentního karcinomu prostaty .....	20
1.6.3 Léčba kastrálně rezistentního karcinomu prostaty .....	21
<b>2. METASTATICKÝ PROCES</b> .....	23
2.1. Historie výzkumu metastatického procesu .....	23
2.2. Patofyziologie metastazování maligních nádorů .....	23
2.2.1. Transformace nádorových buněk .....	24
2.2.2. Mechanismus invaze (intravazace) nádorových buněk .....	26
2.2.3. Transendoteliální migrace .....	28
2.2.4. Role nádorového mikroprostředí .....	29
<b>3. CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY</b> .....	32
3.1. Typy cirkulujících nádorových buněk .....	32
3.2. Molekulární vlastnosti cirkulujících nádorových buněk .....	33
3.2.1. Molekulární charakterizace buněk karcinomu prostaty .....	34
3.2.2. Androgenní receptor a jeho varianty .....	34
3.2.3. S nádorem spojené antigeny .....	35
3.3. Metody izolace a detekce cirkulujících nádorových buněk .....	37
3.3.1. Metody využívané pro obohacení a charakterizaci cirkulujících nádorových buněk ..	38
3.3.2. Markery používané pro detekci cirkulujících nádorových buněk .....	43
3.4. Klinické využití cirkulujících nádorových buněk .....	45
3.4.1. Význam cirkulujících nádorových buněk u kastrálně rezistentního karcinomu prostaty .....	46

3.4.2. Význam cirkulujících nádorových buněk u nemetastatického karcinomu prostaty ....	48
3.4.2. Význam cirkulujících nádorových buněk po radikální léčbě .....	49
<b>4. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b> .....	49
<b>5. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	52
5.1. Protokol studie.....	52
5.2. Krevní odběry.....	53
5.3. Využití krevních vzorků .....	53
5.4. Metodika detekce a izolace cirkulujících nádorových buněk.....	53
5.5. Metodika analýzy nádorově specifických genů .....	55
5.6. Rozšíření metodiky – analýza exprese androgenního receptoru .....	56
5.7. Dokumentace a kultivace izolovaných cirkulujících nádorových buněk .....	56
5.8. Příprava jednobuněčné nádorové suspenze z primárního nádoru .....	56
5.9. Testování genové exprese .....	57
5.10. Statistické zhodnocení .....	57
<b>6. VÝSLEDKY</b> .....	58
6.1. Základní charakteristika souboru .....	58
6.2. Odpověď na léčbu a celkové přežití .....	59
6.3. Detekce cirkulujících nádorových buněk.....	60
6.3.1. Korelace celkového přežití s klinickými parametry.....	61
6.3.2. Korelace celkového přežití s detekcí cirkulujících nádorových buněk .....	62
6.3.3. Korelace nádorově specifických transkriptů cirkulujících nádorových buněk a sérových hladin prostatického specifického antigenu.....	65
6.3.4. Korelace nádorově specifických transkriptů cirkulujících nádorových buněk a odpovědi na léčbu docetaxelem .....	67
6.3.5. Detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů před radikální prostatektomií... ..	68
6.3.6. Detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů s elevací prostatického specifického antigenu bez nálezu karcinomu prostaty.....	68
6.3.7. Detekce genu pro androgenní receptor v cirkulujících nádorových buňkách.....	69
6.4. Kultivace cirkulujících nádorových buněk – experiment .....	70
6.4.1. Ověření metodiky izolace a kultivace nádorových buněk pomocí buněčné linie.....	70
6.4.2. Kultivace nádorových buněk z mononukleární frakce .....	71
6.4.3. Kultivace cirkulujících nádorových buněk ze vzorků sledovaných pacientů .....	72
6.5. Izolace mRNA z histologických preparátů karcinomu prostaty .....	76
6.5.1. Izolace mRNA z fixovaných vzorků – optimalizace metody .....	76
6.5.2. Izolace mRNA z fixovaných vzorků – výsledky.....	77
6.6. Purifikace mRNA z fixovaných vzorků pacientů s kastroresistentním karcinomem prostaty.....	78

6.6.1. Testování genové exprese – návrh a optimalizace primerů.....	78
6.6.2. Testování genové exprese – analýza cirkulujících nádorových buněk a fixovaných vzorků .....	80
<b>7. DISKUZE.....</b>	<b>80</b>
7.1. Detekce cirkulujících nádorových buněk a prognóza pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty .....	80
7.2. Detekce genu pro androgenní receptor v cirkulujících nádorových buňkách.....	83
7.3. Kultivace cirkulujících nádorových buněk .....	84
7.4. Izolace mRNA z fixovaných vzorků a testování genové exprese.....	85
<b>8. ZÁVĚR.....</b>	<b>86</b>
<b>9. SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>88</b>
<b>10. PŘEHLED AKTIVNÍ ÚČASTI NA KONGRESECH A KONFERENCÍCH.....</b>	<b>89</b>
<b>11. OCENĚNÍ.....</b>	<b>90</b>
<b>12. VÝZKUMNÉ PROJEKTY .....</b>	<b>90</b>
<b>13. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>91</b>

## **ABSTRAKT**

### **Úvod a cíle studie**

Cirkulující nádorové buňky (circulating tumour cells – CTC) představují slibný způsob identifikace pacientů s kastročně – rezistentním karcinomem prostaty (castration – resistant prostate cancer – CRPC), kteří budou profitovat z často náročné cytotoxické léčby. Cílem této práce bylo zhodnocení prognostického významu CTC u pacientů s CRPC léčených docetaxelem. V rámci projektu jsme také testovali různé možnosti kultivace CTC a stanovení jejich genetického profilu včetně genetického profilu histologických preparátů v době diagnózy.

### **Metodika**

Do prospektivní studie bylo zařazeno celkem 39 pacientů, kteří splňovali kritéria CRPC, indikovaných k chemoterapii docetaxelem. Odběr krve pro analýzu CTC byl proveden u všech pacientů před zahájením chemoterapie a v den podání čtvrtého nebo pátého cyklu docetaxelu. Paralelně byly CTC kultivovány. Izolace a detekce CTC byla provedena pomocí systému AdnaTest, který spočívá v imunomagnetické separaci a následné detekci mRNA z lyzátu CTC. Primárním cílem studie bylo zhodnotit celkové přežití (overall survival – OS) pacientů. Analýza OS byla zkoumána pomocí Kaplan – Meierovy metody odhadu distribuční funkce přežití. Vliv jednotlivých faktorů byl testován pomocí Log–rank testu, Wilcoxon testu a Coxova regresního modelu.

### **Výsledky**

Do analýzy přežití vstoupilo celkem 30 mužů. Cirkulující nádorové buňky byly detekovány celkem u 33 z 39 (84,6 %) pacientů před chemoterapií a u 17 z 32 (53,1 %) během chemoterapie. Střední doba OS byla 15,3 (0,9–35,2) měsíců. Nejdelší OS bylo zaznamenáno u čtyř pacientů, kteří byli hodnoceni jako CTC negativní v obou odběrech. Během projektu jsme také testovali možnost detekce CTC u pacientů před radikální prostatektomií. U žádného pacienta jsme nezjistili přítomnost CTC v krevním vzorku včetně dvou pacientů s pozitivním uzlinovým nálezem po výkonu. Vyšetřili jsme také dva pacienty s vysokou hodnotou prostatického specifického antigenu při negativní biopsii prostaty, u žádného nebyly CTC zjištěny. Dále jsme vyšetřili celkem 41 pacientů na přítomnost androgenního receptoru (AR), koncentrace fragmentu AR byla ve vzorku odebraném během chemoterapie 1,5 – 11 x nižší ve srovnání se vzorkem odebraným před chemoterapií. V rámci kultivace CTC se nejvíce osvědčila metoda izolace mononukleární vrstvy buněk a její následná kultivace v Roswell Park Memorial Institute médiu s přísadkou fetálního telecího séra. Provedli jsme také optimalizaci metody zpracování histologických preparátů pro izolaci mRNA a pro následnou analýzu exprese vybraných genů.

### **Závěr**

Analýza CTC může přispět k určení prognózy pacientů s CRPC, u kterých je indikována chemoterapie docetaxelem. Kultivace CTC a stanovení jejich genetického profilu včetně srovnání s genetickým profilem karcinomu prostaty v době diagnózy může dále zpřesnit odhad odpovědi na cytotoxickou léčbu. Projekt byl podpořen granty IGA NT 12205–5/2011 a MZ ČR – RVO VFN64165.



## **ABSTRACT**

### **Introduction and aim of the study**

Circulating tumor cells (CTCs) are a promising tool of identifying patients with castration-resistant prostate cancer (CRPC) who will benefit from often demanding cytotoxic therapy. The aim of this work was to evaluate the prognostic significance of CTC in docetaxel-treated CRPC patients. Within the project, we also tested the various methods of CTC cultivation and studied their genetic profile as well as the genetic profile of histological specimen at the time of diagnosis.

### **Patients and methods**

A total of 39 patients who met the CRPC criteria and were indicated for docetaxel chemotherapy were included in the prospective study. Blood collection for CTC analysis was done in all patients before chemotherapy and on the first day of the fourth or fifth cycle of docetaxel. In parallel, CTCs were cultivated. Isolation and detection of CTC was done using the AdnaTest system, which consists of immunomagnetic separation and subsequent detection of mRNA from the CTC lysate. The primary objective of the study was to evaluate the overall survival (OS) of patients. Survival analysis was performed using the Kaplan–Meier method of estimating the survival distribution function. The impact of individual factors was tested using the Log–rank test, the Wilcoxon test and the Cox regression model.

### **Results**

Data of a total of 30 patients were used in the survival analysis. Circulating tumor cells were detected in a total of 33 out of 39 (84.6 %) patients before chemotherapy and 17 out of 32 (53.1 %) during docetaxel treatment. The mean OS was 15.3 (0.9–35.2) months. The longest OS was recorded in four patients who were CTC negative in both samples. During the project, we also tested the possibility of CTC detection in patients before radical prostatectomy. We did not detect CTC in any patient, including two patients with positive lymph nodes after surgery. We also tested two patients with high prostate-specific antigen levels and negative prostate biopsy, and no CTC were detected. In addition, we examined a total of 41 patients for the presence of androgen receptor (AR). The concentration of the AR fragment in the sample taken during docetaxel treatment was 1.5 to 11 times lower compared to the sample taken before chemotherapy. Regarding the methods of cultivation, the isolation of the mononuclear cell layer and its subsequent cultivation in the Roswell Park Memorial Institute medium with the addition of fetal calf serum proved to be the most efficient. We have also optimized the method of histological specimen processing for mRNA isolation and for subsequent analysis of expression of selected genes.

### **Conclusion**

Analysis of CTC can help estimate the prognosis of CRCP patients who are indicated for docetaxel therapy. Cultivation of CTC and determination of their genetic profile, including comparison with the genetic profile of prostate cancer at the time of diagnosis, can further improve the estimation of response to cytotoxic therapy. The project was supported by grants IGA NT 12205–5 / 2011 and MZ ČR – RVO VFN64165.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ALP</b>	alkalická fosfatáza
<b>AMACR</b>	alfa-metylacyl-CoA racemáza
<b>AR</b>	androgenní receptor
<b>ARE</b>	androgen – responsive element
<b>ASAP</b>	atypická maloacinární proliferace (atypical small – acinar proliferation)
<b>ATTC</b>	american type culture collection
<b>CAT</b>	kolektivně – améboidní transformace (collective to amoeboid transition)
<b>CD45</b>	cluster of differentiation 45 (protein tyrosine phosphatase)
<b>CK</b>	cytokeratin
<b>CRPC</b>	kastračně – rezistentní karcinom prostaty (castration – resistant prostate cancer)
<b>CSF1</b>	kolonie stimulující faktor makrofágů (macrophage colony – stimulating factor)
<b>CSS</b>	nádorově specifické přežití (cancer-specific survival – CSS)
<b>CTC</b>	cirkulující nádorové buňky (circulating tumour cells – CTC)
<b>CYP17A1</b>	cytochrom P450 17A1
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindol
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina – deoxyribonucleic acid
<b>DTC</b>	diseminované nádorové buňky (disseminated tumour cells)
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediamine tetraacetic acid)
<b>EGF</b>	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
<b>EGFR</b>	receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
<b>EMT</b>	epiteliálně – mesenchymální transformace
<b>EpCAM</b>	epithelial cell adhesion molecule
<b>ERG</b>	ETS – příbuzný gen (ETS – related gene)
<b>FACS</b>	fluorescencí aktivované třídění buněk (fluorescence-activated cell sorting)
<b>FBS</b>	fetální telecí sérum (fetal bovine calf serum)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FFPE</b>	formalínem fixované vzorky montované v parafínu (formalin-fixed paraffin-embedded)
<b>FGF</b>	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
<b>FISH</b>	fluorescenční in situ hybridizace
<b>FITC</b>	fluorescein isothyokyanát
<b>Gas6R</b>	growth arrest – specific 6 receptor
<b>GS</b>	Gleasonovo skóre
<b>HGF</b>	hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor)
<b>IBA MU</b>	Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně
<b>IGF</b>	insulinu – podobný růstový faktor (insulin – like growth factor)
<b>IL</b>	interleukin
<b>ISUP/WHO</b>	International Society of Urological Pathology/World Health Organization
<b>KP</b>	karcinom prostaty
<b>LDH</b>	laktátdehydrogenáza
<b>LH</b>	luteinizační hormon
<b>LHRH</b>	luteinizační hormon uvolňující hormonu
<b>LNCaP</b>	lymph node carcinoma of the prostate (buněčná linie)
<b>MAT</b>	mesenchymálně – améboidní transformace
<b>MET</b>	mesenchymálně – epitheliální transformace
<b>mRNA</b>	messenger ribonukleová kyselina – messenger ribonucleic acid

<b>NK cells</b>	buňky – přirození zabíječi (natural killer cells)
<b>OS</b>	celkové přežití (overall survival)
<b>PBS</b>	fosfátový pufr (phosphate buffered saline – PBS)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
<b>PDGF</b>	od destiček odvozený růstový faktor (platelet – derived growth factor)
<b>PET/CT</b>	pozitronová emisní tomografie / počítačová tomografie
<b>PSA</b>	prostatický specifický antigen
<b>PS</b>	výkonnostní stav (performance status)
<b>PSMA</b>	prostatický specifický membránový antigen
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog
<b>RANKL</b>	ligand receptoru aktivátoru nukleárního faktoru kappa-B (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)
<b>RECIST</b>	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
<b>RIN</b>	RNA integrity number
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RT-PCR</b>	reverzní transkriptáza – PCR
<b>TGF-β</b>	transforming growth factor beta
<b>TMPRSS2</b>	transmembránová proteáza, serin 2
<b>TNF</b>	tumor – necrosis factor
<b>TNM</b>	Tumour, Node, Metastasis klasifikace
<b>VEGF</b>	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

## 1. KARCINOM PROSTATY

### 1.1. Epidemiologie karcinomu prostaty v České republice

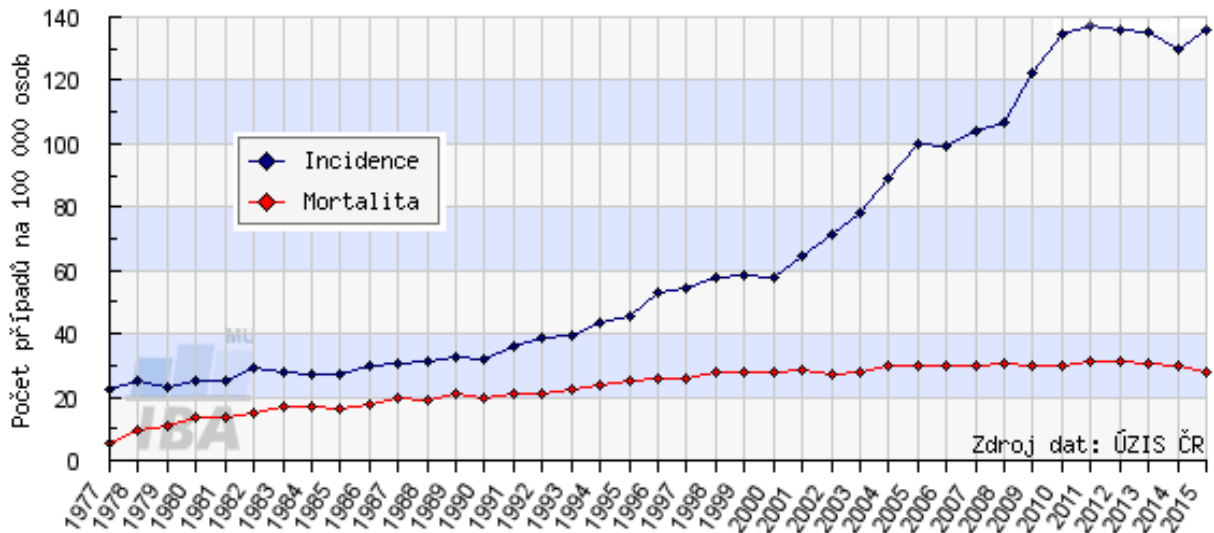
Karcinom prostaty (KP) je v České republice po kožních nádorech nejčastější nádorové onemocnění u mužů a po karcinomu plic druhou nejčastější příčinou úmrtí z maligních příčin. Za posledních 20 let se incidence KP více než ztrojnásobila a v roce 2015 dosáhla 136 na 100 tisíc mužů. Oproti tomu se mortalita prakticky nezměnila a pohybuje se kolem 30 na 100 tisíc mužů (obrázek 1). V posledních letech je tak ročně diagnostikováno kolem 7000 nových onemocnění a přibližně 1500 mužů na KP zemře. V roce 2015 přežívalo s diagnózou KP (vyléčení nebo aktuálně léčení pacienti) více než 53 000 mužů. Ve srovnání s ostatními zeměmi světa byla Česká republika v roce 2008 na 29. místě v incidenci a 36. místě v mortalitě. Karcinom prostaty je také jeden z mála nádorů, jehož incidence se posouvá směrem k mladšímu věku pacientů. Zatímco v roce 2000 bylo s nádorem zjištěno celkem 66 mužů ve věku 50–54 let, respektive 164 mužů ve věku 55–59 let, v roce 2015 to bylo již 238, respektive 651 pacientů (obrázek 2).

Více než 90 % případů je zjištěno v lokalizovaném (stádium I a II) nebo lokálně pokročilém (stádium III) stavu. Specifickou kategorií je metastatické onemocnění, tedy většina pacientů ze stádia IV. Zvláštní postavení v epidemiologii má proto, že pětileté přežití pacientů s lokalizovaným nebo lokálně pokročilým nádorem dosahuje téměř 100 %, zatímco u metastatického karcinomu přežívá pět let pouze 40 % mužů. Předpoklad, že časnější diagnostika KP sníží počet pokročilých stádií, se zatím bohužel nepotvrdil. Od roku 2001 do roku 2015 sice kleslo procento výskytu metastatického karcinomu z 16,7 na 9,2 %, absolutní počty se však v tom samém období pohybovaly mezi 527–673 případy ročně.

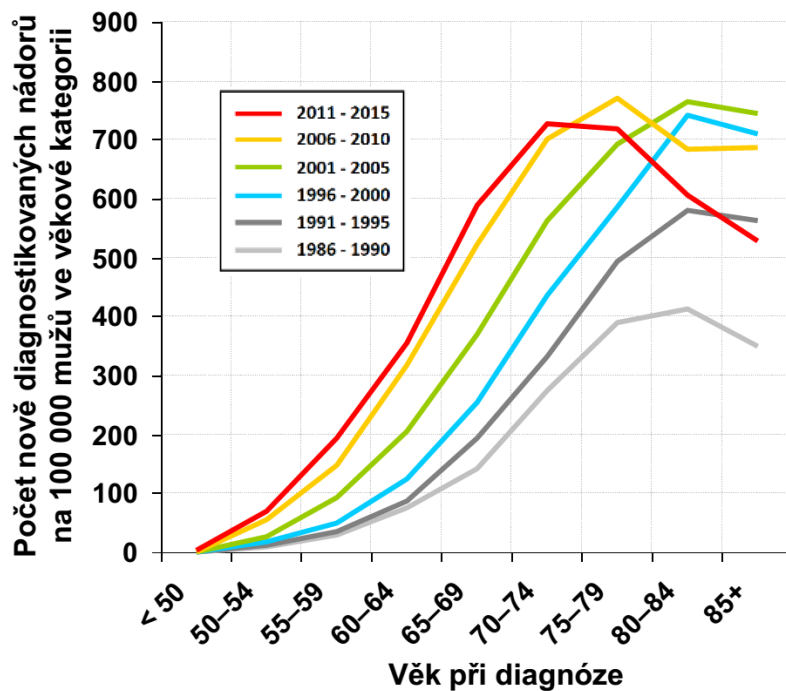
Zajímavé jsou také predikční modely, které pravidelně aktualizuje Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity (IBA MU) v Brně. V roce 2018 tak můžeme očekávat celkem 7026 nově diagnostikovaných nádorů, z nichž 878 bude ve stádiu IV. Celkem tak bude s diagnózou KP přežívat více než 66 000 mužů, ve stádiu IV to bude přibližně 5250 pacientů. Odhadované počty protinádorově léčených pacientů s metastatickým KP v roce 2018 pak dosahují 720 mužů s nově zjištěným KP ve stádiu IV. Relapsy nebo progrese do stádia IV budou léčeny u 2364 mužů a tzv. terminální relapsy (onemocnění povede v roce 2018 k úmrtí) budou léčeny u 1043 mužů. Celkem tak bude léčeno více než 4000 pacientů s pokročilým onemocněním. Léčba poslední fáze onemocnění, tedy kastračně rezistentního KP (castration-resistant prostate cancer – CRPC), bude zahájena u 500 mužů a dalších 300

pacientů bude pokračovat v léčbě, která byla započata před rokem 2018 (1). Vzhledem k tomu, že léčba pokročilého KP je mnohonásobně nákladnější, jedná se o závažná epidemiologická data.

**Obrázek 1. Vývoj incidence a mortality karcinomu prostaty (podle 1)**



**Obrázek 2. Věkově specifická incidence karcinomu prostaty v období 1986–2015 (laskavostí doc. RNDr. Ladislava Duška, Ph.D. – IBA MU – osobní data)**



## 1.2. Etiopatogeneze karcinomu prostaty

Pro vývoj KP je nutná přítomnost testosteronu. Toto je základní fakt, na kterém je založen princip hormonální léčby a také definice CRPC. Růst a přežití KP jsou tedy závislé na aktivaci androgenního receptoru (AR) na povrchu nádorových buněk. Androgenní receptor účinkuje hlavně jako DNA–vazebný transkripční faktor, který reguluje genovou expresi. Geny, které jsou regulovány AR, jsou zásadní pro vývoj a udržování mužského fenotypu. V některých typech buněk se na aktivaci receptoru podílí přímo testosteron, zatímco u jiných buněk se uplatňuje jeho účinnější metabolit, 5 $\alpha$ –reduktázou konvertovaný, dihydrotestosteron. Primárním mechanismem účinku aktivace AR je přímá regulace genové transkripce. Vazba androgenu na AR vede k jeho konformační změně, která způsobuje disociaci proteinů tepelného šoku (heat shock proteins), transport z cytosolu do buněčného jádra a dimerizaci. Dimer receptoru se váže na specifickou sekvenci DNA známou jako androgen–response element (ARE). Androgenní receptor pak ovlivňuje další proteiny v jádru, což vede ke specifické genové up– nebo down–regulaci transkripce. Výsledkem je aktivace buněčného dělení. Blokáda AR nebo nedostatek testosteronu vede k narušení receptorové signální dráhy a v konečném důsledku k apoptóze.

Hormonální léčba však není kurativní a během dvou až tří let dochází k reaktivaci této signální dráhy a další proliferaci buněk KP i přes nízké hladiny testosteronu. Ve fázi CRPC tak dochází k amplifikaci nebo zvýšené expresi androgenního receptoru, jeho mutacím, objevují se nové koregulátory nebo extragonadální a intratumorální produkce androgenů (2). Pokračování hormonální léčby i během fáze CRPC je tak naprosto zásadní.

## 1.3. Diagnostika karcinomu prostaty

Diagnóza KP je stanovena z histologického preparátu, nejčastěji z biopsie prostaty transrektálním nebo transperineálním přístupem, méně častěji jako náhodný nález při operaci prostaty pro benigní zvětšení. Transrektální biopsie probíhá většinou ambulantně v lokální anestezii s krátkodobým podáním antibiotik, zatímco transperineální biopsie vyžaduje většinou hospitalizaci s analgosedací. Indikace k biopsii vychází v současnosti nejčastěji ze zvýšené hodnoty prostatického specifického antigenu (PSA), méně častěji pouze na základě hmatného nálezu při per rektum vyšetření. Hodnota PSA je spojitá veličina, tj. s rostoucí hladinou PSA se zvyšuje pravděpodobnost diagnózy KP v biopsii. Pro zpřesnění indikace

biopsie je možné využít poměru volného a vázaného PSA nebo stanovení izoformy PSA (Prostate Health Index).

Při potvrzení diagnózy KP je v preparátu hodnoceno celkem pět stupňů pokročilosti dediferenciace nádorových žlázek. Součet prvních dvou nejčastějších stupňů představuje tzv. Gleasonovo skóre (GS) (viz kapitola 1.4.).

V případě podezření na KP je v rámci zobrazovacích metod možné využít zobrazení pomocí multiparametrické magnetické rezonance s cíleným odběrem vzorků ze suspektních lézí (tzv. fúzní biopsie prostaty). Magnetická rezonance se také využívá k hodnocení lokálního rozsahu onemocnění před plánovaným radikálním ošetřením. Mezi další zobrazovací metody patří CT břicha k posouzení případné lymfadenopatie nebo viscerálních metastáz. Karcinom prostaty nejčastěji metastazuje do skeletu, scintigrafie skeletu je tedy zlatým standardem pro identifikaci případného postižení kostí. Přesnější informace pak poskytne  $^{18}\text{F}$ -cholin PET/CT nebo  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA PET/CT (3).

#### 1.4. Stádia a rizikové skupiny karcinomu prostaty

Karcinom prostaty může být rozdělen do několika stádií podle pokročilosti onemocnění dle Tumour, Node, Metastasis (TNM) klasifikace 2017, hladiny PSA a GS z histologie. Klasifikace T1a–b zahrnuje pacienty s náhodně zjištěným KP při operacích pro benigní hyperplazii. Klasifikace T1c je nejčastější a představuje nehmotný nádor, který není viditelný na zobrazovacích vyšetřeních a byl zjištěn v biopsii prostaty na základě elevace PSA. Klasifikace T2a–c zahrnuje nádor lokalizovaný na prostatu, u T3a nálezu se jedná o extraprostatické šíření, u T3b jsou postiženy semenné vázky. Nejpokročilejší nález je u T4 klasifikace, kdy nádor invaduje močový měchýř, rektum, zevní sfinkter nebo přilehlé pánevní svaly. Postižení pánevních uzlin je hodnoceno jako klasifikace N1. Metastatické úrovně jsou postižení uzlin nad pánevní oblastí (M1a), skeletu (M1b) a ostatních orgánů (M1c) (4).

Gleasonovo skóre vyjadřuje histologickou klasifikaci diferenciace nádorových žlázek. V odběru z biopsie prostaty nebo preparátu po radikální prostatektomii stanoví patolog nejčastější a druhý nejčastější stupeň z pěti stupňů Gleasonova gradingu. Skóre tak může dosáhnout hodnoty 2–10. V roce 2014 došlo k formální změně v hlášení a v současnosti by měl být spolu s GS stanoven i tzv. International Society of Urological Pathology (ISUP) 2014 stupeň (tabulka 1) (5).

Karcinom prostaty můžeme také klasifikovat do tří rizikových skupin: nízkého, středního a vysokého rizika. Riziko vychází z řadu let uznávané predikce selhání radikální léčby a návratu onemocnění ve formě biochemického relapsu (6). Rizikové skupiny také umožní stratifikovat pacienty pro potřeby analýz registrů nebo klinických studií a v poslední řadě se jimi do velké míry řídí i volba léčby (tabulka 2).

**Tabulka 1. Gleasonovo skóre a International Society of Urological Pathology 2014 (ISUP) grading (podle 3)**

Gleasonovo skóre	ISUP stupeň
2–6	1
7 (3 + 4)	2
7 (4 + 3)	3
8 (4 + 4 nebo 3 + 5 nebo 5 + 3)	4
9–10	5

**Tabulka 2. Rizikové skupiny karcinomu prostaty (modifikováno podle 3, 7)**

Riziková skupina	Stádium onemocnění	Parametry
<b>Nízké riziko</b>	<b>Lokalizované</b>	PSA <10 ng/ml a GS <7 (ISUP grade 1) a cT1–T2aN0M0
<b>Střední riziko</b>		PSA 10–20 ng/ml nebo GS 7 (ISUP grade 2–3) nebo cT2b–T2cN0M0
<b>Vysoké riziko</b>		PSA > 20 ng/ml nebo GS 8–10 (ISUP grade 4–5) nebo cT3aN0M0
<b>Velmi vysoké riziko</b>	<b>Lokálně pokročilé</b>	Jakékoli PSA, jakékoli GS a cT3b–T4N0M0 nebo cT1–4N1M0
	<b>Metastatické</b>	Jakékoli PSA, jakékoli GS a cT1–4N0–1M1a–c
	<b>Kastračně rezistentní</b>	Testosteron <1,7 nmol/l (<50 ng/dl) a progresse PSA nebo radiologická progresse



## 1.5. Možnosti léčby karcinomu prostaty podle klinických stádií

### 1.5.1. Léčba lokalizovaného karcinomu prostaty

V případě lokalizovaného KP nízkého rizika je možné zvolit jeden z konzervativních režimů. Pacienty s dobrou očekávanou dožítí kratší než deset let nebo se závažnými komorbiditami lze pouze sledovat a léčbu, v tomto případě paliativní, zahájit až v případě symptomatické progresy. Jedná se o režim pozorného vyčkávání (watchful waiting). Druhým konzervativním režimem je aktivní sledování (active surveillance). V tomto případě je pacient s KP nízkého rizika na základě přísných kritérií zařazen do protokolu, který vyžaduje pravidelné kontroly PSA, vyšetření per rektum a opakované biopsie prostaty. Při potvrzení objektivní progresy, tedy zhoršení klinicko–patologických parametrů během sledování ve srovnání se vstupními parametry, je protokol ukončen a pacient podstoupí radikální léčbu s kurativním záměrem.

Radikální prostatektomie je chirurgický výkon, při kterém je odstraněna prostata, tzv. chirurgické pouzdro a semenné vajíčky. Následně je vytvořena anastomóza mezi měchýřem a močovou trubicí. V indikovaných případech je připojena extenzivní pánevní lymfadenektomie. Výkon je možné provést otevřenou cestou, laparoskopicky nebo za asistence operačního robota. V případě selhání radikální prostatektomie je možné ozářit oblast lůžka po operaci a/nebo spádových uzlin buď formou adjuvantní radioterapie (v případě nepříznivých histologických parametrů definitivního preparátu) nebo záchranné („salvage“) radioterapie (v případě PSA relapsu).

Radioterapie s modulovanou intenzitou (intenzity – modulated radiotherapy), případně doplněná o navádění pomocí pravidelného zobrazení polohy orgánu (image – guided radiotherapy) je zlatým standardem pro radiační léčbu KP. Současné režimy zahrnují buď normální frakcionaci dávek (cca 37–40 x 2 Gy / den, tj. až osm týdnů léčby), hypofrakcionaci (nejčastěji 20 x 3 Gy, tj. čtyři týdny léčby) nebo dokonce utrafrakcionaci (cca 4–5 x 7–8 Gy, tj. cca dva týdny léčby). V případě KP středního rizika je vhodné kombinovat radioterapii s krátkodobou neoadjuvantní hormonální léčbou (cca 6 měsíců), u KP vysokého rizika dále pokračuje hormonální léčba v adjuvantním režimu po dobu dvou až tří let. Protonová radioterapie je slibnou metodou, která na základě fyzikálně příznivějšího rozložení distribuce dávky (tzv. Braggův peak) teoreticky snižuje riziko ozáření okolních orgánů (močový měchýř, rektum), dlouhodobé výsledky však nejsou k dispozici. Brachyterapie KP je populární metodou např. ve Spojených státech, jedná se buď o zavedení radioaktivních zrn

jódu  $^{125}\text{I}$  (nízko-dávkováná brachyterapie), nebo o krátkodobé zavedení zářičů  $^{192}\text{Ir}$  nebo  $^{137}\text{Cs}$  v celkové anestezii přes hráz do prostaty (cca třikrát během dvou dnů).

### 1.5.2. Léčba lokálně pokročilého karcinomu prostaty

Při léčbě lokálně pokročilého KP (TNM klasifikace T3–4 N0–1 M0) se v současnosti ke většině případů přistupuje s radikálním záměrem, tj. dosáhnout spojením chirurgické, radiační a případně hormonální léčby vyléčení pacienta i za cenu vyšších komplikací každé ze zvolených modalit a jejich kombinací. Pacient však musí být předem informován, že například po radikální prostatektomii s vysokou pravděpodobností ještě podstoupí adjuvantní radioterapii nebo že při zvolení radikální radioterapie bude ještě několik let po ozáření užívat v adjuvantním režimu hormonální léčbu.

### 1.5.3. Léčba metastatického karcinomu prostaty

Kastrační léčba je první metodou volby u metastatického KP. Cílem léčby je snížit hladinu testosteronu na tzv. kastační úroveň, tedy pod 1,7 nmol/l nebo 50 ng/dl. Účinná blokáda zabraňuje růstu KP, snižuje riziko komplikací a prodlužuje nádorově specifické (cancer-specific survival – CSS) i celkové (overall survival – OS) přežití. Chirurgická kastrace (bilaterální orchiektomie) je nejdéle známou metodou hormonální léčby, výhodou je rychlost poklesu testosteronu a minimální riziko selhání léčby. Nevýhodou je nutnost operačního výkonu, irreverzibilita a možný psychologický efekt. Farmakologickou kastraci lze provést aplikací analog luteinizačního hormonu (LH) uvolňujícího hormonu (LHRH), které dokáží zpětnou vazbou zablokovat produkci LH z hypofýzy, a tak zamezit tvorbě testosteronu ve varlatech. Nejčastěji užívané preparáty jsou leuprorelin, goserelin a triptorelin. Injekce depotní látky jsou podávány v 1–3–6 měsíčních intervalech. Druhou možností jsou LHRH antagonisté (degarelix), které přímo blokují sekreci LH v hypofýze obsazením receptorů pro LHRH. Nevýhodou farmakologické kastační léčby je nutnost pravidelných injekčních aplikací a vyšší riziko selhání v udržení kastační hladiny testosteronu ve srovnání s bilaterální orchiektomií. Nedílnou součástí kostních metastáz je podávání bisfosfonátů (zoledronová kyselina) nebo denosumabu (monoklonální protilátka), nově se také v první linii léčby uplatňuje docetaxel a abirateron, o kterých bude pojednáno dále.

## 1.6. Kastačně rezistentní karcinom prostaty

V případě selhání hormonální léčby dochází k růstu nádorových buněk bez ohledu na kastační hladinu testosteronu a onemocnění vstupuje do fáze CRPC. Podle doporučení EAU

je CRPC definován jako KP, který je léčen hormonální léčbou, hladiny testosteronu dosahují kastročních hodnot a současně je přítomná buď biochemická nebo radiografická progresse. Biochemická progresse je definována jako postupný vzestup PSA, tj. tři po sobě následující vzestupy PSA nejméně týden od sebe, vždy o nejméně 50 % ve srovnání s nadírem PSA, a absolutní hladinou PSA > 2 ng/ml. Radiografická progresse je definována zjištěním dvou a více nových kostních lézí nebo progresí lézí v měkkých tkáních podle kritérií Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST) (7). Specifickou skupinu tvoří pacienti s nemetastatickým CRPC (hormonální léčba zahájená např. při biochemickém relapsu po radikální léčbě nebo jako primární léčba u lokálně pokročilého KP bez metastáz). Tito pacienti jsou v současné době odkázáni na klinické studie s novými blokátory androgenního receptoru (apalutamid, darolutamid) nebo přidání bicalutamidu ve formě maximální androgenní blokády. U metastatického CRPC je volba mnohem širší, ať už se jedná o nové hormonální preparáty (abirateron, enzalutamid), cytotoxickou léčbu (docetaxel, cabazitaxel) nebo systémovou radioterapii (radium-223).

### **1.6.1. Prognóza kastročně rezistentního karcinomu prostaty**

Stádium CRPC je i v době nových léků stále letálním onemocněním se střední dobou přežití závislou na rozsahu metastáz a symptomatologii. Poslední přehled, který je k dispozici v EAU Guidelines z roku 2011, uvádí relativně velký rozptyl přežití od 9 do 27 měsíců (tabulka 3) (8). Za posledních několik let však se dramaticky prodloužilo přežití ve všech kategoriích CRPC, například medián celkového přežití pacientů s asymptomatickým vzestupem PSA bez metastáz nebyl v níže publikovaných studiích dosažen, ale s největší pravděpodobností by přesáhl daleko nad 60 měsíců. Jedná se však o pečlivě vybrané pacienty bez výrazných komorbidit, v dobrém výkonnostním stavu a s příznivými laboratorními výsledky. Nedávno publikovaná analýza registru SEER rozdělila více než 8 500 pacientů na poloviny, z nichž jedna byla diagnostikována s metastatickým KP v období 2004–2008 a druhá v období 2009–2014. Nádorově specifické přežití (36 měsíců vs. 32 měsíců;  $p < 0,0001$ ) i OS (29 měsíců vs. 26 měsíců;  $p < 0,0001$ ) byly významně delší v kohortě mladších pacientů. Riziko úmrtí na KP tak bylo o 12 % nižší ve srovnání s historickou skupinou (9).

**Tabulka 3. Předpokládané přežití pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty podle rozsahu onemocnění v roce 2011 (podle 8)**

Charakteristika pacientů	Celkové přežití
Asymptomatický vzestup PSA	
Bez metastáz	24–27 měsíců
Minimální metastázy	16–18 měsíců
Rozsáhlé metastázy	9–12 měsíců
Symptomatický vzestup PSA	
Minimální metastázy	14–16 měsíců
Rozsáhlé metastázy	9–12 měsíců

### 1.6.2. Prognostické parametry kastročně rezistentního karcinomu prostaty

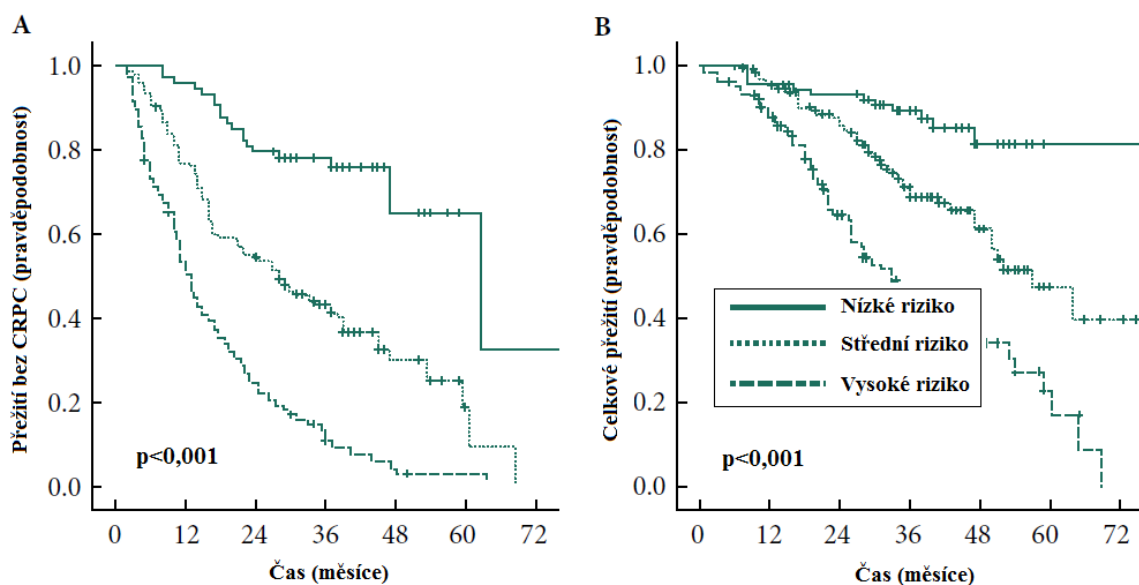
V roce 2014 byla publikována aktualizovaná data z protokolu studie CALGB–90401 která zařadila celkem 1050 s metastatickým CRPC k léčbě docetaxelem s placebem nebo s bevacizumabem. Primárním cílem bylo OS. V multivariatní analýze byly pro OS významné horší výkonnostní stav, přítomnost viscerálních metastáz, užívání opiátů, vyšší hladiny laktátdehydrogenázy (LDH), alkalické fosfatázy (ALP), PSA a nižší hladiny hemoglobinu a albuminu. Na základě bodového výsledku nomogramu byli pacienti zařazeni do skupiny nízkého nebo vysokého rizika. Střední doba OS byla významně delší ve skupině s nižším rizikem (30,1 vs. 16,6 měsíců;  $p < 0,001$ ) (10).

Také s nástupem nových hormonálních preparátů se objevují prognostické modely přežití pacientů léčených například abirateronem nebo enzalutamidem. Subanalýza studie COU–AA–301 vyhodnotila jako signifikantní s ohledem k přežití horší výkonnostní stav, kratší dobu hormonální léčby, přítomnost jaterních metastáz, nízké hodnoty hemoglobinu a vyšší hodnoty LDH a ALP. Validační studie těchto parametrů z jednoho centra, které se účastnilo výše uvedeného protokolu, potvrdila delší přežití pacientů ve skupině dobré prognózy proti skupině se střední nebo špatnou prognózou (21,8 vs. 10,6 vs. 6,8 měsíců,  $p=0,0001$ ) (11).

Nejnovější predikční model hodnotí riziko vzniku CRPC a OS u nově metastatického KP. Celkem 449 pacientů bez viscerálních metastáz léčených na jednom pracovišti v letech 2011–2016 bylo hodnoceno v retrospektivní analýze. Střední doba do CPRC byla 26,4 měsíců

a střední doba OS byla 57,0 měsíců. Celkem 307 (68,4 %) pacientů mělo  $GS \geq 8$ . Mezi prediktivní faktory pro dobu do CRPC i OS patřily vyšší GS, přítomnost intraduktálního KP, horší výkonostní stav, vyšší vstupní hladina PSA, ALP a nižší hladina hemoglobinu. Každý z parametrů byl ohodnocen ve skórovacím systému, výsledné skóre mohlo dosáhnout 0–13 pro dobu do CRPC a 0–16 pro OS. Pacienti ve skupině s nízkým rizikem (0–4) měli významně delší dobu do vzniku CRPC než pacienti se středním (5–7) nebo vysokým (8–13) rizikem (střední doba 62,6 vs. 28,0 vs. 13,0 měsíců;  $p < 0,001$ ) (obrázek 3A). Podobně pacienti s nízkým rizikem (0–5) přežívali významně déle ve srovnání se skupinou středního (6–8) nebo vysokého (9–16) (střední doba nedosažena vs. 57,10 vs. 33,0 měsíců;  $p < 0,001$ ) (obrázek 3B) (12).

**Obrázek 3. Doba přežití bez kastračně rezistentního karcinomu prostaty (CRPC) a celkové přežití pacientů s de novo metastatickým karcinomem prostaty podle rizikových skupin (podle 12)**



### 1.6.3 Léčba kastračně rezistentního karcinomu prostaty

Základem léčby CRPC je pokračování v kastracní léčbě. Kastracní léčba může být kombinována s antiandrogeny, které se kompetitivně váží na AR a blokují účinek androgenů z extratestikulárních zdrojů. V případě další progresse onemocnění je přerušena léčba antiandrogenem a ponechána pouze kastracní léčba. Volba první linie léčby CRPC se nejčastěji řídí klinickým stavem pacienta, rozsahem onemocnění a odpovědí na předchozí léčbu. Nové hormonální preparáty se uplatní spíše u pacientů v dobrém výkonostním stavu, bez přítomnosti viscerálních metastáz a relativně dlouhou (více než jeden rok) odpovědí na

primární kastroční léčbu. U pacientů s rychlou progresí onemocnění nebo výraznými bolestivými symptomy volíme spíše cytotoxickou léčbu.

Abirateron acetát je perorální inhibitor CYP17A1. Tento enzym se podílí na syntéze testosteronu, jeho bloádou tedy dochází k výraznému prohloubení kastročního účinku (průměrné hladiny testosteronu 1–2 ng/dl). Lék je pro jeho mineralokortikoidní vedlejší účinky (hypertenze, hypokalémie, periferní otoky) nutné podávat s prednisonem. Enzalutamid je perorální blokátor AR, který svým trimodálním účinkem zabraňuje vazbě testosteronu na receptor, blokuje přenos komplexu AR–ligand do blízkosti jádra a aktivaci ARE spolu s dalšími aktivátory transkripce. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří gynekomastie, únava, zácpa nebo průjem, návaly horka a bolest zad nebo kloubů. Oba preparáty jsou na základě publikovaných randomizovaných studií fáze III v současné době schváleny k podání jak před docetaxelem (studie COU–AA–302, PREVAIL), tak i po selhání cytotoxické léčby (studie COU–AA–301, AFFIRM) (13).

V případě chemoterapie je v současnosti lékem první volby docetaxel. Klinické studie TAX–327 a SWOG 99–19 prokázaly prodloužení přežití u pacientů s metastatickým CRPC léčených docetaxelem proti pacientům léčených mitoxantronem. Docetaxel je podáván intravenózní infúzí nejčastěji každé tři týdny v dávce 75mg/m<sup>2</sup>. Ke komplikacím léčby patří alopecie, únava, nauzea, porucha trofiky nehtů a neutropenie. Další možností léčby po selhání docetaxelu je chemoterapie pomocí nového analoga taxanů, cabazitaxelu. Na základě výsledků studie CHARTED je v současnosti u pacientů s metastatickým karcinomem prostaty možné kombinovat chemoterapii docetaxelem s kastroční léčbou v první linii.

U pacientů s kostními metastázami bez viscerálních ložisek je v případě progresu po docetaxelu a přítomnosti bolestivých symptomů podat systémové radiofarmakum radium–223. Jedná se o alfažářič s vysokou afinitou ke kostní hmotě, jehož vliv na prodloužení OS ve srovnání s placebem byl jasně prokázán ve studii ALSYMPCA.

Nedílnou součástí léčby kostních metastáz nejen u KP je podávání bisfosfonátů (nejčastěji kyselina zoledronová intravenózně) nebo denosumabu (monoklonální protilátka proti ligandu receptoru aktivátoru nukleárního faktoru kappa–B – RANKL) (7).

## 2. METASTATICKÝ PROCES

Naprostá většina (90 %) úmrtí spojená s maligními onemocněními je způsobena metastazováním původního nádoru na vzdálená místa od primárního nádorového ložiska. Metastatický proces je definován jako únik nádorových buněk z původního ložiska do lymfatického nebo krevního řečiště a vytvoření nového ložiska v tkáních nebo orgánech lidského těla. Tato ložiska pak mají charakteristiky buněk primárního nádoru, například buňky metastáz KP do kostí mají vlastnosti buněk KP, a ne kostních buněk. Zásadní roli v metastatickém procesu hrají cirkulující nádorové buňky (circulating tumour cells – CTC).

### 2.1. Historie výzkumu metastatického procesu

První dokumentovaná zmínka o nádorových buňkách v periferní krvi pochází z roku 1869, kdy australský lékař Thomas Ashworth vyslovil hypotézu, že buňky v krvi identické s buňkami primárního tumoru mohou souviset s metastatickým rozsevem u pacientů. Porovnal morfolologii CTC u různých nádorů a uzavřel, že „pokud (CTC) pochází z existující nádorové masy, musely projít velkou částí oběhového systému, než dorazily do v. saphena zdravé končetiny“ (14). Patogeneze metastatického procesu zahrnuje několik kroků, které jsou ovlivněny jednak vlastnostmi nádorových buněk a jednak imunitní odpovědí organismu. V roce 1889 definoval anglický chirurg Stephen Paget interakci hostitel vs. nádorové buňky. Na základě pitevnických výsledků více než 700 žen s metastatickým karcinomem prsu zpochybnil původní Virchowovu teorii embolizace částí nádorů, která měla být odpovědná za vznik metastáz. U pacientek totiž byly ve vyšší míře infiltrovány orgány, které mají relativně slabší krevní zásobení (skelet, vaječníky), zatímco například postižení sleziny bylo velmi vzácné. Paget tak přichází s teorií „seed and soil“ a přirovnal proces metastazování k rozsevu semen rostlin, který také probíhá všemi směry, ale nová rostlina vyrostne pouze na příhodné půdě (15). V novém tisíciletí je tato teorie stále široce přijímána, ačkoliv termín „seed“ byl nahrazen progenitorovou nebo kmenovou buňkou a „soil“ je definováno jako stroma nebo orgánové mikroprostředí. V současnosti se uvažuje také o expresi tzv. „homing factors“ u CTC a v místě vzniku metastáz, které mohou předurčovat směrování CTC do jednotlivých metastatických lokací (16).

### 2.2. Patofyziologie metastazování maligních nádorů

Metastazování je postupný proces, který zahrnuje lokální infiltraci nádorových buněk do přilehlých tkání, transendoteliální migraci buněk do cév (intravazace) a přežití během

jejich cirkulace, další transendoteliální migraci mimo cévní řečiště (extravazace) a následnou proliferaci v určených orgánech, která vede k tzv. kolonizaci. Metastazování je velmi neefektivní, neboť velké množství uvolněných buněk musí zabránit selhání komplexního obranného procesu. Tento proces zahrnuje mechanické a molekulární aspekty migrace, účast imunitního a hormonálního systému a v neposlední řadě zajišťuje vhodné místo pro vytvoření vzdálených ložisek. V důsledku toho méně než 0,1 % diseminovaných buněk úspěšně vytvoří vzdálené metastázy (17).

### 2.2.1. Transformace nádorových buněk

Proces metastazování je zahájen uvolněním subpopulace buněk primárního tumoru do krevního nebo lymfatického řečiště a migrací těchto buněk do tkání. Nádorové buňky podstupují morfologické a fenotypické změny známé jako epiteliálně – mesenchymální transformace (EMT), kolektivně – améboidní transformace (collective to amoeboid transition – CAT) a mesenchymálně – améboidní transformace) (obrázek 4) (18).

#### 2.2.1.1. Epiteliálně–mesenchymální transformace

Koncept EMT vychází z *in vitro* studií, které zkoumaly embryonální vývoj, včetně změn fenotypu a chování buněk při invaginaci dovnitř embrya a tvorbě mesodermu. Tento proces umožňuje přežití buněk blokováním apoptotického procesu a odpovědí na reakci imunitního systému. Podobný proces probíhá také při embryogenezi, chronickém zánětu, fibróze nebo hojení ran. Molekulárně je EMT charakterizována ztrátou vlastností epiteliálních buněk, tj. adhezivity a bazo – apikální polarizace, pod vlivem různých růstových faktorů, cytokinů, proangiogenních a transkripčních faktorů. Na molekulární úrovni je nejdůležitějším krokem ztráta transmembránového glykoproteinu E–cadherinu. Současně buňka získává zvýšenou expresi vimentinu nebo neuronálního N–cadherinu vlastnosti mesenchymálních buněk, tj. pohyblivost a s tím spojenou schopnost migrace přes bazální membránu a vstupu do krevního řečiště (19). Na procesu EMT se podílí řada faktorů, včetně integrinů, růstového faktoru hepatocytů, fibroblastů, vaskulárně – endoteliálního a z destiček odvozeného růstového faktoru. Transforming growth factor beta (TGF– $\beta$ ) je považován za klíčového hráče v regulaci nádorové progresu. V rámci tohoto procesu se u nádorové buňky objevují také znaky buněk kmenových. Pro uchycení nádorové buňky (tj. seeding) a následně vznik metastatického ložiska, je nezbytné, aby byla EMT reverzibilní a buňka byla schopná se změnit zpět na buňku epiteliální. Tento proces se logicky nazývá mesenchymálně – epiteliální transformace (MET) a hraje klíčovou roli pro vznik metastáz. Je pravděpodobné, že proces



EMT je trvale podporován spíše přechodnými molekulárními změnami, které vznikají vlivem extracelulárních podnětů z mikroprostředí nádorů, např. hypoxií, spíše než trvalými genetickými abnormitami. Zdá se tedy, že reverzibilita EMT je způsobena epigenetickými regulačními mechanismy a jejich stabilními, nicméně reverzibilními změnami, bez změn v primární sekvenci DNA (20). Rozbor epigenetických změn, které vedou k EMT, přesahuje rozsah této práce, jedná se hlavně o DNA metylaci CpG dinukleotidů a posttranskripční modifikace histonů, včetně acetylace, metylace, biotinylace a fosforylace. Nedávné práce potvrdily, že dostupnost určitých metabolitů produkovaných samotnými buňkami je nezbytná pro udržení tohoto procesu epigenetických změn. Byla tak potvrzena přímá souvislost nutričních změn a metabolického výdeje s genovou expresí a následně maligním bujením. V důsledku toho je pravděpodobné, že abnormální podmínky buněčného mikroprostředí jako hypoxie, nízké pH nebo nedostatek živin spustí sérii odpovědí v nádorových buňkách včetně metabolické adaptace, epigenetických změn včetně dediferenciace charakteru EMT. To pak maligním buňkám umožní přemístit se do vzdálených tkání a orgánů, které poskytnou odpovídající prostředí pro jejich rychlý růst.

#### **2.2.1.2. Kolektivně améboidní transformace**

Kolektivně améboidní transformace je popisována jako oddělení jednotlivých buněk od buněčných celků pomocí tzv. améboidní migrace, například u melanomu. Améboidní buňky vykazují sníženou interakci s extracelulární matrix (ECM), které jim umožňuje průnik touto bariérou nezávisle na proteolýze. Ke kolektivně améboidní transformaci dochází nejčastěji po inhibici integrinu- $\beta 1$ , která umožňuje améboidní pohyb jednotlivých buněk. Únik buněk z takové souhrnné buněčné organizace souvisí s rozpojením komplexů E-cadherin dependentních buněk. V současné době je otevřenou otázkou, zda se CAT vyskytuje přímo nebo jinak nepřímým způsobem použitím intermediárního buněčného fenotypu (21).

#### **2.2.1.3. Mesenchymálně améboidní transformace**

Přeměna mesenchymálních buněk do améboidních byla popsána u karcinomu prsu, melanomu a fibrosarkomu. Tato změna je závislá na signálních drahách Rac a Rho/ROCK a současně není ovlivněna proteázovými aktivitami, tj. matrix – metaloproteinázami (MMP), serinovými proteázami nebo kathepsiny. Blokáda extracelulární proteolýzy tak vede k indukci MAT. Krom intratumorózní regulace může být MAT indukována regulačními proteiny, např. EphA2 kinázou. Exprese tohoto proteinu např. u melanomu souvisí se změnami v plasticitě buněk vedoucí k améboidní motilitě, která je doprovázená schopností invaze bez předchozí

proteolýzy. Na kontrole MAT se navíc podílí tumor–supresorové proteiny p27 a p53. Ztráta těchto proteinů přispívá k agresivitě nádorových buněk změnou jejich způsobů invaze (22). Na invazivitě např. buněk sarkomu se navíc podílí i zvýšená exprese mikrotubuly destabilizujícího proteinu stathminu.

## **2.2.2. Mechanismus invaze (intravazace) nádorových buněk**

### **2.2.2.1. Kolektivní buněčná invaze**

Ke hromadné invazi nádorových buněk dochází např. u karcinomu prsu, endometria, kolorektálního karcinomu a u melanomu. Tento proces charakterizují tři kroky: a) mezibuněčná spojení zůstávají během migrace intaktní, b) vícebuněčná koordinace polarity a cytoskeletální aktivity vytváří trakční sílu potřebnou pro pohyb buněčného komplexu, c) dochází k remodelaci ECM a změnám v bazální membráně. Spolupracující buňky si zachovávají vzájemné kontakty, jakými jsou adherence, pevná a volná spojení a sdílení desmosomů. K usměrnění pohybu celého komplexu je nutná vazba integrinů ze substrátu na tzv. vedoucí buňky invaze. Remodelace ECM je naprosto zásadní pro umožnění kolektivní invaze. Z velké části je závislá na produkci MMP vedoucími buňkami. Metaloproteinázy totiž otevírají a rozšiřují cestu průchodu celému komplexu skrz ECM (23).

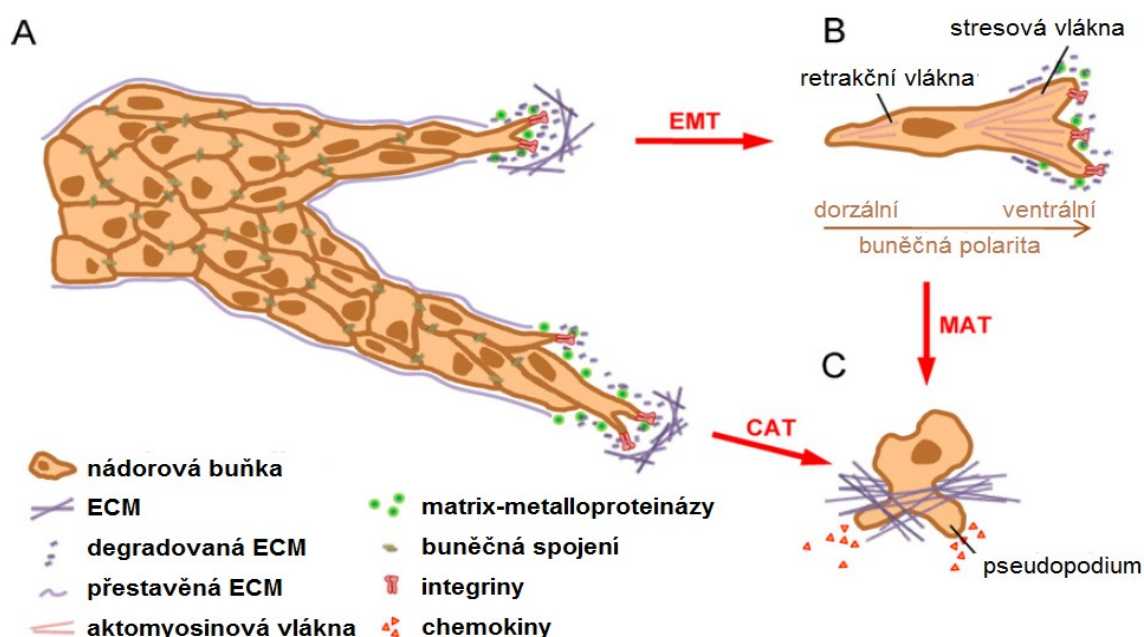
### **2.2.2.2. Mesenchymální buněčná invaze**

Mesenchymální invaze zahrnuje pět stupňů, tj. pseudopodní protruze, vytvoření fokálních kontaktů, cílenou proteolýzu, kontrakci vláken aktinu a myosinu, a nakonec oddělení tzv. následujícího konce buňky. Invaze jednotlivých mesenchymálních buněk byla pozorována u fibrosarkomu, glioblastomu a melanomu. U karcinomů vznikají mesenchymální buňky procesem EMT, jak je popsáno výše. Přeskupení vláken aktinu vede k částečné polarizaci buněk. Tyto buňky jsou pak v přední části fixovány k ECM, zatímco zadní část „vlaje“ v kontrakcích retrakčních vláken. Přechodná exprese TGF- $\beta$  je zodpovědná za dediferenciaci nádorových buněk a za následné odpojení z buněčných komplexů a napojení na ECM. V nádorové tkáni vykazují jednotlivé buňky různou motilitu a za ty vskutku pohyblivé lze považovat přibližně 5 % z nich. Do procesu aktivace motility navíc vstupuje i jaderná akumulace proteinu Smad2, který je hlavním signálním proteinem pro receptory TGF- $\beta$ . Bylo také prokázáno, že TGF- $\beta$  umožňuje motilitu nádorových buněk aktivací Smad4, receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) a řady jiných faktorů, které jsou již spojeny s EMT (24).

### 2.2.2.3. Améboidní buněčná invaze

Základní charakteristiky améboidní invaze zahrnují ztrátu adherence k ECM, kompletní ztrátu buněčné polariry a schopnost chemotaxe (25). Invaze jednotlivých amébních buněk byla popsána u karcinomu prsu, lymfomu, malobuněčného karcinomu plic a v neposlední řadě u KP. Na rozdíl od mesenchymálních buněk se améboidní buňky vyznačují kulovitým tvarem, schopností růstu v suspenzi, absencí formace tzv. stresových vláken a vlivu na remodelaci extracelulární matrix a nepřítomností integrinů. Navíc jsou améboidní buňky nezávislé na proteázách, jelikož využívají spíše mechanické síly (řízené aktinem a myosinem) k rozvolnění ECM. Améboidní buňky vznikají nejčastěji při protinádorové léčbě, která využívá protilátky proti integrinům nebo inhibitory proteáz. Například inhibice integrinu- $\beta 1$  vede ke ztrátě mezibuněčné adheze, rozvolnění buněk a přeměně do améboidních buněk u melanomu nebo fibrosarkomu (26). Podobně inhibice MMP nedokázala zabránit nádorové progresi, protože došlo ke změně motility do améboidního typu. V současnosti je améboidní invaze zkoumána v podmínkách *in vitro* a předpokládá se, že studie v nativní kolagenní komponentě přinesou další poznatky.

**Obrázek 4. Možnosti invaze nádorových buněk.** Uvolnění nádorové buňky z epiteliálního clusteru (A) během epiteliálně – mesenchymální transformace (EMT). Vytvoření fokálních adhezí a dezintegrace extracelulární matrix (ECM) pomocí proteáz (B). Kolektivně – améboidní transformace (CAT) je nejrychlejší varianta buněčné invaze (C), která vede k úplné ztrátě buněčné polariry a parakrinně řízené chemotaxi inhibicí  $\beta$ -integrinů (CAT) nebo proteáz (mesenchymálně – améboidní transformace – MAT) (podle 18)



### 2.2.3. Transendoteliální migrace

Krevní řečiště je považováno za hlavní cestu metastatického rozsevu, ačkoliv nové studie přinášejí informace o možné klíčové roli lymfatického systému v diseminaci nádorových buněk. Na rozdíl od cévních kapilár jsou lymfatické kapiláry tenkostěnné cévy tvořené jednou vrstvou endoteliálních buněk bez pevných mezibuněčných spojení. Navíc neobsahují vrstvu buněk hladké svaloviny a bazální membránu (27). Bez ohledu na to, že intersticiální tekutiny, makromolekuly, a dokonce bakterie mohou do lymfatických cév snadno pronikat, dochází také ke snadné invazi nádorových buněk potencionované především vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) typu C nebo D (28). Je stále předmětem diskuzí, zda nádorové buňky aktivně přestupují přes krevní a lymfatickou bariéru v odpovědi například na růstové faktory nebo dokonce pronikají přes cévní stěnu pasivně. Jednou z možností pasivního průniku je využití tzv. slabých míst v adhezi buněk endotelu při nekontrolovaném růstu nádorových klastrů. Nicméně nádorové buňky podléhají v krevním nebo lymfatickém řečišti v naprosté většině apoptóze a nejsou tak schopny mechanicky narušit cévní stěnu k extravazaci, jak tomu bylo při výše zmíněné intravaskulární invazi. Změny fenotypu buněk charakterizované expresí a sekrecí růstových faktorů spíše podporují teorii aktivní intravazace během metastazování. Například u karcinomu prsu tak bylo prokázáno jasné spojení sekrece epidermálního růstového faktoru (EGF) koloniemi stimulujícího faktoru (CSF1) makrofágů se sekrecí receptoru EGF buňkami karcinomu prsu (29). Navíc opět aktivace receptoru typu II pro TGF- $\beta$  a Smad4 se ukázala jako mediátor hematogenní diseminace karcinomu prsu. Diseminované nádorové buňky nalezené v lymfatickém řečišti však nebyly závislé na signální dráze TGF- $\beta$  a byly spíše organizovány v klusterech. Alternativní model tak navrhuje, že metastatický proces je výsledkem spolupráce mezi buňkami, které podstoupily EMT a buňkami ostatními (30).

V konečné fázi musí všechny diseminované buňky vyvinout co nejvíce úsilí k přežití v lymfatickém nebo krevním řečišti. V této fázi se uplatňují hlavně krevní destičky, které mohou nádorové buňky uchránit od smykových sil posunu v řečišti, buněčné lýzy řízené NK buňkami (NK cells) nebo naopak umožnit extravazaci do vzdálených ložisek (31). V klinickém kontextu je vysoká hladina krevních destiček spojena s kratším přežitím u řady maligních onemocnění včetně karcinomu prsu, plic nebo kolorektálního karcinomu. Za zmínku také stojí, že antikoagulační léčba byla spojena s redukcí metastatického postižení (32).

## 2.2.4. Role nádorového mikroprostředí

Nádorové léze nejsou tvořeny pouze maligními buňkami, ale jedná se o komplexní systém zahrnující také endoteliální buňky, které vytváří krevní a lymfatické cévy, pericyty, stromální fibroblasty a buňky kostní dřene, jako jsou makrofágy, neutrofilové, žírné buňky a mesenchymální kmenové buňky (33). Řada růstových faktorů se významně podílí na EMT. Jedná se hlavně o TGF- $\beta$ , EGF, hepatocytární (HGF), fibroblastový (FGF) a insulinu – podobný (IGF) růstový faktor. Tyto faktory spolu s interleukinem 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) také řídí kolektivní buněčnou invazi. Význam TGF- $\beta$  pro nádorovou progresi je zcela zásadní a zahrnuje a) indukci EMT, b) růst myofibroblastů, c) tvorbu autokrinních mitogenů, například od destiček odvozeného růstového faktoru (PDGF), d) omezení imunitního systému ovlivněním CD8<sup>+</sup> T-buněk (18). U kostních metastáz hraje TGF- $\beta$  také zásadní roli, a to stimulací produkce proteinu asociovaného s parathormonem, IL-11 a růstovými faktory CTC (34). Tyto faktory stimulují osteoblasty k uvolnění RANKL, čímž dochází k mobilizaci osteoklastů k zahájení a následnému udržení osteolytického procesu a růstu kostních metastáz.

Součástí nádorového mikroprostředí jsou také již dříve zmíněné MMP. Jejich zvýšená exprese je přítomna prakticky u všech typů nádorů a je spojena s buněčnou proliferací, migrací, angiogenezí, metastazováním a zhoršením přežití. Jsou produkovány nádorovými buňkami, myofibroblasty a prakticky všemi buňkami imunitního systému. Jejich funkcí je a) destrukce molekul buněčné adheze (například E-cadherinu), b) degradace proteinů ECM, c) aktivace cytokinů a růstových faktorů, d) regulace zánětlivého procesu a e) vytvoření podmínek pro metastatické usazení (35).

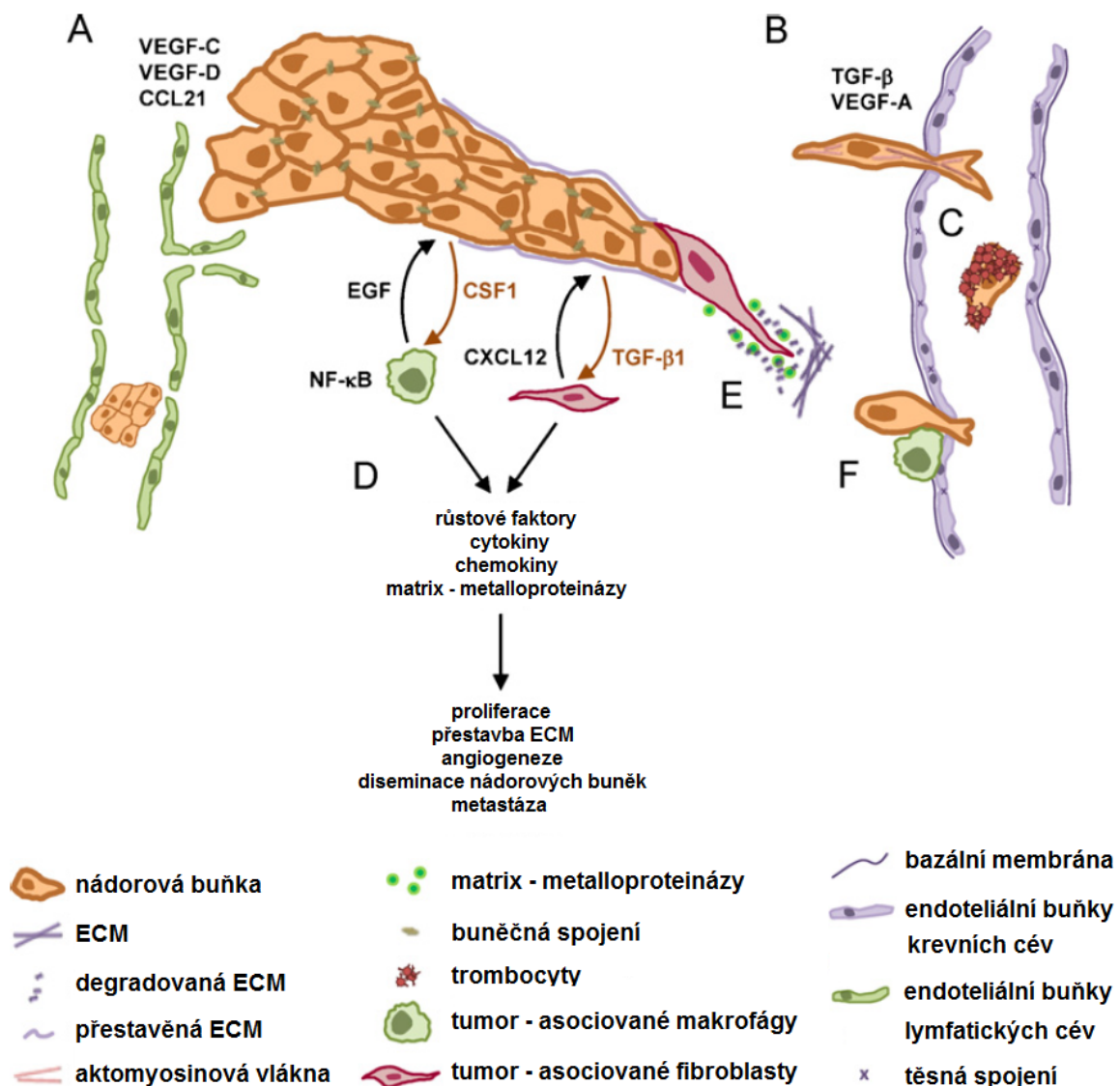
Mezi další složku nádorového mikroprostředí patří fibroblasty, které produkují MMP, cytokiny (například IL-8 a VEGF) a chemokiny. Tímto podporují buněčnou proliferaci a invazi a neoangiogenezi. Navíc mohou fibroblasty vytvořit invazivní kanály v endotelu, kterými mohou nádorové buňky pronikat a zachovat si své epiteliální vlastnosti (36).

V neposlední řadě se na metastatickém procesu podílí složky imunitního systému. Původně uvažovaná obranná role systému byla v řadě studií vyvrácena a dnes se imunitní systém považuje za jeden z hlavních promotérů nádorového růstu. Je také prokázáno, že chronická infekce a zánět vedou ke vzniku nádorů a urychlení jejich progresu. Například u chronické infekce virem hepatitidy B nebo C byly dobře popsány faktory pro vznik chronického zánětu jater a následného hepatocelulárního karcinomu (37). Exprese cytokinů

(IL-1, IL-6, tumor-necrosis factor – TNF) a RANKL způsobuje zánět a indukuje diseminaci nádorových buněk. Makrofágy mohou produkovat růstové faktory a enzymy degradující matrix, a tak potencovat angiogenezi, buněčnou invazi a hematogenní intravazaci. Nádorové buňky pak produkují CSF1, který je hlavním mediátorem invaze CSF1 pozitivních makrofágů. Při využití této parakrinně cytokininní smyčky bylo prokázáno, že nádorově asociované makrofágy přímo umožňují hematogenní diseminaci buněk karcinomu prsu, která je dále podpořena sekrecí proteáz jak z maligních buněk, tak z makrofágů (38). Makrofágy navíc přispívají k remodelaci ECM sekrecí MMP a cysteinových kathepsinů a serinových proteáz.

Role nádorového mikroprostředí je zásadní pro progresi maligního onemocnění a nevyhnutelně jde za hranice primárního tumoru. Vracíme se tak k původnímu konceptu „seed and soil“. Příprava půdy („soil“) jako předpokládaného místa metastatického umístění je nepochybně pod taktovkou nádorového mikroprostředí. Metastatické nádorové buňky nesou vlastní faktory z primárního nádoru charakterizující *a priori* předpokládané „soil“, jako jsou aktivované fibroblasty, endoteliální buňky a makrofágy. Tyto elementy následně umožní metastatické zakotvení v předem definovaném prostoru – definitivní „soil“. Stromální buňky pak významně přispívají ke kolonizaci nádorovými buňkami (39). U KP je známo, že metastatický proces je umožněn obejitím komunikace nádorových buněk s buňkami kostní matrix. Reálně se buňky KP váží na annexin II exprimovaný na povrchu osteoblastů v kostní dřeni, čímž dochází k expresi specifického receptoru zamezení růstu (growth arrest – specific 6 receptor [Gas6-R]) v nádorových buňkách. Tento protein produkovaný osteoblasty pak zajišťuje „spánek“ buněk KP a zabraňuje tak chemoterapií indukované apoptóze (40). Schématická role nádorového mikroprostředí je znázorněna na obrázku 5.

**Obrázek 5. Nádorové mikroprostředí a jeho vliv na transendoteliální migraci.** Pasivní migrace epitelálních nádorových buněk do lymfatických cév může nastat skrz mezibuněčné prostory. Aktivní migrace lymfatických endoteliálních buněk je řízena sekrecí VEGF nebo ligandu chemokinů 21 (CCL21) (A). Epiteliálně – mesenchymální transformace indukovaná TGF-β a VEGF-A vede k hematogenní diseminaci (B). V krevním řečišti využívají nádorové buňky trombocyty jako obranu proti fyzikálním silám a NK-buňkám (C). Tumor – asociované makrofágy a fibroblasty produkují řadu látek, které stimulují nádorovou progresi (D). Tumor – asociované fibroblasty navíc narušují ECM a vytváří tak cestu pro migraci epitelálních buněk (E). V těsném kontaktu s nádorovými buňkami jsou makrofágy schopné také iniciovat hematogenní trans migraci (F) (podle 18)



### 3. CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY

Cirkulující nádorové buňky jsou takové buňky, které pronikly do krevního nebo lymfatického řečiště a mohou se tak přemísťovat do vzdálených míst od primárního tumoru. Invaze do cév je možná po změně vlastností původně epiteliální buňky, nejčastěji mechanismem EMT (kapitola 2.2.1.). Jednotlivé mechanismy následné invaze jsou popsány v kapitole 2.2.2. Po vstupu do cév je průměrný poločas přežití CTC pouze v řádu hodin (41).

#### 3.1. Typy cirkulujících nádorových buněk

Životaschopné CTC je možné rozdělit na tzv. klasické CTC, které mají neporušené buněčné jádro, na svém povrchu exprimují cytokeratiny, které potvrzují epiteliální původ a neexprimují membránový antigen CD45, který naopak definuje hematopoetické buňky. Jedná se také často o větší buňky s nepravidelným tvarem a větším karyocytoplasmatickým poměrem ve srovnání s nenádorovými buňkami. Při imunohistochemickém barvení jsou u pokročilejších nádorových (tj. CTC) buněk ve srovnání s primárním tumorem také více zvýrazněny membrány jak samotné buňky, tak i buněčného jádra (obrázek 6) (42).

Dalším typem jsou cytokeratin–negativní CTC (CK<sup>-</sup> CTC). Jedná se buď o nádorové kmenové buňky, které si zachovávají určité vlastnosti buněk kmenových (schopnost proliferaci a změny na jiný typ nádorové buňky v daném nádoru), nebo o buňky, u kterých proběhla EMT. Tyto buňky neexprimují cytokeratiny ani CD45, jejich morfologie i genový profil odpovídají původním nádorovým buňkám. Zdá se také, že například u karcinomu prsu je přítomnost CK<sup>-</sup> CTC spojena s pokročilejším stádiem onemocnění a významně kratším nádorově specifickým i celkovým přežitím (43).

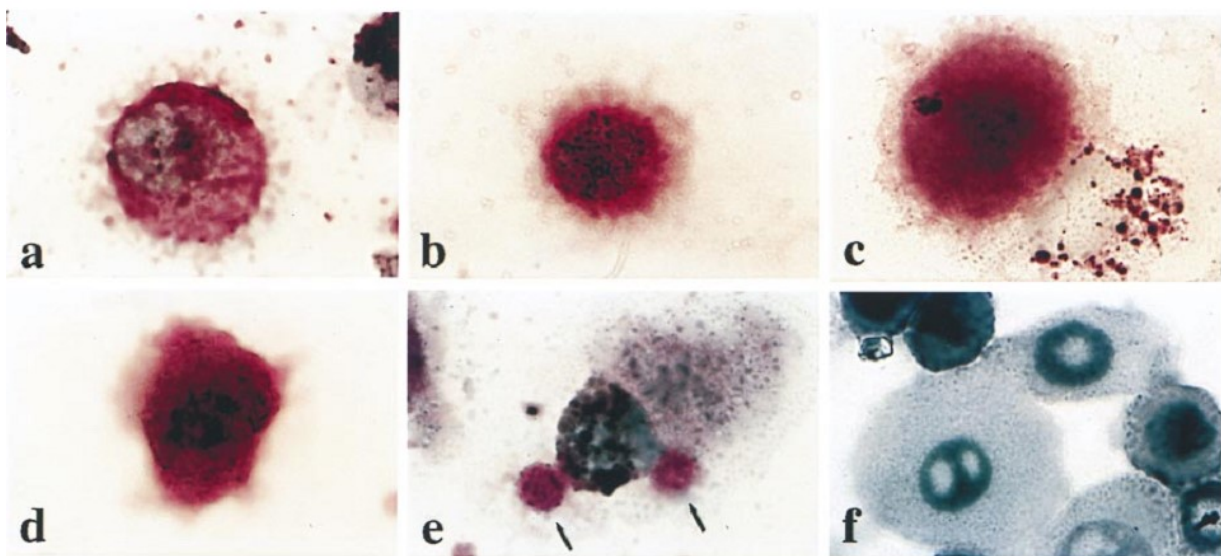
Většina CTC v řečišti však podstoupí proces apoptózy. Tyto buňky zpravidla neexprimují nukleární protein Ki-67, který je spojen s buněčnou proliferací a jehož absence zkracuje životnost CTC. Nejsou také detekovatelné metodami, které využívají vazbu protilátek na povrchové antigeny (např. CellSearch<sup>TM</sup>), protože v důsledku apoptózy není stěna buňky zachována. Je však možné stanovit DNA nebo RNA, které nejsou vázané na buňky (cell-free DNA/RNA).

Určitá část buněk, které neexprimují Ki-67, se nedělí a je označována jako tzv. spící (dormantní). Dormantní nádorové buňky jsou pravděpodobně jednou z hlavních příčin pozdních relapsů i několik let po úspěšné léčbě primárního tumoru, které se vyskytují prakticky u všech maligních nádorů. Dormantní nádorové buňky úspěšně přežívají díky ztrátě



exprese antigenů a/nebo prezentací faktorů, které blokují protinádorové akce imunitního systému. Kostní dřeň je pak hlavním orgánem, ve kterém dormantní nádorové buňky přežívají (44).

**Obrázek 6. Exprese cytokeratinu a glykoproteinu Muc-1 na cirkulujících nádorových buňkách karcinomu prsu a prostaty (KP).** Buňka karcinomu prsu obarvená protilátkou anti-mucin-1 (a). Jiná buňka stejné pacientky obarvená na cytokeratiny 5, 6, 8 a 18 (b). Buňka barvená na cytokeratin u pacientky s lokalizovaným karcinomem prsu (c). Buňka barvená na cytokeratin u pacienta s lokalizovaným KP (d). Buňka karcinomu prsu s obarvenými apoptotickými tělísky připojená k makrofágu (e). Normální epitelová buňka z předkožky barvená anti-mucinem-1 (f) (podle 42)



### 3.2. Molekulární vlastnosti cirkulujících nádorových buněk

Molekulární charakterizace CTC představuje v současnosti velké téma pro výzkum kancerogeneze, EMT a metastatického procesu, ale také pro vývoj nových diagnostických metod CTC. Z klinického hlediska pak má poznání odlišných molekulárních vlastností buněk stejného nádorového typu význam v predikci odpovědi protinádorové léčby a v odhadu prognózy vývoje nádorového onemocnění. Zjištění exprese jednotlivých molekul může mezi CTC identifikovat také kmenové nádorové buňky, které jsou považovány za důležité činitele v nádorové progresi. Molekulární charakterizace tak vychází z konceptu EMT, kdy buňka primárního tumoru ztrácí vlastnosti epitelální buňky a získává některé vlastnosti mesenchymální buňky. Současně se mění genetický profil a signální dráhy, které jsou zodpovědné za inhibici apoptózy, proliferaci a metastatické vlastnosti CTC.

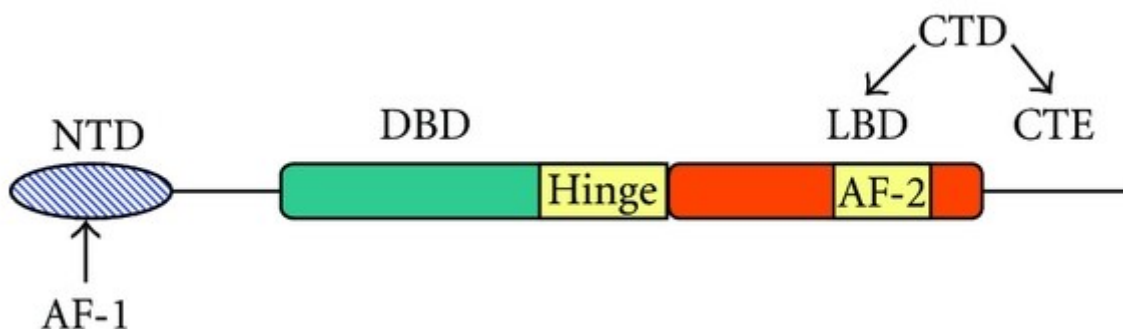
### 3.2.1. Molekulární charakterizace buněk karcinomu prostaty

V případě KP jsou u CTC stanovovány nebo zkoumány: a) epiteliální markery (cytokeratin 8, 18, 19, epithelial cell adhesion molecule – EpCAM), b) androgenní receptor (AR) a jeho varianty, c) nádorově specifické geny (KLK2/3, MSMB, DDC, HPN, fúze transmembránové proteázy, serin 2 s ETS–příbuzným genem – TMPRSS2–ERG), d) s nádorem asociované antigeny (PSA, PSMA, alfa–metylacyl–CoA racemáza – AMACR, EGFR), e) markery invazivního růstu nebo opravy DNA (basigin, angiopoietin–like 4, PARP 1/2), f) micro RNA (MIR–23, MIR–373 nebo g) změny v signální dráze PI3K/AKT/mTOR (45). Cirkulující nádorové buňky jsou detekovány na základě fluorescenčního průkazu jádra (4',6–diamidino–2–phenylindol – DAPI), cytokeratinů 8, 18 a 19 a nepřítomnosti CD45, z periferní krve jsou CTC nejčastěji separovány na základě exprese EpCAM.

### 3.2.2. Androgenní receptor a jeho varianty

Vlastnosti a mechanismus účinku AR jsou popsány v kapitole 1.2. Androgenní receptor má několik domén, které jsou zásadní pro odpověď nebo rezistenci KP k systémové léčbě, a jejichž složení a funkce jsou popsány na obrázku 7 (46).

**Obrázek 7. Struktura androgenního receptoru.** N–terminální doména (NTD) je zodpovědná za transkripční aktivitu aktivovanou ligandem (AF–1) nebo trvalou aktivitu bez ligandu (AF–5 – bez vyobrazení). DNA–vázací doména (DBD) zajišťuje vazbu na DNA v buněčném jádru. Oblast závěsu (Hinge) spojuje DNA – a ligand–vazebnou doménu. Nejdůležitější ligand–vazebná doména (LBD) obsahuje oblast zodpovědnou za agonistickou aktivitu navázaného preparátu (AF–2). C–terminální doména (CTD) je poslední z hlavních částí AR, okrajová část pak zahrnuje C–terminální extenzi (CTE) (podle 46)



Je popsána celá řada variant AR. Jedním z mechanismů resistance k antiandrogenem je změna na úrovni LBD, která je procesem tzv. alternativního sestřihu (salicin) celá nahrazena jiným krátkým peptidem s odlišnou funkcí. Například varianta ARV567ES působí jako stálý aktivní receptor, zvyšuje expresi AR a jeho transkripční aktivitu. V současnosti je nejvíce studována splice–varianta AR–V7, která zajišťuje buněčné přežití a je zvýšeně exprimována u CRPC. U pacientů se splice–variantou AR–V7 zjištěnou v CTC byla významně horší odpověď na léčbu novými hormonálními preparáty ve srovnání se skupinou bez této varianty. V průlomové a nejvíce citované práci bylo zařazeno celkem 71 pacientů s CRPC léčených abirateronem (n=36) nebo enzalutamidem (n=35). Cirkulující nádorové buňky nebyly zjištěny celkem u devíti pacientů. Pouze šest z 31 (19 %) pacientů ve skupině s abirateronem a 12 z 31 (39 %) pacientů mělo zjištěnou splice–variantu AR–V7. Odpověď PSA byla nulová ve skupině AR–V<sup>+</sup> jak u léčby abirateronem (0 vs. 68 %), tak i enzalutamidem (0 vs. 53 %). Přežití bez progresu PSA, klinické nebo radiografické progresu a předběžně i délka celkového přežití byly vždy statisticky delší u pacientů bez splice–varianty AR–V7 (47). Tato práce je ukázkou možného využití CTC v personalizované léčbě KP, ověření výsledků však bude vyžadovat robustní data z randomizovaných studií. V současnosti tak přítomnost AR–V7 není rutinně testována.

### 3.2.3. S nádorem spojené antigeny

Další relativně dobře prozkoumanou skupinou molekul jsou antigeny spojené přímo s KP. Jedná se buď o markery spjaté výlučně s KP (PSA, PSMA), tkáňové markery (AMACR) nebo faktory spojené jak s činností benigních prostatických žlázek, tak i kancerogenezi (EGFR). Prostatický specifický antigen je markér nejdéle používaný pro diagnostiku KP. Jedná se také o markér, který je ve vysokých koncentracích přítomen pouze ve spermatu a prostatické tkáni, v minimálním množství pak ale také v aminové tekutině, mateřském mléku nebo séru či moči u žen (48). V případě nejasností je možné PSA využít pro imunohistochemické zhodnocení metastatického ložiska neznámého původu. Ve vztahu k CRPC je PSA jedním z prognostických parametrů stran přežití, ačkoliv zde ne tak významným, jako v případě primární diagnózy nebo relapsu onemocnění po radikální léčbě. Postavení PSA v detekci CTC je paradoxně spíše okrajové, uplatňuje se u metod založených na polymerázové řetězové reakci (polymerase chain reaction – PCR), pomocí které jsou stanoveny různé mRNA markery lyzovaných CTC.

Prostatický specifický membránový antigen (glutamát–karboxypeptidáza II) je enzym buněčného povrchu, který katalyzuje hydrolýzu N–acetylaspartylglutamátu na glutamát a N–acetylaspartát. Tento protein je více než stonásobně více exprimován v prostatické tkáni, fyziologicky je přítomen také v buňkách tenkého střeva, proximálního renálního tubulu a slinných a slzných žláz. V centrální nervové soustavě se významně podílí na katalýze neurotransmiterů. Z nádorových diagnóz je kromě KP PSMA zvýšeně exprimováno u nádorů štítné žlázy a v neovaskulatuře hlavně karcinomu ledvin, prsu nebo tlustého střeva. V případě KP bylo opakovaně potvrzeno, že exprese PSMA je relativně vyšší u méně diferenciovaných, metastatických a kastroresistentních tumorů. Úroveň exprese PSMA je tak významně spojena s prognózou onemocnění. Specificita PSMA hraje v současnosti velkou roli v zobrazovacích metodách a léčbě pokročilého KP. Pozitronová emisní tomografie (PET) v kombinaci s CT, která využívá vazbu radionuklidu galia na PSMA ( $^{68}\text{Ga}$ –PET/CT), je aktuálně nejcitlivější komerční metodou pro detekci metastatického postižení nebo lokální recidivy KP. Nahrazení galia radioaktivním luteciem–177 umožňuje systémové podání radiofarmaka, jehož působení ale probíhá na buněčné úrovni. Jedná se o koncept tzv. teranostiky, tedy kombinaci diagnostických metod (pacient je nejprve vyšetřen na přítomnost metastáz pomocí  $^{68}\text{Ga}$ –PET/CT) a protinádorové terapie (poté je aplikována značená malá molekula  $^{177}\text{Lu}$ –PSMA–617). Nyní jsou k dispozici výsledky prvních studií u pacientů s CRPC a vyčerpanou předchozí léčbou (49).

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR; HER) je transmembránový protein, který slouží jako receptor pro skupinu epidermálních růstových faktorů a dalších extracelulárních ligandů. Rodina EGFR se skládá ze čtyř membránových receptorů s aktivitou tyrosinkinázy: EGFR (ErbB1, Her1), ErbB2 (Her2), ErbB3 (Her3) a ErbB4 (Her4). Zvýšená exprese těchto receptorů se vyskytuje u mnoha nádorů, včetně maligních novotvarů hlavy a krku, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu tlustého střeva, děložního hrdla, prsu, vaječníků, žaludku, pankreatu a v neposlední řadě u KP. Zvýšená exprese a poruchy v inhibici EGFR vedou k nádorové progresi prostřednictvím aktivace signálních drah zodpovědných za proliferaci a diferenciaci buněk, potlačení apoptózy a rozvojem metastáz a angiogeneze. Exprese EGFR je spojena s pokročilejším onemocněním v době diagnózy a je nepříznivým prognostickým faktorem. V klinické praxi se stále častěji používají léky, které ovlivňují aktivitu EGFR. Jedná se například o EGFR blokuující monoklonální protilátky (cetuximab) nebo inhibitory EGFR tyrosinkinázy v několika generacích (gefitinib, erlotinib, trastuzumab, lapatinib) (50). Využití EGFR u detekce CTC v případě KP nespočívá pouze ve stanovení

hladiny transkriptů mRNA lyzovaných buněk pomocí PCR, jak je tomu u PSA nebo PSMA, ale také v prvotním kroku, kterým je imunomagnetická separace EpCAM nebo EGFR2 (HER2) pozitivních CTC.

### 3.3. Metody izolace a detekce cirkulujících nádorových buněk

Detekce CTC představuje slibnou metodu hodnocení predikce (odpověď na léčebný postup) a prognózy (předpověď nádorově specifického nebo celkového přežití) u řady nádorových onemocnění. Na rozdíl od histologické verifikace se jedná o relativně neinvazivní metodu, protože vyžaduje pouze odběr periferní krve. Hlavní přínos stanovení CTC spočívá v tom, že je možné jej provádět opakovaně s malým rizikem nežádoucích účinků, čímž je umožněno dynamické sledování vývoje nemoci a odpovědi na její léčbu. Mezi hlavní úskalí všech metod detekce CTC patří primárně velmi nízká koncentrace těchto buněk v periferní krvi, odhadem se jedná o jednu CTC na deset milionů bílých krvinek. Extrémně nízká koncentrace pak představuje výzvu pro jejich detekci a charakterizaci, což je často přirovnáváno k hledání jehly v kupce sena (51). Množství CTC v krvi odpovídá tzv. Poissonově distribuci. Jedná se o náhodnou veličinu, která vyjadřuje počet výskytů jevů (CTC) v určitém intervalu, zde v objemu odebrané krve. Tento jev (výskyt CTC) pak nastává nezávisle na sobě. Zvýšení záchytu CTC tedy není možné přidáním většího množství identifikátorů (například povrchových antigenů) nebo vylepšením metody (například kvalitnější laser v případě „fiber-optic array scanning“ technologie). Zvýšení detekce CTC je tak dáno pouze zvýšením množství odebrané krve, s čímž je nutné počítat již primárně při volbě metody detekce, a především v případě časných stádií onemocnění (52).

V posledních letech se objevila řada metod detekce CTC, které je možné rozdělit do tří hlavních skupin. Jedná se za prvé o pozitivní selekci, tj. výběr buněk, které mají zásadně odlišné vlastnosti od ostatních buněk periferní krve, například leukocytů. Tato strategie využívá k izolaci buněk jejich fyzikální vlastnosti (velikost, hustota, elektrický náboj) nebo expresi specifických povrchových markerů, které jsou unikátní pro CTC. Druhou možností je negativní selekce, která identifikuje a poté odstraňuje buňky, které mají fyzikální nebo molekulární vlastnosti leukocytů nebo jiných buněk periferní krve. Třetí skupinu zahrnují metody, které využívají tzv. zobrazení při vysoké propustnosti (high-throughput imaging) jako například „imaging flow cytometry“ nebo tzv. „bulk“ metody (filtrace podle velikosti, mikročipy s antigeny, frakcionace průtoku s hydrodynamickou filtrací buněk aj.). Většina

technologií pro specifickou detekci CTC využívá kombinace dvou kroků: obohacení (enrichment) a detekci CTC (51).

### 3.3.1. Metody využívané pro obohacení a charakterizaci cirkulujících nádorových buněk

Metody pozitivní i negativní selekce spoléhají na rozdílné vlastnosti CTC a ostatních buněk v periferní krvi. Tyto vlastnosti lze rozdělit do tří hlavních skupin: fyzikální, biologické (molekulární) a funkční.

#### 3.3.1.1. Pozitivní selekce na základě fyzikálních vlastností cirkulujících nádorových buněk

Hlavní výhodou metod, které využívají fyzikálních vlastností buněk, je to, že můžeme získat životaschopné buňky, protože nedochází k jejich označení a narušení buněčného povrchu. Nejčastěji využívanou metodou je separace CTC na základě rozdílné velikosti buněk. Vychází ze základní premisy, že z epitelu odvozené buňky jsou větší než všechny ostatní krevní buňky. Tento fakt je bohužel z velké míry založen na měření velikosti v buněčných liniích, a ne na reálných lidských CTC. Ukazuje se totiž, že mnoho CTC ve vzorcích od pacientů se velikostí přibližuje k leukocytům. Přítomnost tzv. malých CTC může být navíc spojena s horší prognózou onemocnění. Odhaduje se, že na základě jednostupňové selekce podle velikosti může být ztraceno 20–50 % CTC (53). Jedním z řešení tohoto problému může být technologie selektivní amplifikace velikosti, při které jsou CTC uměle zvětšeny pomocí 3 $\mu$ m velkých mikrokuliček konjugovaných s anti-EpCAM protilátkou. Při průchodu víceúrovňovým filtrem je tak zachyceno významně více CTC ve srovnání s běžnými metodami (54).

Další využívanou fyzikální vlastností je deformabilita. Je totiž prokázáno, že metastatické buňky (zkoumané *in vitro* i *in vivo*) jsou více deformovatelné než buňky s méně agresivním potenciálem. Příkladem technologie využívající současně selekci podle velikosti a deformabilitu je mikrofluidní čip vyvinutý společností Cellsee Diagnostics Inc. Plymouth, MI, USA. Tento systém tvoří paralelní síť mikrofluidních kanálků se 56 320 záchytnými komorami. Větší nádorové buňky jsou v těchto komorách zadrženy, zatímco menší krevní buňky, jako jsou erytrocyty a většina leukocytů (a bohužel opět tzv. malé CTC), čipem proniknou. Systém usnadňuje rychlé zachycení CTC v mikrokanálovém čipu, který může být také použit pro následnou charakterizaci zachycených buněk pomocí imunocytochemických metod nebo fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Ve srovnávací studii se systém

CellSearch™ byl počet CTC zachycených systémem Cellsee významně vyšší (94 vs 61 % CTC pozitivních vzorků). Počet CTC v jednotlivých vzorcích byl také významně vyšší, což ukazuje na větší senzitivitu systému Cellsee pro detekci CTC (55).

Gradientová centrifugace je další metodou obohacení CTC, která využívá rozdílné buněčné denzity CTC a leukocytů ve srovnání s erytrocyty. Při centrifugaci klesají buňky o vyšší denzitě (erytrocyty) v daném médiu ke dnu zkumavky, zatímco ostatní zůstávají ve vyšších vrstvách. Problém opět nastává u tzv. malých CTC, které mají denzitu často srovnatelnou nebo i vyšší než erytrocyty.

Separace na základě povrchového náboje využívá faktu, že nádorové buňky mají negativnější povrchový náboj nebo elektrokinetický potenciál (zeta potenciál) než leukocyty. Problém této metody je v tom, že často dochází k překryvu zeta potenciálu CTC a leukocytů, což vede ke kontaminaci obohacené frakce CTC právě leukocyty. Zástupcem této metody je například technologie ApoStream (ApoCell, Houston, TX, USA). U metastatického KP zachytil ApoStream CTC ve všech případech ve srovnání se 75% záchytem pomocí CellSearch™, navíc počet zachycených CTC byl signifikantně vyšší v případě analýzy technologií ApoStream ( $p=0,0027$ ) (56).

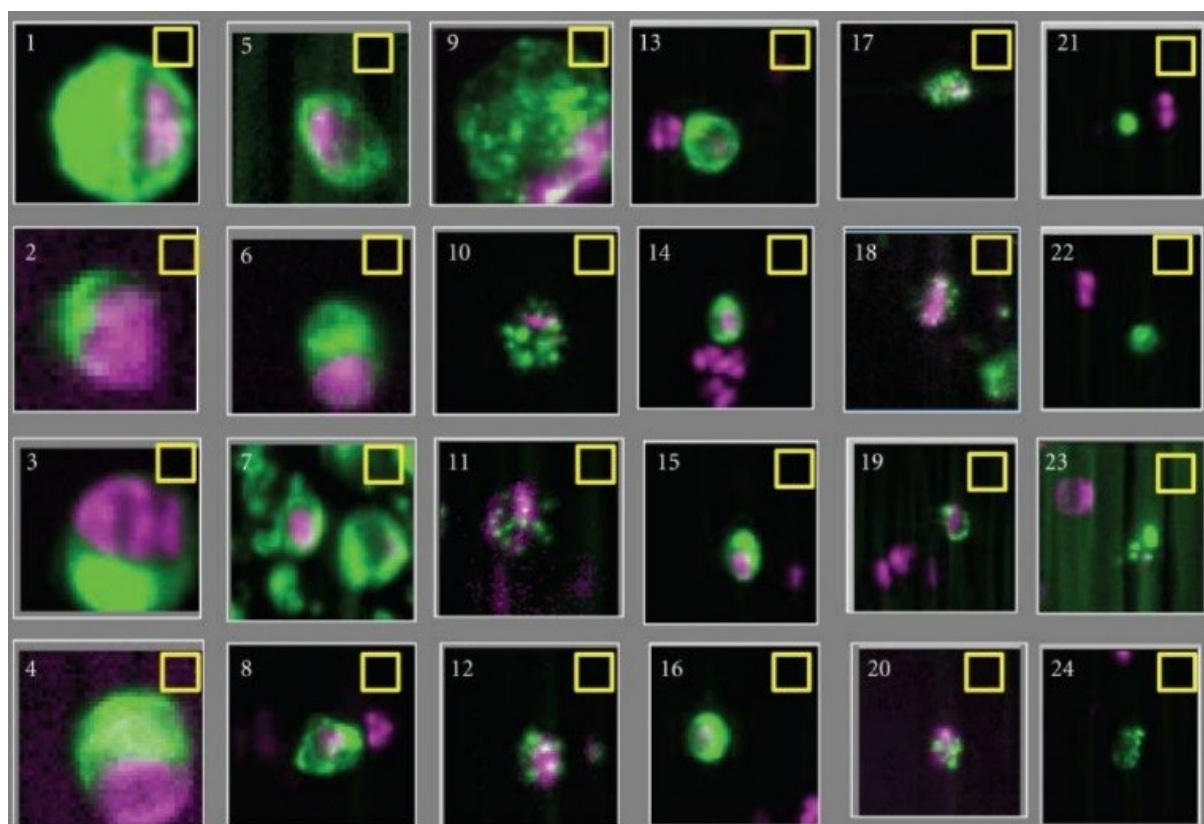
### **3.3.1.2. Pozitivní selekce na základě molekulárních vlastností cirkulujících nádorových buněk**

Velkou skupinu metod představuje imunomagnetická separace, která využívá imunitní reakci založenou na vytvoření vazby mezi specifickou protilátkou a tumor–asociovanými antigeny nebo antigeny epiteliálního původu (pozitivní selekce) nebo povrchovými antigeny leukocytů CD45 (negativní selekce). Běžně je k obohacení epiteliálních CTC využíván epiteliální povrchový antigen EpCAM. K obohacení určitých CTC lze také použít vazbu protilátky na mesenchymální antigeny, například na N–cadherin.

Nejčastěji užívanou metodou pozitivní selekce epiteliálních buněk je systém CellSearch™ (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ, USA). Jedná se také v současnosti stále o jedinou metodu, která získala povolení amerického úřadu Food and Drug Administration (FDA) pro vyšetřování CTC. Esej obohacuje CTC na základě vazby protilátky proti EpCAM konjugované k magnetické kuličce. Buňky jsou dále klasifikovány jako CTC pomocí barvení cytokeratinu (CK–6, 8 a 18), zobrazení jádra DAPI a vyloučení leukocytů (barvení CD45). Buňky jsou v magnetické kazetě rozvrstveny, aby nedocházelo k jejich překrývání. Automatický systém CellTracks Analyzer® poté provede sken kazety, identifikuje možné

nádorové buňky a jejich vyobrazení nabídne laboratornímu technikovi (event. patologovi) ke konečné revizi na základě přesně definovaných morfologických kritérií. Výsledek je poskytnut jako počet CTC v 7,5 ml plné krve. Buňky u pacientů s CRPC detekované touto metodou mají řadu charakteristických znaků. Jedná se hlavně o expresi PSA, AMACR a další specifické genomické abnormality, především nárůst kopií genů pro androgenní receptor, delecí genu PTEN (phosphatase and tensin homolog) a fúzi TMPRSS2–ERG. Úskalím metody je fakt, že buňky zobrazené v kazetě představují pouze asi 1–10 % všech CTC (57). CellSearch™ totiž nedokáže identifikovat buněčné fragmenty ani bezjaderné nebo nekrotické buňky. Některé CTC navíc neexprimují EpCAM molekulu, a nejsou tak vychytávány. Významným problémem může být chyba v hodnocení, neboť ve sporných případech je označení CTC závislé na úsudku operátora (obrázek 8). V současnosti se nicméně jedná o nejčastěji používanou metodu, která se díky své relativní jednoduchosti a semiautomatickému postupu stala rutinní součástí řady klinických studií u pacientů nejen s CRPC.

**Obrázek 8. Zobrazení možných cirkulujících nádorových buněk pomocí semiautomatického systému CellTracks Analyzer II®. Jasně pozitivní jsou č. 1–10 a 13–17, jasně negativní č. 20–24. U zbylých objektů nebyla při hodnocení šesti operátory absolutní shoda (podle 67)**





AdnaTest (Adnagen GmbH, Langenhagen, Německo) je metoda, která kombinuje imunomagnetické obohacení epiteliálních buněk pomocí protilátek proti EpCAM a PCR detekci specifických nádorových transkriptů. V současnosti jsou v nabídce produktů společnosti soupravy na stanovení CTC u karcinomu prsu, prostaty, ovaria a kolorektálního karcinomu a několik testů na obohacení kmenových buněk. V případě KP (souprava Prostate Cancer Select / Detect je pomocí PCR hodnocena amplifikace genů pro PSMA, PSA, EGFR, AR a kontrolního genu aktinu. Vzorek je pozitivní pro CTC, pokud je detekován alespoň jeden ze stanovovaných PCR produktů v koncentračním rozmezí (58). Tato metoda byla dále modifikována pro komerční stanovení splice-varianty AR-V7 (kapitola 3.2.2.). Metodu AdnaTest jsme použili pro obohacení a stanovení CTC v našem výzkumném záměru a podrobně bude popsána v metodice projektu.

Mezi nemagnetické metody, které využívají povrchové markery epiteliálních buněk, patří celá řada mikrofluidních zařízení. Jedna z často publikovaných metod je „CTC-čip“, který se skládá z 78 000 mikroskopických ostrůvků osazených protilátkou proti EpCAM. Při průtoku krve čipem jsou CTC exprimující EpCAM na těchto ostrůvcích zachyceny. V nové generaci CTC-čipu jsou mikrofluidní kanálky poskládány do struktury rybí kosti. Mikroskopické drážky pak způsobují vznik mikroskopických vírů, které prodlužují kontakt krve s povrchem kanálků a zvyšují tak záchyt CTC. Ty jsou následně barveny, zobrazeny a analyzovány přímo v přístroji. Výhodou této metody je to, že pro obohacení CTC může být použito velké množství různých specifických antigenů. Nejnovější generace CTC-čipů využívá vazby protilátky na zlacené nanočástičky místo na plochý povrch kanálků, čímž je mimo jiné vlastnosti dále zvětšena kontaktní plocha s krví, a ještě více navýšen záchyt CTC (59).

### **3.3.1.3. Negativní selekce na základě molekulárních vlastností ostatních krevních buněk**

Odlišným přístupem k obohacení CTC je odstranění převažujících leukocytů použitím protilátek proti antigenům na jejich povrchu, například CD45 nebo CD66b. Úskalím tohoto postupu je fakt, že ne všechny jaderné buňky CD45/CD66b exprimují. U zdravých jedinců se totiž v cirkulaci vyskytují CD45 negativní epiteliální buňky. Pravděpodobně ještě významnější limitace deplečních metod je vysoké riziko ztráty CTC v důsledku tzv. nespecifického bulk-efektu (ztráta relativně vzácných CTC zachycených v odstraňovaných masách leukocytů). Běžně užívaná strategie je selekce leukocytů pomocí anti-CD45 protilátek konjugovaných k magnetickým kuličkám. Leukocyty jsou pak odstraněny

umístěním krevního vzorku do magnetického pole. Mezi diagnostické kity patří například EasySep™ Human CD45 Depletion Kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), MACS® CD45 MicroBeads (Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Německo) nebo Dynabeads® CD45 (ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) (51).

Depleční metody však nejsou založeny pouze na imunomagnetické separaci. Jedním z názorných příkladů je metoda RosetteSep (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada). Tato metoda kombinuje separaci na základě hustoty buněk s obohacením pomocí protilátky. Obohacení je provedeno pomocí negativní selekce a nechtěné buňky jsou vybrány pomocí protilátkového komplexu rozpoznávajícího CD45 a CD66b na leukocytech a glykoforin A na erythrocytech. Po centrifugaci se CD45/CD66b pozitivní buňky shromáždí v nižších úrovních média a CD45/CD66b negativní mononukleární buňky a CTC zůstávají jako obohacená populace mezi plazmou a použitým médiem (60).

#### **3.3.1.4. Metody bez pozitivní nebo negativní selekce**

Tzv. „selection-free“ metody využívají různých úrovní míry exprese molekuly EpCAM na povrchu CTC. Výhodou je fakt, že prakticky nedochází ke ztrátě CTC. Nicméně také u těchto metod se řeší různé technologické problémy, především při spoléhání se na stále nedokonalé molekulární markery pro rozlišení CTC od leukocytů.

Průtoková cytometrie byla jednou z prvních metod pro detekci CTC v plné krvi. Technologie spočívá v označení CTC vazbou specifických protilátek s fluoroforem na povrchové molekuly CTC. V analyzátoru je krev vedena tenkou kapilárou, která v daném čase umožňuje průchod detekčním místem pouze jedné buňce. V místě detekce dochází k excitaci fluorochromu laserovým paprskem a emisi části absorbovaného světla o vlnové délce odlišné od původního impulsu. Výhodou této metody je možnost tzv. multiparametrické detekce za využití většího množství markerů, fluorochromů a laserů o různých vlnových délkách. Další možností je fluorescencí aktivované třídění buněk (Fluorescence-activated cell sorting – FACS). Jedná se o třídění označených a neoznačených buněk v elektromagnetickém poli na základě odlišného elektrického náboje, který je na CTC aplikován bezprostředně po laserovém výboji. Nevýhodou průtokové cytometrie je nutnost udržování extrémně tenkého proudu tekutiny, což může vést k ucpání mikrokapilár nebo shlukování buněk. Jelikož je pro následnou charakterizaci CTC potřeba relativně velké množství buněk, jedná se tak o metodu časově i finančně náročnou, nehledě na možnost poškození buněk při dlouhém skladování do ukončení analýzy (61).

Vysokorychlostní mikroskopie (high-throughput microscopy) umožňuje skenování stovek milionů krevních buněk bez ztráty CTC způsobené vybranými markery, což výrazně zvyšuje senzitivitu této metody. Příkladem je technologie společnosti Epic Sciences (San Diego, Ca, USA). Po lýze erytrocytů jsou všechny jaderné buňky obarveny pomocí imunofluorescence a analyzovány speciálními fluorescenčními skenery. Ty využívají technologii skenování pomocí optických vláken (Fiber-Optic Array Scanning Technology – FAST), která dokáže zachytit označené buňky až 500x rychleji než automatický digitální mikroskop, navíc s vyšší specificitou. Technologie také zkracuje expoziční čas a zvětšuje plochu vyšetřovaného pole. Opakovaně se objevují publikace o vyšším zachytu CTC ve srovnání s metodou CellSearch<sup>TM</sup> (62). Přelomovým důkazem efektivity technologie Epic je práce amerických autorů, kteří hodnotili vzorky celkem 13 pacientů s KP neuroendokrinního fenotypu nebo atypického CRPC. Platforma Epic byla pozitivní pro všechny vzorky ( $\geq 5$  CTC/7,5ml krve), zatímco metoda CellSearch<sup>TM</sup> pouze pro pět pozitivních vzorků (63). Tato technologie také v současnosti umožňuje komerční stanovení splice-varianty androgenního receptoru AR-V7 (Oncotype DX AR-V Nucleus Detect, Genomic Health, Redwood City, CA, USA)

Metoda PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR) je často užívaná „bulk“ metoda pro detekci CTC. Ukazuje se, že RT-PCR má vyšší senzitivitu než imunohistochemie. Nevýhodou je jiná metodika hodnocení přítomnosti CTC, neboť výsledkem je hladina specifických transkriptů z lyzovaných buněk, jejichž genová exprese se ale může mezi jednotlivými buňkami stejného fenotypu lišit. Absolutní počet CTC je tak buď pouze odhadnut nebo není vůbec stanoven, což brání srovnání s jinými metodami. Novinkou v oblasti RT-PCR je tzv. kapková digitální PCR (droplet digital PCR – ddPCR, Droplet Digital<sup>TM</sup> PCR, BioRad, Hercules, CA, USA). Tato metoda umožňuje detekci a absolutní kvantifikaci DNA primerů u relativně malého množství původních zdrojů genetické informace, bez nutnosti vysokého množství dalších replikací. Testovaný vzorek je v olejově-vodní emulzi rozdělen do 20000 kapek a amplifikace specifických molekul probíhá v každé kapce zvlášť (64).

### **3.3.2. Markery používané pro detekci cirkulujících nádorových buněk**

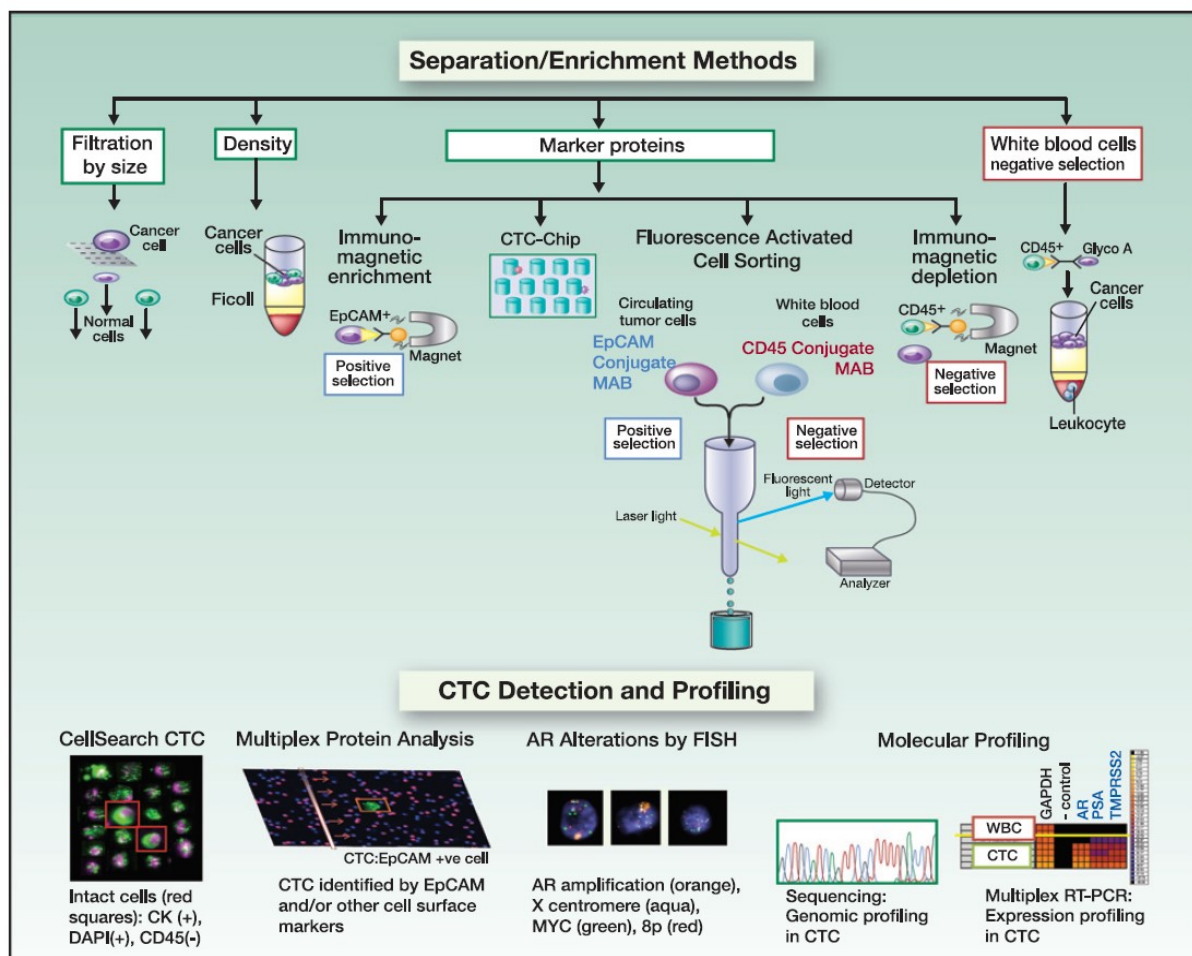
Ideální marker je exprimován na všech CTC a na žádných jiných krevních elementech. Exprese by měla být neměnná v celém průběhu onemocnění. Na obarvení buněčného jádra je nejčastěji používán DAPI jako fluorescenční barvivo, které se váže na oblasti DNA bohaté na

alanin–threonin. Může procházet přes intaktní buněčnou membránu, a proto je možné je použít pro barvení živých i fixovaných buněk (65). Mezi další fluorescenční barviva DNA patří antrachinony (DRAQ5<sup>TM</sup>, DRAQ7<sup>TM</sup>). CyTRAK Orange<sup>TM</sup> barví preferenčně jádro, ale definuje také oblast cytoplazmy.

Opačné barvení („counterstain“) se používá pro označení jiných buněk než CTC, tj. leukocytů, erytrocytů, endoteliálních a hematopoetické buněk. Erytrocyty mohou být detekovány například vazbou barviva na transmembránový protein glykoforin A. Většinou ale barvení není třeba, protože jsou erytrocyty lyzovány nebo odstraněny už při izolaci CTC. Pro označení leukocytů je typicky využíván markér CD45 (proteinová fosfatáza), ale užitečné mohou být i další markery, například CD66b (pro označení granulocytů), CD34 (povrchový glykoprotein kmenových a progenitorových hematopoetických buněk) a CD11b nebo CD14 (exprimované na makrofázích).

Nejpoužívanějšími markery pro diferenciaci epiteliálních buněk jsou povrchové molekuly EpCAM a cytokeratiny. Protilátky proti těmto markerům tvoří základ většiny selekčních kitů. Poslední skupinou jsou nádorově specifické markery, které by ideálně měly být exprimovány řádově více nebo zcela exkluzivně pouze u nádorových buněk. Bohužel ale v řadě případů dochází ke změnám exprese při dediferenciaci CTC v pokročilých fázích onemocnění. Mezi markery specifické pro KP patří například PSA, PSMA nebo androgenní receptor (51).

**Obrázek 9. Hlavní metody obohacení a charakterizace cirkulujících nádorových buněk (podle 57)**



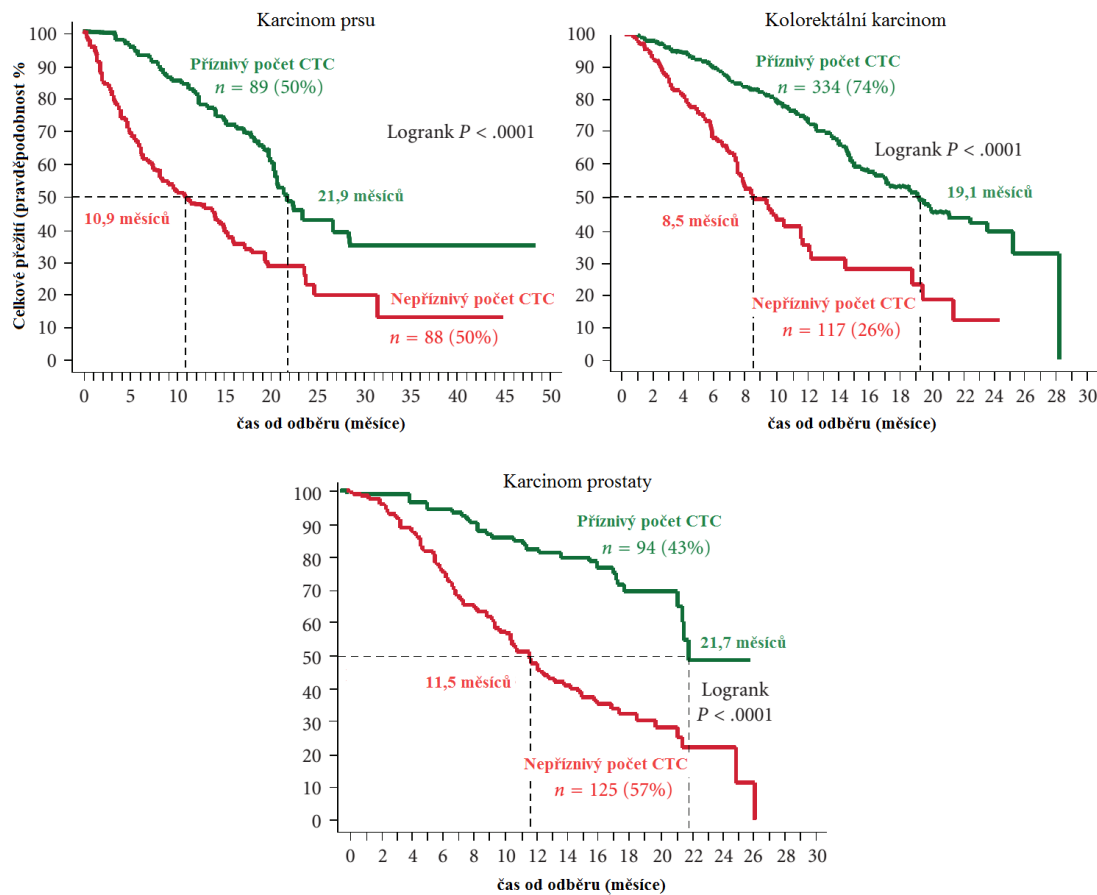
### 3.4. Klinické využití cirkulujících nádorových buněk

Detekce CTC má zásadní význam pro primární výzkum léčby pokročilého karcinomu prostaty. Vyšetření CTC je také někdy nazýváno jako „liquid biopsy“, protože poskytuje informace o vlastnostech nádorových buněk v reálném čase a může být prováděna opakovaně s minimální invazivitou pro pacienta. Molekulární informace včetně exprese různých genů bude mít v budoucnosti pravděpodobně vliv na volbu první linie systémové léčby v kastročně rezistentní fázi. Obdobně vyšetření CTC například při potvrzené progresi může zjistit, u kterých genů došlo k mutaci a podle toho zvolit druhou linii léčby. Vzhledem k tomu, že metastatická ložiska jsou většinou špatně přístupná k vyšetření a odběr tkáně je spojen s relativně vysokým rizikem pro pacienta, vyšetření CTC se nejspíše stane základním postupem tzv. na míru plánované terapie (66).

### 3.4.1. Význam cirkulujících nádorových buněk u kastračně rezistentního karcinomu prostaty

Metoda CellSearch<sup>TM</sup> byla testována u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem, KP a u pacientek s karcinomem prsu ve třech multicentrických studiích, které byly publikovány souhrnně v roce 2010 (obrázek 10) (67). Na základě absolutního počtu CTC v 7,5ml periferní krve jsou stanoveny dvě skupiny s rozdílnou prognózou (nepříznivá vs. příznivá). V případě CRPC a karcinomu prsu se za nepříznivý počet považuje pět a více CTC, u kolorektálního karcinomu se jedná o tři a více CTC. Vyšší počet CTC byl prokázán u pacientů s kostními a viscerálními metastázami proti samotnému uzlinovému postižení. Počet CTC před zahájením chemoterapie také jasně koreluje s prognózou pacientů. Celkem 231 pacientů v kastračně rezistentní fázi onemocnění bylo hodnoceno před podáním chemoterapie a každý měsíc v průběhu léčby. U pacientů s pěti a více CTC byla střední doba přežití kratší než u pacientů s nižším počtem buněk (11,5 vs. 21,7 měsíců). Počet CTC také dobře koreloval s prognózou ve všech následujících odběrech. Nejlepší prognózu pak měli pacienti s příznivou hodnotou CTC ve všech odběrech (přežití > 26 měsíců). Zajímavý je fakt, že změna z původně nepříznivého na příznivý počet CTC znamená prognózu prakticky srovnatelnou s předchozí skupinou (přežití 21,3 měsíců). Předpokládá se, že monitorování CTC v průběhu nákladné a rizikové chemoterapie pomůže identifikovat ty pacienty, pro které nemá tato léčba žádný přínos.

**Obrázek 10. Celkové přežití u pacientek s karcinomem prsu a pacientů s karcinomem tlustého střeva a karcinomu prostaty. Cirkulující nádorové buňky (CTC) byly stanoveny metodou CellSearch<sup>TM</sup>. Nepříznivý počet CTC u karcinomu prsu a prostaty je  $\geq 5$  CTC / 7,5 ml periferní krve, u kolorektálního karcinomu  $\geq 3$  CTC / 7,5 ml periferní krve (podle 67)**



V současnosti se k monitoraci pacientů s CRPC využívá hlavně změny hladiny PSA, biochemická odpověď je definována jako pokles PSA nejméně o 30 % původní hodnoty. Autoři předchozí studie zhodnotili nejen prediktivní význam poklesu CTC, ale porovnali jej i s poklesem PSA. Výhodou CTC je schopnost jasně definovat prognózu již po prvním měsíci léčby, zatímco PSA je informativní až po třech měsících. Praktické využití těchto výsledků je ale stále nejasné. Je také významné, že stanovení CTC má stejný prognostický význam i pokud je uvažován počet CTC jako kontinuální proměnná bez jasně stanovené prahové hodnoty (68).

Vyšetření CTC bylo také hodnoceno v klinických studiích s novými hormonálními léky, tj. abirateronem nebo enzalutamidem. V jedné z těchto studií koreloval pokles v počtu CTC s dobou do radiografické progresy (69), zatímco v dalších studiích nebyla korelace

poklesu CTC se změnou standardních parametrů včetně změny hladiny PSA během léčby abirateronem nebo enzalutamidem patrná. Významné výsledky prezentovali Scher et al. na kongresu ASCO v roce 2011. V subanalýze registrační studie fáze III s abirateronem po docetaxelu bylo prokázáno, že přežití pacientů s příznivým počtem CTC (<5) a normální hladinou LDH bylo ve dvou letech od randomizace častější než u pacientů s vyšším počtem CTC a hladinou LDH nad horní limit (46 % vs. 2 %) (70).

Cirkulující nádorové buňky mohou také sloužit jako zástupný cíl (surrogate end–point) pro hodnocení klinických studií. Jak je výše uvedeno, předpokládá se, že změna v počtu CTC během léčby může dobře korelovat s přežitím pacientů a poskytnout tak předběžné výsledky studie dříve než tradičně sledované parametry. V několika studiích fáze I–II byla prokázána dobrá odpověď na léčbu a delší doba do radiografické progrese nebo delší celkové přežití (71–73). Vzhledem k tomu, že se jedná o studie s velmi malými skupinami pacientů, není možné zatím stanovit jasné doporučení pro plánování budoucích klinických zkoušek. V zatím nejrozsáhlejší práci byl zhodnocen význam detekce CTC u podskupiny 212 pacientů studie fáze III léčených primární linií docetaxelu a studijní látkou atrasentanem. Autoři prokázali kratší celkové přežití ve dvou letech od randomizace u pacientů s nepříznivým počtem CTC před léčbou (hazard ratio: 2,74; 95% confidence interval: 1,72–4,37;  $p < 0,001$ ), ale také obdobnou prognózu v případě nárůstu počtu CTC již po prvním měsíci léčby (hazard ratio: 2,55; 95% confidence interval: 1,04–6,24;  $p=0,041$ ) (74).

### **3.4.2. Význam cirkulujících nádorových buněk u nemetastatického karcinomu prostaty**

Dalším možným využitím detekce CTC je záchyt časného metastatického onemocnění, tj. ještě před vznikem klinicky zjiřitelných metastáz například pomocí zobrazovacích metod. Cirkulující nádorové buňky byly zjiřtény i u pacientů s lokalizovaným nebo lokálně pokročilým KP bez klinických známek metastatického onemocnění, předpokládá se tedy, že tyto buňky mohou vést k pozdějšímu vzniku metastáz. Navíc byla popsána přítomnost nádorových buněk v kostní dřeni (tzv. diseminované nádorové buňky – DTC) u pacientů s nemetastatickým onemocněním, u kterých došlo k PSA relapsu po radikální léčbě častěji než u pacientů s negativním nálezem DTC (48 vs. 29 %,  $p=0,0067$ ) (75). Vzhledem k tomu, že v jiných pracích nebyl nalezen rozdíl v počtu CTC u lokálně pokročilého nebo metastatického KP, je možné, že větší klinický význam by mohlo mít stanovení molekulárního profilu CTC.



### 3.4.2. Význam cirkulujících nádorových buněk po radikální léčbě

Hodnocení CTC bylo také využito v odhadu prognózy po radikální prostatektomii. V této oblasti bylo ale zatím provedeno velmi málo studií s nedostatečným počtem pacientů. Problém je také v detekci CTC metodou CellSearch<sup>TM</sup>, protože pozitivní nález je zjištěn u relativně malého procenta pacientů (cca 20 % případů). V jedné studii navíc nebyl rozdíl v detekci CTC mezi skupinou s KP a kontrolní skupinou s negativní biopsií prostaty patrný ( $p=0,946$ ) a rovněž nebyla prokázána korelace CTC s žádným klasickým prediktivním parametrem. Ani zvýšení množství odebrané krve (22,5 ml) oproti standardně využívanému objemu pro potřeby metody CellSearch<sup>TM</sup> (7,5 ml) nepřineslo zlepšení v detekci CTC po radikální prostatektomii, záchyt CTC ve skupině s lokalizovaným KP byl 21 %. V této práci byly dokonce zjištěny CTC u 20 % mužů v kontrolní skupině bez KP. V další studii bylo hodnoceno 152 pacientů s lokalizovaným KP. U 11 % z této kohorty byly CTC detekovány předoperačně. Cirkulující nádorové buňky opět nekorelovaly s patologickou klasifikací, GS ani s předoperační hodnotou PSA. Navíc nebyl prokázán vztah mezi pozitivitou CTC a biochemickým relapsem. Jako slibnější se jeví metoda mikrofluidních zařízení, která jsou schopné zachytit signifikantně vyšší počet CTC ve srovnání s metodou CellSearch<sup>TM</sup> (kapitola 3.3.1.2.). Význam může mít také využití RT-PCR, která dokáže detekovat transkripční produkty specifických genů v periferní krvi již od velmi malého množství. Touto metodou byla také prokázána korelace nálezů s patologickou klasifikací, GS, postižením lymfatických uzlin a pravděpodobně i s prognózou pacientů s biochemickým relapsem po radikálním výkonu (76).

## 4. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Karcinom prostaty je po kožních nádorech nejčastějším nádorem u mužů s přibližně 7000 nově zjištěných případů ročně. Přibližně 1500 mužů na KP ročně umírá. I přes současné možnosti radikální léčby u řady pacientů nastane časná nebo pozdní recidiva onemocnění, nejdříve a nejčastěji vzestupem hladiny PSA. U těchto pacientů není často jasné, zda se jedná o recidivu v místě operace (lokální recidivu), nebo zda se již nevytvořily vzdálené metastázy (uzlinové nebo kostní postižení). Výrazně horší prognózu pak mají pacienti s primárně metastatickým KP, kterých je v ČR ročně diagnostikováno přibližně 700. Nejhorší prognózu pak mají pacienti ve stádiu CRPC, u nichž došlo k rozvoji KP bez závislosti na hormonální blokádě. Na metastatickém procesu se podílí CTC a také tzv. dormantní nádorové buňky,

nejčastěji usídlené v kostní dřeni jako DTC, které mohou setrvávat v lymfatickém nebo krevním řečišti i řadu let, a které jsou příčinou pozdních relapsů. Proto identifikace a molekulární charakterizace těchto buněk může mít u pacientů nejen s CRPC výrazný vliv na stanovení prognózy a individualizaci léčebných postupů.

Cirkulující nádorové buňky lze využít ve stanovení prognózy OS (67) nebo predikce odpovědi na léčbu novými hormonálními preparáty (abirateron, enzalutamid) při stanovení splice-varianty AR-V7 (47). Nejčastěji užívaná metoda CellSearch<sup>TM</sup> však dokáže detekovat pouze přibližně 1–10 % CTC v periferní krvi (57). Ostatní metody se tedy snaží zajistit větší počet buněk nejen pro přesnější stanovení prognózy, ale také pro možné využití těchto buněk pro další charakteristiku a hodnocení například genové exprese pro predikci odpovědi na novou hormonální, cytostatickou nebo jinou experimentální léčbu.

Odběr krve na stanovení CTC (tzv. tekutá biopsie – liquid biopsy) představuje relativně neinvazivní metodu získání nádorových buněk v reálném čase, které je navíc možné charakterizovat pro potřeby předem stanoveného protokolu a například při stanovení splice-varianty AR-V7 tak před zahájením podání abirateronu nebo enzalutamidu určit pravděpodobnost účinnosti této léčby. V případě pozitivního výsledku je pak vhodnější zvolit místo výše uvedených preparátů mnohem méně nákladnou léčbu docetaxelem. Jedná se tak o zatím ojedinělý případ individualizace léčby pacientů s CRPC. Průběžné odběry také umožňují stanovení odpovědi na probíhající systémovou léčbu (změna v počtu CTC) a tím také určit, zda pokračování ve stanovené terapii má význam, nebo je vhodnější zvolit jinou léčebnou modalitu.

Existují dva základní problémy při stanovení CTC v periferní krvi. Prvním problémem je velmi nízká koncentrace CTC se srovnání s relativně vysokým počtem dalších buněk periferní krve. Tento problém je možné překonat pomocí imunomagnetické separace, při které je obohacená frakce CTC a jsou odstraněny ostatní krevní elementy. Nelegitimní exprese nádorově specifické RNA jinými buňkami, například trombocyty nebo leukocyty, představuje druhý problém. Adjustace metod pro stanovení specifické RNA k relativnímu množství jiných buněk může tento problém zčásti vyřešit, nicméně v interpretaci, a hlavně srovnání výsledků s ostatními metodami je k tomuto faktu nutné vždy přihlížet. Každopádně využití RT – PCR pro stanovení genetické exprese CTC představuje vysoce senzitivní a specifický způsob jejich molekulární charakterizace.

Základním cílem této práce bylo popsání problematiky CTC u pacientů s CRPC. Protokol, metodika a výsledky práce jsou založeny na grantovém projektu IGA NT12205–5/2011 – Detekce cirkulujících nádorových buněk a sledování exprese genů u kastročně rezistentního karcinomu prostaty jako součást individualizace systémové léčby. Nositelem projektu byla 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze (1. LF UK v Praze), spolupříjemcem byla Všeobecná fakultní nemocnice (VFN) v Praze. Hlavním řešitelem projektu byl doc. MUDr. Viktor Soukup, Ph.D., FEBU, spoluřešiteli projektu byli MUDr. Otakar Čapoun, FEBU, Mgr. Veronika Mikulová, Ph.D., Ing. Markéta Škereňová, Ph.D., MUDr. Hana Honová, Mgr. Katarína Kološťová, Ph.D., prof. MUDr. Tomáš Hanuš, DrSc., prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA. Na řešení projektu se podílely Urologická klinika VFN a 1.LF UK v Praze, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1.LF UK v Praze, Onkologická klinika VFN a 1.LF UK v Praze a Oddělení nádorové biologie 3. LF UK v Praze.

#### **Na základě dostupných prací jsme předpokládali, že**

- a) pacienti s CRPC a přítomností CTC v periferní krvi mají horší prognózu stran OS,
- b) u izolovaných CTC lze zhodnotit expresi zkoumaných genů a určit kombinaci exprimovaných genů predikující odpověď na chemoterapii,
- c) expresi zkoumaných genů lze hodnotit i v histologickém preparátu a lze posoudit změnu genové exprese v době diagnózy a ve stádiu CRPC.

#### **Primárními cíli projektu byly:**

- a) testování genové exprese CTC pomocí systému AdnaTest na základě již zavedeného standardního protokolu,
- b) zjištění účinnosti terapie na CTC u pacientů s CRPC,
- c) sledování heterogenity nádorových buněk pomocí analýzy jedné buňky (single cell analysis).

#### **Sekundárními cíli byly:**

- a) korelace detekce CTC s průběhem onemocnění a určení prognózy pacientů a predikce odpovědi na systémovou onkologickou léčbu (dlouhodobý cíl),

b) detekce exprese vybraných tumor–asociovaných genů v CTC a v dostupných histologických preparátech.

## 5. MATERIÁL A METODIKA

### 5.1. Protokol studie

Do prospektivní studie bylo zařazeno celkem 39 pacientů s CRPC, u kterých byla z důvodů progresse onemocnění indikována chemoterapie docetaxelem. Vstupními kritérii k zařazení byly kastační hladina testosteronu ( $<1,7$  nmol/l), vzestup hladiny PSA třikrát po sobě s konečnou hladinou PSA  $>2$  ng/ml, progresse PSA při odejmutí antiandrogenů nebo při sekundární hormonální manipulaci a přítomnost metastatického onemocnění. Výkonnostní stav (performance status – PS) byl u všech pacientů  $\leq 2$ . Pacienti, u kterých nebylo z jakýchkoliv důvodů možné podat chemoterapii nebo u kterých již byla chemoterapie v minulosti podána, byli vyřazeni. Docetaxel byl podáván v dávce  $75\text{mg}/\text{m}^2$  v třítydenních cyklech, ukončení chemoterapie bylo při potvrzené radiografické nebo klinické progresi nebo dle rozhodnutí ošetřujícího onkologa. U tří pacientů byl docetaxel aplikován v týdenním režimu v dávce  $25\text{mg}/\text{m}^2$  z důvodů PS = 2 nebo nepříznivých hodnot renálních parametrů.

U všech pacientů byla před podáním chemoterapie provedena scintigrafie skeletu a byl stanoven počet kostních metastáz. Indikace CT břicha a malé pánve byla podle rozhodnutí ošetřujícího onkologa. Před zahájením chemoterapie byla u všech pacientů stanovena hodnota sérové hladiny PSA. V průběhu chemoterapie byla pravidelně měřena hladina PSA a v tříměsíčních intervalech byla prováděna scintigrafie skeletu. Vyšetření CT v průběhu chemoterapie bylo provedeno podle rozhodnutí ošetřujícího onkologa. Nejlepší odpověď na léčbu byla stanovena ošetřujícím onkologem jako kompletní odpověď, částečná odpověď, stabilizované onemocnění anebo progredující onemocnění. V případě měřitelných lézí byla k hodnocení léčebné odpovědi použita metodika RECIST verze 1.1 (77). V případě úmrtí byla příčina hodnocena jako progresse KP nebo jiná příčina. Retrospektivní údaje, tj. datum diagnózy, klinická nebo patologická TNM klasifikace, bioptické nebo patologické GS, typ primární léčby, datum zahájení kastační léčby a hladina PSA v době diagnózy byly získány z patientské dokumentace. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii, který byl předem schválen Etickou komisí Všeobecné fakulní nemocnice a 1. Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

## 5.2. Krevní odběry

Odběr krve pro analýzu CTC byl v rámci studie proveden u všech 39 pacientů na Urologické klinice VFN před zahájením chemoterapie nebo na Onkologické klinice VFN v den podání prvního cyklu docetaxelu. Druhý odběr byl proveden celkem u 32 pacientů na Onkologické klinice VFN v den podání čtvrtého nebo pátého cyklu, tj. mezi prvním a druhým odběrem krve byly podány celkem tři nebo čtyři cykly docetaxelu. U čtyř pacientů nebyl proveden odběr z důvodů ztráty ze sledování, u jednoho nebyla chemoterapie nakonec zahájena, jeden pacient zemřel po prvním cyklu docetaxelu a u jednoho pacienta nebyl zatím v době statistického zpracování dat v závěru studie podán požadovaný počet cyklů chemoterapie. Vždy bylo odebráno 7,5 ml nesrážlivé krve pro izolaci CTC.

## 5.3. Využití krevních vzorků

Z periferní krve pacientů byla provedena izolace a detekce CTC. Přítomnost CTC byla hodnocena na základě sledování exprese tumor – asociovaných genů. Paralelně byla provedena izolace CTC pro kultivaci nádorových buněk, které byly následně použity pro single-cell analýzu viability CTC pomocí trypan – blue exclusion assay a pro imunohistochemickou analýzu pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek. Část vzorku byla použita ke stanovení genové exprese kandidátní skupiny genů detekovaných CTC. Ve spolupráci s patologem byl vyšetřen vzorek primárního nádoru a byla provedena analýza genové exprese pro stejnou skupinu kandidátních genů u směsi buněk z dostupné nádorové tkáně.

U části pacientů bylo odebráno ještě 8 ml krve do sérových separačních zkumavek pro potřeby grantu GAUK 539512: „Stanovení matrixových metaloproteináz 2 (MMP2) a 9 (MMP9), vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a cirkulujících nádorových buněk (CTC) ve vztahu k progresi nádorových onemocnění prsu a prostaty“ – hlavní řešitel Ing. Škereňová. Všichni pacienti podepsali souhlas s tímto odběrem.

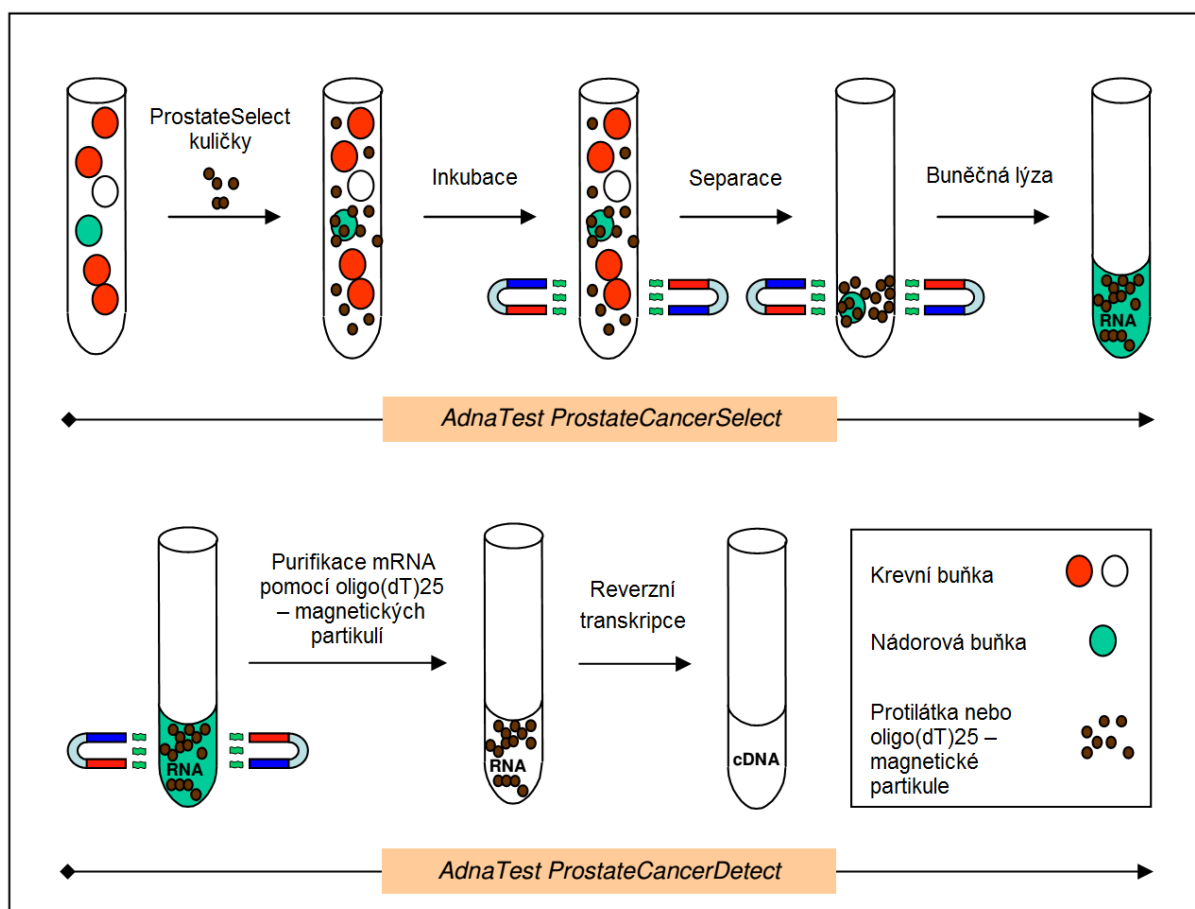
## 5.4. Metodika detekce a izolace cirkulujících nádorových buněk

Nesrážlivá krev (7,5ml) byla odebírána do zkumavek (AdnaCollect) se stabilizátorem umožňujícím zpracování krve během následujících 24 hodin, v případě, že byla uskladněna v chladu (4–8 °C). V případě odběru do běžných zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) jako antikoagulačním činidlem (BD Vacutainer® EDTA) bylo nutné

zpracovat vzorek do čtyř hodin od odběru. Izolace a detekce CTC byla provedena pomocí systému AdnaTest (Adnagen GmbH, Langenhagen, Německo). Každý krok laboratorní analýzy byl proveden podle protokolu výrobce (78, 79). Systém se skládá ze dvou kitů. První kit je určen pro detekci buněk periferní krve pomocí metody imunomagnetické separace (Prostate Cancer Select), druhý kit umožňuje izolaci mRNA z lyzátu CTC (Prostate Cancer Detect).

Metoda imunomagnetické separace využívá vazby monoklonálních protilátek konjugovaných s magnetickými částicemi Dynabeads™ (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norsko) na epiteliální a nádorově specifické antigeny na povrchu nádorových buněk. V magnetickém poli jsou tyto buňky poté z periferní krve separovány pomocí speciálních koncentrátorů (AdnaMag–L a AdnaMag–S) a následně lyzovány. Výsledný lyzát je připraven k okamžitému použití nebo je uskladněn při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu maximálně dvou týdnů. Metodika stanovení CTC pomocí kitů Prostate Cancer Select a Prostate Cancer Detect je znázorněna na obrázku 11.

**Obrázek 11. Schéma metody AdnaTest (kity Prostate Cancer Select a Prostate Cancer Detect) (78, 79)**



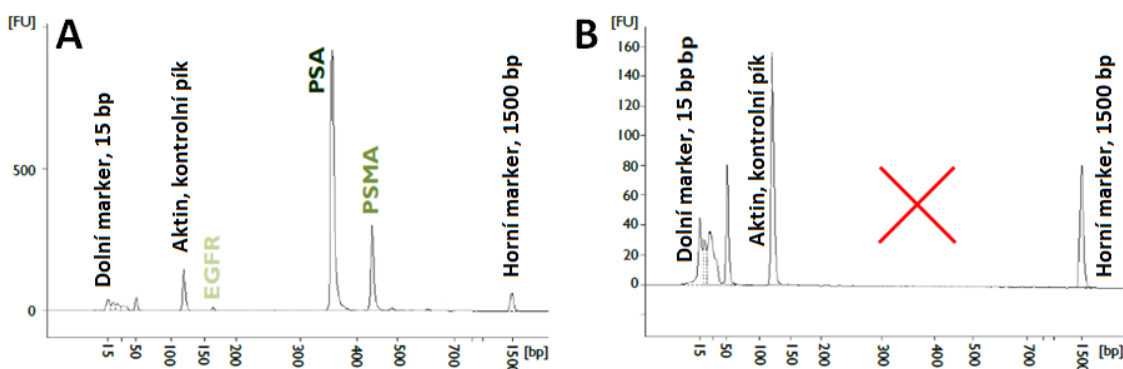
## 5.5. Metodika analýzy nádorově specifických genů

Lyzovaná frakce CTC byla použita pro izolaci mRNA pomocí Dynabeads oligo(dT)25 – partikulí, a ze získané mRNA je metodou reverzní transkripce syntetizována cDNA. Část cDNA byla použita pro testování metodou multiplex-PCR reakce s PrimerMix ProstateDetect pro gen Actin (120bp) a tumor asociované geny PSMA (449bp), PSA (357bp) a EGFR (163bp). Je doporučeno provádět analýzu PCR-produktů na Bioanalyzer Agilent 2100 (DNA Labchip 1000, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Test je pozitivní, je-li jasně detekován PCR fragment alespoň jednoho tumor asociovaného transkriptu. Při použití Bioanalyzeru Agilent 2100 jsou pozitivní vzorky s koncentrací  $\geq 0,10$  ng/ $\mu$ l, vzorky s koncentrací  $<0,10$  ng/ $\mu$ l jsou negativní. U všech vzorků musí být detekován kontrolní gen Actin, negativní kontroly musí být negativní a nesmí být přítomny fragmenty delší než 500bp (obrázek 12).

**Obrázek 12. Příklad kapilární elektroforézy nádorově specifických transkriptů před chemoterapií (Agilent Bioanalyzer 2100)**

A – pozitivní pacient č.8, věk 67 let, GS 3+3, PSA před chemoterapií 160,2 ng/ml, mnohočetné kostní metastázy, nejlepší odpověď: stabilizované onemocnění, úmrtí na progresi karcinomu po 9,5 měsících od zahájení chemoterapie

B – negativní pacient č.11, věk 71let, GS 4+5, PSA před chemoterapií 18,6 ng/ml, bez kostních metastáz, nejlepší odpověď: stabilizované onemocnění, úmrtí na rupturu aneuryzma aorty 23,3 měsících od zahájení chemoterapie



## 5.6. Rozšíření metodiky – analýza exprese androgenního receptoru

V průběhu roku 2015 bylo prostřednictvím diagnostické soupravy AdnaTest Prostate Cancer Detect možné rozšířit stanovení základních sledovaných markerů – EGFR, PSA a PSMA o stanovení genové exprese AR. Stanovení bylo prováděno v singleplex PCR reakci s přidáním AR – specifických primerů. Prostřednictvím amplifikační PCR reakce byly generovány fragmenty o velikosti 440bp, jejichž vyhodnocení se stejně jako u základních markerů provádělo na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) pomocí kitu DNA Labchip 1000. Vzorek byl hodnocen jako AR – pozitivní, pokud byl detekován pík o koncentraci vyšší než 0,15 ng/ul. Vzhledem k tomu, že do roku 2015 nebyly primery pro AR součástí diagnostické soupravy, vyjednali jsme s firmou AdnaGen poskytnutí alikvotů těchto primerů. Díky tomu jsme mohli provést stanovení AR u všech vzorků zahrnutých do projektu od jeho zahájení.

## 5.7. Dokumentace a kultivace izolovaných cirkulujících nádorových buněk

Část vzorku krve byla v případě CTC pozitivity použita ke studiu CTC pomocí inverzní fluorescenční mikroskopie. Protokol umožňuje následné specifické dobarvování (jádro, cytoplazma, AR). U pacientů s detekovatelnými CTC jsme testovali metodiku kultivace CTC a monitorovali ji 24 hodin konfokálním mikroskopem. Experiment byl postaven na ověření metodiky izolace a kultivace nádorových buněk z krve pomocí buněčné linie LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate – šest vzorků krve zdravého dárce), kultivaci nádorových buněk z mononukleární frakce a kultivaci CTC z patientských vzorků. Vzhledem k tomu, že se jednalo o ověření různých metod kultivace, jsou podrobná metodika a současně výsledky experimentu popsány v kapitole 6.4.

## 5.8. Příprava jednobuněčné nádorové suspenze z primárního nádoru

Fixovaná nádorová tkáň byla k analýze dodána patologem, obvykle 5 kusů 5 µm hrubých řezů nádorové biopsie nebo celého nádoru. Řezy byly dále homogenizovány pomocí přístroje GENTLEMACs (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Německo). Část buněčné suspenze byla použita pro izolaci mRNA z nádorové tkáně (FFPE–Qiagen RNA isolation kit – Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Homogenát byl přefiltrován a přemytý několikrát roztokem fosfátového pufru (phosphate buffered saline – PBS). Disociace nádorové tkáně byla kontrolována pod mikroskopem.



## 5.9. Testování genové exprese

Alikvót cDNA získaný metodou reverzní transkriptázy z mRNA izolovaných CTC (kapitola 5.5.) byl použit ke genově specifické preamplifikaci s využitím pro „high – throughput“ expresní analýzu na Biomark platformě (24 genů x 48 vzorků). Byly testovány expresní profily CTC v porovnání s expresí buněk primárního nádoru. Výsledky genové exprese v CTC byly porovnány s klinickým průběhem onemocnění a byl stanoven panel genů, predikující s největší pravděpodobností odpověď na protinádorovou léčbu.

## 5.10. Statistické zhodnocení

Pro měřené parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum. U kategorických proměnných byly zkoumány jejich frekvence.

Primárním cílem bylo zhodnotit celkové přežití pacientů, které bylo porovnáno s věkem, počáteční hodnotou hladiny PSA, GS a klinickou nebo patologickou TNM klasifikací, rozsahem metastatického onemocnění, celkovým počtem cyklů chemoterapie, negativní vs. pozitivní detekcí CTC v jednotlivých odběrech a absolutními hladinami jednotlivých nádorově specifických transkriptů v odběrech. Analýza přežití byla zkoumána pomocí Kaplan – Meierovy metody odhadu distribuční funkce přežití (80). Vliv jednotlivých faktorů byl testován pomocí Log–rank testu, Wilcoxon testu a Coxova regresního modelu s výpočtem Hazard Ratio (81).

Sekundárním cílem bylo zhodnocení vztahů mezi sérovými hladinami PSA a detekcí CTC. Vzhledem k nesymetrickému rozložení hodnot PSA a transkriptů nádorově specifických markerů byl použit Spearmanův korelační koeficient.

Všechny testované hypotézy byly oboustranné a předem byla zvolena hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ . Všechny testované hypotézy  $H_0$  vs.  $H_1$  byly formulovány před sběrem dat a nebyla užitá žádná z metod adjustace pro mnohonásobná porovnávání. Statistická analýza byla vypracována pomocí SW SAS (Cary, NC, USA).

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. Základní charakteristika souboru

Charakteristika souboru pacientů je shrnuta v tabulce 4. Průměrný věk pacientů byl 72 (54–83) let. Celkem 17 pacientů mělo bioptické nebo patologické GS  $\geq$  8. Devět pacientů podstoupilo jako primární léčbu radikální prostatektomii a šest pacientů absolvovalo radikální radioterapii. Střední doba od diagnózy do zahájení kastrace byla 4,3 (0,5 – 209,1) měsíců a střední doba od kastrace do zařazení do studie (tj. zahájení chemoterapie) byla 25,0 (3,0 – 213,5) měsíců. Všichni kromě pěti pacientů měli pozitivní nález na scintigrafii skeletu. Sedm pacientů mělo oligometastatické (maximálně tři léze) kostní postižení. Ve 12 případech byla patrná lymfadenopatie na CT vyšetření, z toho u deseti pacientů se jednalo o uzlinové postižení mimo pánevní oblast. Tito pacienti byli vhodní pro hodnocení účinnosti léčby podle kritérií RECIST (77). U žádného pacienta nebyly detekovány další orgánové metastázy. Zajímavé jsou také údaje o klinickém nebo patologickém stádiu onemocnění v době diagnózy. U pacientů, kteří po určení diagnózy podstoupili radikální léčbu (radikální prostatektomie nebo radioterapie), bylo v 10 z 15 (66,7 %) případů zjištěno lokálně pokročilé onemocnění (cT3 nebo pT3) a tři z devíti pacientů (66,7 %) měli po radikální prostatektomii pozitivní uzlinový nález (pN1). V případě paliativní hormonální léčby byl lokálně pokročilý nález zjištěn u 15 z 21 pacientů (71,5 %) a primárně metastatické postižení u poloviny z vyšetřených pacientů. U pěti pacientů nebylo před indikací hormonální léčby vyšetření pro zjištění případných metastáz provedeno.

**Tabulka 4. Charakteristika souboru pacientů. sPSA – sérový prostatický specifický antigen.**

	N	%
<b>Celkem pacientů</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>
<b>Střední věk; roky (rozmezí)</b>	71 (54 – 83)	
<b>Gleasonovo skóre</b>		
≤ 6	7	17,9
7	13	33,3
≥ 8	17	43,7
Neznámo	2	5,1
<b>Primární léčba</b>		
radikální prostatektomie	9	23,1
radikální radioterapie	6	15,4
pouze kastroční léčba	24	61,5
<b>Kostní metastázy před chemoterapií</b>		
≤ 3 ložiska	7	17,9
mnohočetné postižení	27	69,2
<b>Uzlinové metastázy před chemoterapií</b>		
	12	30,8
<b>sPSA v době diagnózy (ng/ml); průměr (rozmezí)</b>		
	105,8 (3,2 – 782)	
<b>sPSA před chemoterapií (ng/ml); průměr (rozmezí)</b>		
	96,9 (2,2 – 770,0)	
<b>sPSA během chemoterapie (ng/ml); průměr (rozmezí)</b>		
	53,9 (0,8 – 1243,0)	

## 6.2. Odpověď na léčbu a celkové přežití

Analýza údajů o sledování byla provedena celkem u 37 pacientů, jejichž klinické údaje a informace o analýze CTC byly k dispozici v době přípravy závěrečné zprávy grantového projektu. Průměrně bylo podáno osm cyklů chemoterapie docetaxelu (3–25). Během střední doby sledování 14,6 měsíců zemřelo celkem 20 pacientů, 13 bylo živých a čtyři pacienti byly ztraceni ze sledování. Z celkem 33 pacientů, u nichž byly validní údaje o sledování, vstoupilo do analýzy OS 30 mužů. Jeden pacient zemřel na kardiální selhání po prvním cyklu chemoterapie, jeden pacient odmítl podání cytotoxické léčby po prvním odběru pro analýzu CTC a jeden pacient zatím v době analýzy nedokončil nejméně tři cykly chemoterapie.

Střední doba do úmrtí od zařazení do studie byla 15,3 (4,3 – 44,2) měsíců. Během sledování zemřelo celkem 20 pacientů. V důsledku progresu KP zemřelo 15 (75 %) mužů. Další příčiny úmrtí byly sepse, plicní embolizace, ruptura aneuryzmatu hrudní aorty, pneumonie a kardiální selhání.

Průměrná hodnota hladiny PSA před zahájením chemoterapie byla 96,9 (2,2 – 770) ng/ml a v době druhého odběru pro analýzu CTC 53,9 (0,8 – 1243,0) ng/ml. Více než 30% pokles hladiny PSA během chemoterapie byl zaznamenán u 16 z 30 (53,3 %) hodnocených pacientů. Kompletní odpověď byla zjištěna u jednoho pacienta (3,3 %), částečná odpověď u 12 (40,0 %), stabilizované onemocnění u 12 (40,0 %) a progredující onemocnění u pěti (16,7 %) pacientů.

### **6.3. Detekce cirkulujících nádorových buněk**

Cirkulující nádorové buňky byly detekovány celkem u 33 z 39 (84,6 %) pacientů před chemoterapií. Během léčby docetaxelem bylo pro CTC pozitivních celkem 17 z 32 (53,1 %) vzorků. Dva hraniční vzorky (podle hodnoty transkriptu PSA) byly pro potřeby statistické analýzy označeny jako pozitivní. Během léčby zůstalo CTC pozitivních celkem 17 pacientů, u 11 původně pozitivních pacientů nebyly CTC detekovány. U všech tří pacientů, kteří neměli zjištěny CTC před chemoterapií a absolvovali také druhý odběr, nebyly vzorky pozitivní ani v průběhu chemoterapie. Před chemoterapií byl transkript PSA pozitivní u 32 vzorků, transkript PSMA u 22 vzorků a transkript EGFR u čtyř vzorků. Ve druhém odběru byl transkript PSA zjištěn v 16 případech, transkript PSMA v pěti vzorcích a transkript EGFR u tří vzorků (tabulka 5). U posledních tří zmíněných vzorků nebyl transkript EGFR před chemoterapií původně exprimován.

**Tabulka 5. Detekce nádorově specifických transkriptů cirkulujících nádorových buněk a jejich korelace se sérovou hladinou prostatického specifického antigenu před a během léčby docetaxelem.** PSA – prostatický specifický antigen; PSMA – prostatický specifický membránový antigen; EGRF – receptor epidermálního růstového faktoru; sPSA – sérový prostatický specifický antigen; \* hodnoceno Spearmanovým korelačním koeficientem, † statisticky signifikantní korelace.

Transkript	ng/μl; průměr (rozmezí)	Pozitivní vzorky; n (%)	sPSA před/během chemoterapie *
<b>Před chemoterapií (n=39)</b>			
PSA	9,7 (0,0 – 41,8)	32 (82,1)	0,439 †
PSMA	1,1 (0,0 – 11,3)	22 (56,4)	0,348 †
EGRF	0,1 (0,0 – 0,5)	4 (10,3)	0,305
<b>Během chemoterapie (n=32)</b>			
PSA	3,7 (0,0 – 39,3)	16 (50,0)	0,563 †
PSMA	0,4 (0,0 – 7,4)	5 (12,8)	0,430 †
EGRF	0,0 (0,0 – 0,5)	3 (17,7)	0,374 †

### 6.3.1. Korelace celkového přežití s klinickými parametry

Střední doba OS skupiny 30 hodnocených pacientů byla 15,3 (0,9–35,2) měsíců. Statisticky významný rozdíl v délce přežití byl pouze u skupiny pacientů s žádnými nebo minimálním počtem kostních metastáz proti skupině s mnohočetným metastatickým postižením skeletu. Riziko úmrtí u pacientů s mnohočetnými metastázami bylo více než dvakrát vyšší (hazard ratio=2,21; 95 % konfidenční interval 0,77 – 6,35). Ostatní klinické parametry nebyly ve vztahu k OS statisticky významné (tabulka 6). Střední hodnota hladiny PSA před chemoterapií byla 100 ng/ml a během chemoterapie 50 ng/ml. Pacienti s hodnotou PSA před chemoterapií nižší než medián, přežívali déle než pacienti s vyšší hodnotou PSA (střední doba 16,8 vs. 12,9 měsíců), rozdíl však nebyl statisticky významný (p=0,3010). Obdobný trend byl pozorován u pacientů s hodnotou PSA nižší než medián během chemoterapie (střední doba přežití 19,4 vs. 13,7 měsíců), ani v tomto případě však nebyl rozdíl v přežití významný (p=0,1712).

**Tabulka 6. Univariátní analýza vztahů klinických parametrů a celkového přežití pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik.** *sPSA – sérový prostatický specifický antigen v době diagnózy; iPSA – sérový prostatický specifický antigen; CTC – cirkulující nádorové buňky; HR – hazard ratio – poměr rizika; CI – konfidenční interval; \* při použití Wilcoxonova testu byl rozdíl hraničně významný –  $p=0,0421$  (Wilcoxonův test dává větší váhu na kratší období, tj. na počátky křivek).*

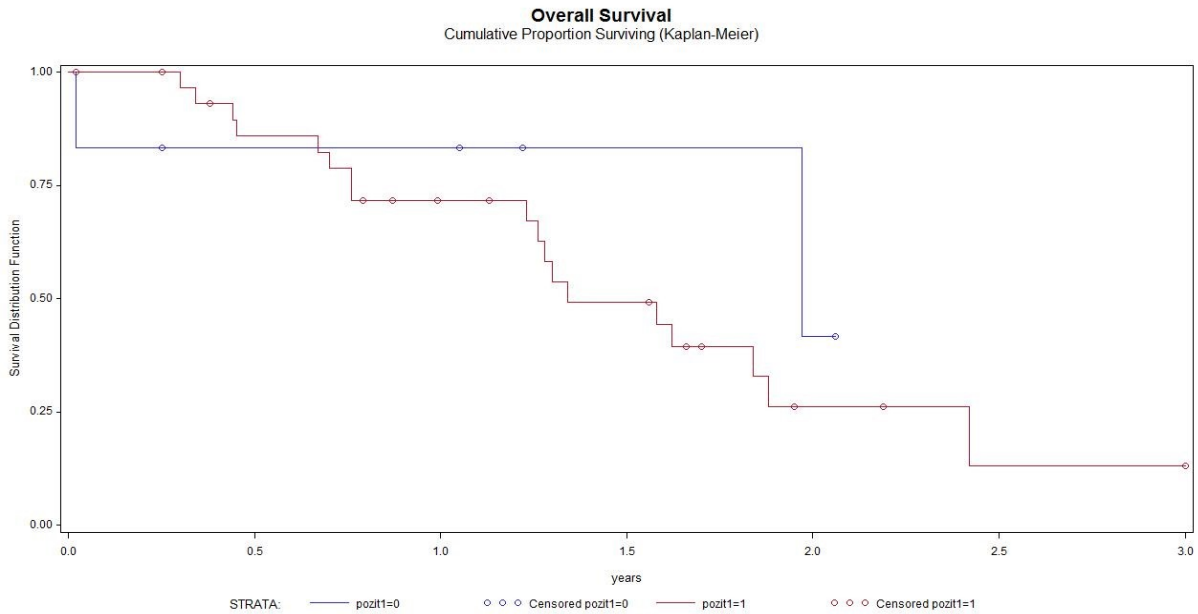
Parametr	HR	95 % CI	p (Log-rank)
Věk	0,72	0,28 – 1,84	0,4892
iPSA	0,49	0,19 – 1,29	0,1368
sPSA před chemoterapií	1,64	0,64 – 4,22	0,301
sPSA během chemoterapie	2,00	0,73 – 5,51	0,1712
CTC pozitivita před chemoterapií	1,75	0,40 – 7,71	0,4556
CTC pozitivita během chemoterapie	2,17	0,79 – 5,98	0,1246
Mnohočetné kostní metastázy	2,21	0,77 – 6,35	0,1306*

### 6.3.2. Korelace celkového přežití s detekcí cirkulujících nádorových buněk

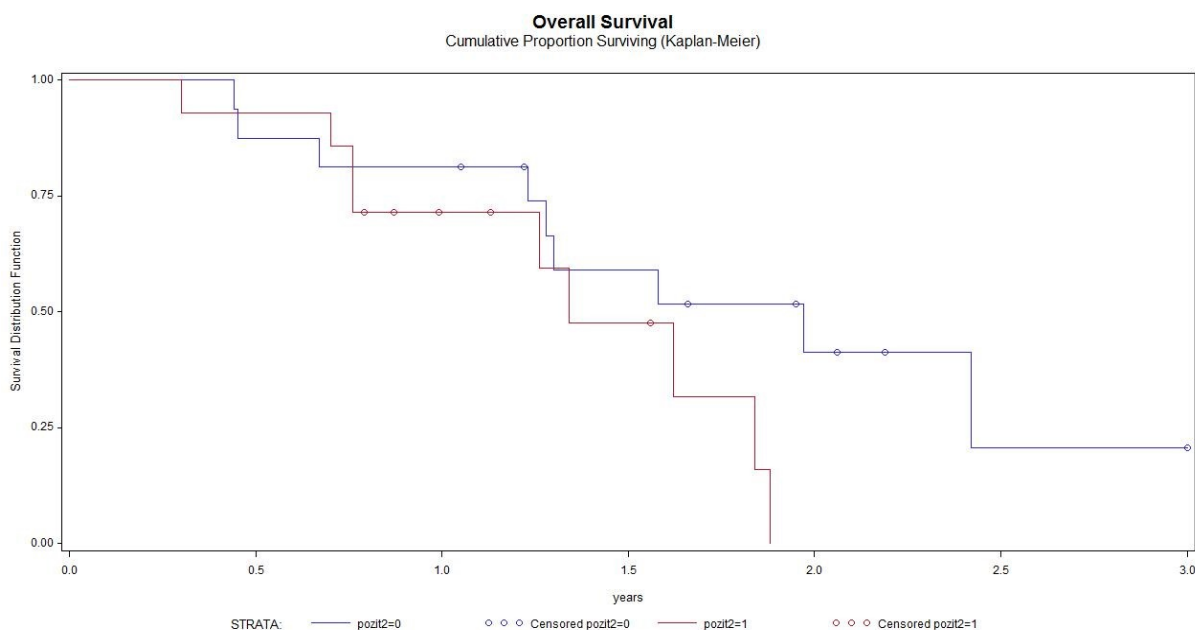
Nezjistili jsme žádný rozdíl v přežití pacientů, kteří byli před zahájením chemoterapie hodnoceni jako CTC pozitivní proti CTC negativním pacientům (střední doba přežití 14,8 vs. 13,6 měsíců;  $p=0,4556$ ) (obrázek 13A). Pacienti s CTC negativním vzorkem během chemoterapie přežívali déle než pacienti, kteří zůstali CTC pozitivní i během podání docetaxelu, rozdíl v OS však nebyl statisticky významný (střední doba 17,3 vs. 12,7 měsíců;  $p=0,1246$ ) (obrázek 13B). Nejdelší přežití bylo zaznamenáno u čtyř pacientů, kteří byli hodnoceni jako CTC negativní v obou odběrech. Celkové přežití u těchto čtyř pacientů bylo významně delší než u skupiny pacientů, kteří byli v obou odběrech hodnoceni jako CTC pozitivní (střední doba 19,2 vs. 12,7 měsíců;  $p=0,0228$ ) (obrázek 14).

Součástí grantového projektu bylo také zhodnocení eventuálního klinického významu absolutních hodnot jednotlivých nádorově specifických transkriptů s ve vztahu k OS. Kromě hodnot transkriptů PSA (medián 0,14 ng/μl) a PSMA (medián 0,00 ng/ml) během chemoterapie nebyl žádný z CTC transkriptů pro OS statisticky významný (tabulka 7). Celkové přežití bylo delší u pacientů s hodnotou transkriptu PSA nižší než medián (19,1 vs. 12,4 měsíců;  $p=0,0468$ ) (obrázek 15).

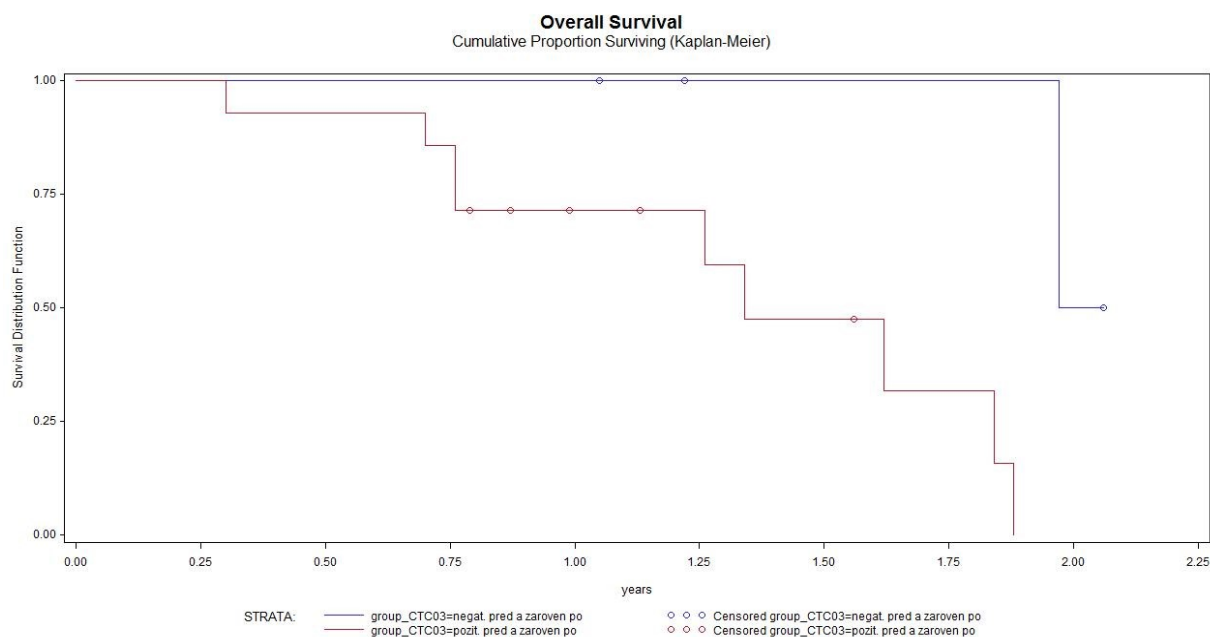
**Obrázek 13A. Kaplan–Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití (celkové přežití).** Cut off = CTC pozitivní vzorek, ( $p=0,4556$ ; hazard ratio=1,746; 95% konfidenční interval 0,396 – 7,708). Červená – pacienti s CTC pozitivním vzorkem před chemoterapií. Fialová – pacienti s CTC negativním vzorkem před chemoterapií.



**Obrázek 13 B. Kaplan–Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití (celkové přežití).** Cut off = CTC pozitivní vzorek, ( $p=0,1246$ ; hazard ratio=2,170; 95% konfidenční interval 0,787 – 5,983). Červená – pacienti s CTC pozitivním vzorkem během chemoterapie. Fialová – pacienti s CTC negativním vzorkem během chemoterapie.



**Obrázek 14. Kaplan–Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití (celkové přežití). Cut off = CTC pozitivní vzorek, ( $p=0,0228$ ). Červená – pacienti s CTC pozitivním vzorkem před i během chemoterapie. Fialová – pacienti s CTC negativním vzorkem před i během chemoterapie.**

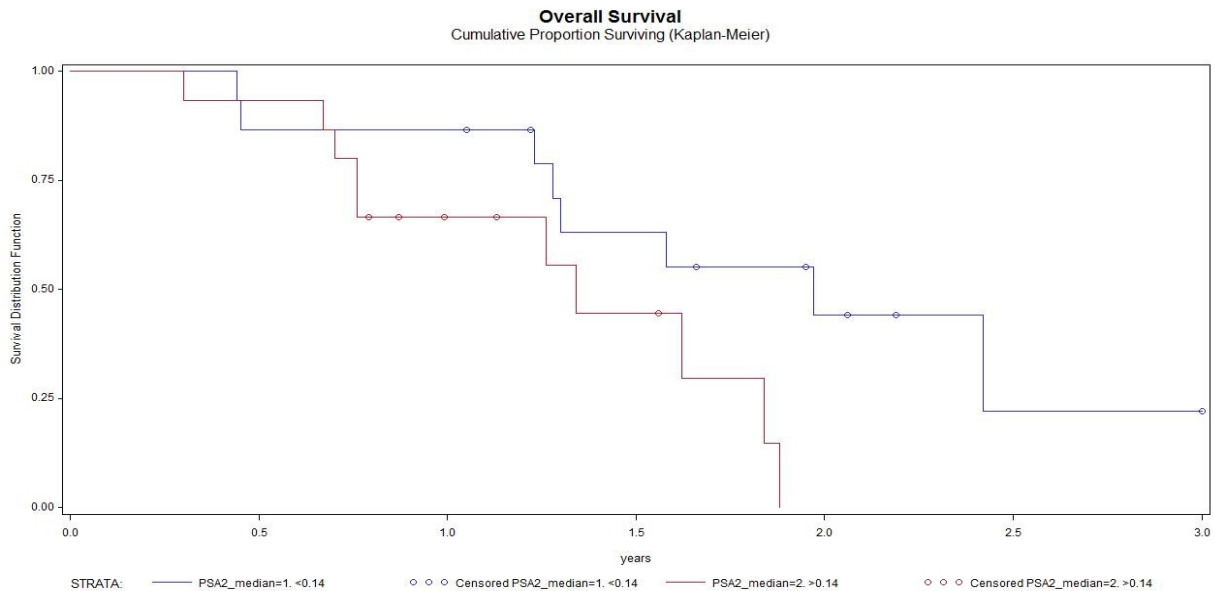


**Tabulka 7. Univariantní analýza vztahů absolutních hodnot nádorově specifických transkriptů a celkového přežití pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik. PSA – prostatický specifický antigen; PSMA – prostatický specifický membránový antigen; EGRF – receptor epidermálního růstového faktoru; HR – hazard ratio – poměr rizika; CI – konfidenční interval.**

Transkript	HR	95 % CI	p (Log-rank)
<b>Před chemoterapií (n=39)</b>			
PSA	2,195	0,841 – 5,732	0,0991
PSMA	1,481	0,588 – 3,732	0,4006
EGRF	1,494	0,592 – 3,772	0,3913
<b>Během chemoterapie (n=32)</b>			
PSA	2,764	0,974 – 7,843	0,0468
PSMA	1,622	0,584 – 4,507	0,0348
EGRF	1,356	0,497 – 3,703	0,5496



**Obrázek 15. Kaplan–Meierova metoda odhadu distribuční funkce přežití (celkové přežití).** Cut off = 0,14 ng/μl, ( $p=0,0468$ ; hazard ratio=2,764; 95% konfidenční interval 0,974–7,843). Červená – pacienti s hodnotou CTC transkriptu PSA během chemoterapie  $\geq 0,14$  ng/μl. Fialová – pacienti s hodnotou CTC transkriptu PSA během chemoterapie  $<0,14$  ng/μl.



### 6.3.3. Korelace nádorově specifických transkriptů cirkulujících nádorových buněk a sérových hladin prostatického specifického antigenu

Sérová hladina PSA před chemoterapií korelovala s absolutní hodnotou transkriptu PSA a PSMA. Během chemoterapie byla korelace s hladinou PSA patrná u všech transkriptů. Nepozorovali jsme závislost mezi hladinou PSA před chemoterapií a hodnocením vzorku ve smyslu CTC pozitivní vs. negativní. Během chemoterapie byly významně vyšší hladiny PSA u CTC pozitivních pacientů ( $p=0,0031$ ). Absolutní ani relativní změny hladiny PSA během léčby však se změnami hodnot transkriptů nekorelovaly, kromě změny hodnoty transkriptu EGFR. V případě nárůstu hodnoty transkriptu EGFR došlo také většinou k nárůstu sérové hladiny PSA ( $p=0,0383$ ) (tabulka 8). Změna sérové hladiny PSA během chemoterapie nebyla významně odlišná mezi skupinou pacientů, kteří zůstali CTC pozitivní skupinou pacientů, u kterých byl druhý odběr negativní (obrázek 16).

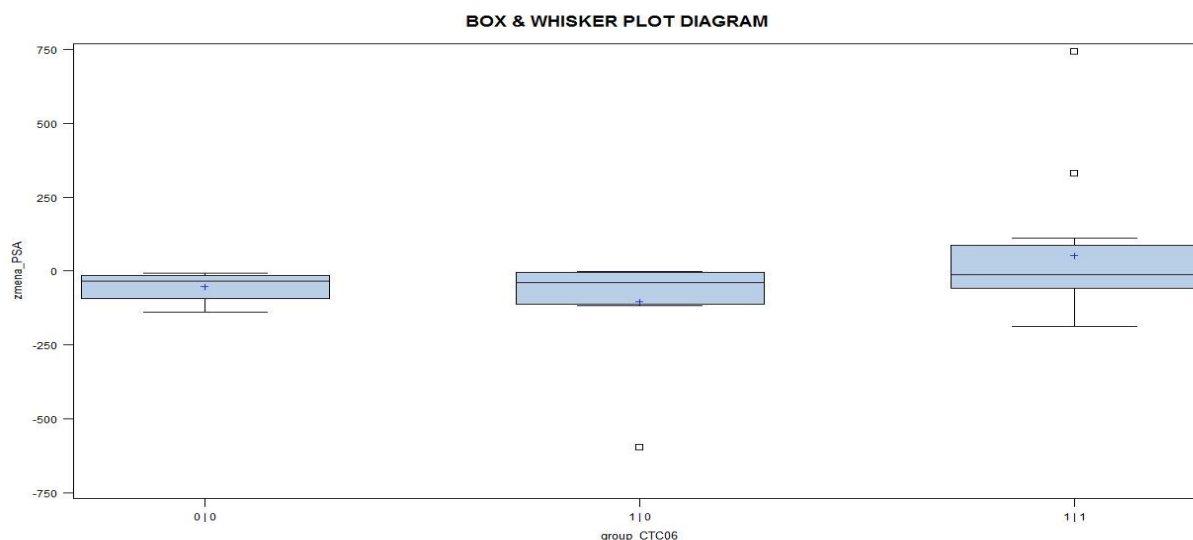
**Tabulka 8. Korelace sérové hladiny PSA s nádorově specifickými transkripty a detekcí cirkulujících nádorových buněk.** *sPSA – sérová hladina prostatického specifického antigenu; PSA – prostatický specifický antigen; PSMA – prostatický specifický membránový antigen; EGRF – receptor epidermálního růstového faktoru;  $\Delta$  sPSA – změna sérové hladiny prostatického specifického antigenu; CTC – cirkulující nádorové buňky;  $\Delta$ CTC – změna v hodnocení cirkulujících nádorových buněk.*

Absolutní hladina nádorově specifických transkriptů							
Parametr	Korelační koeficient			p–hodnoty			
	PSA	PSMA	EGFR	PSA	PSMA	EGFR	Stav CTC
sPSA 1	0,4389	0,3482	0,3047	0,0084	0,0404	0,0751	0,2851
sPSA 2	0,5628	0,4296	0,3745	0,0018	0,0225	0,0496	0,0031

Změna hladiny nádorově specifických transkriptů							
Parametr	Korelační koeficient			p–hodnoty			
	PSA	PSMA	EGFR	PSA	PSMA	EGFR	$\Delta$ CTC
relativní $\Delta$ sPSA	0,1144	-0,0257	0,3143	0,5621	0,8969	0,1033	0,4534
absolutní $\Delta$ sPSA	0,0956	0,0047	0,3935	0,6297	0,9811	0,0383	–

**Obrázek 16. Změna v sérové hladině PSA během chemoterapie ve skupinách pacientů, kteří zůstali CTC negativní (vlevo), u kterých došlo k vymizení CTC (uprostřed) a kteří zůstali CTC pozitivní (vpravo). Kruskal–Wallis Test;  $p=0,3864$ .**



### 6.3.4. Korelace nádorově specifických transkriptů cirkulujících nádorových buněk a odpovědi na léčbu docetaxelem

Nepozorovali jsme žádný rozdíl v OS mezi pacienty, u kterých došlo k více než 30% poklesu sérové hladiny PSA a pacienty s horší biochemickou odpovědí na chemoterapii docetaxelem ( $p=0,1534$ ). Podobný výsledek byl i v případě, že za příznivou biochemickou odpověď byl považován pokles hladiny PSA o více než 50 % ( $p=0,9076$ ). Žádný rozdíl nebyl také patrný v detekci CTC před a během chemoterapie a skupinou pacientů s částečnou odpovědí nebo stabilizovaným onemocněním proti skupině pacientů s progredujícím nálezem ( $p=0,5979$ ). Absolutní změna sérové hladiny PSA však s hodnocením odpovědi podle RECIST kritérií významně korelovala ( $p=0,033$ ) (tabulka 9).

**Tabulka 9. Korelace detekce CTC a změna sérových hladin PSA s nejlepší odpovědí během chemoterapie docetaxelem.** CTC – cirkulující nádorové buňky; CHT – chemoterapie docetaxelem; sPSA – sérový prostatický specifický antigen; CR – kompletní odpověď, PR – částečná odpověď, SD – stabilizované onemocnění; PD – progredující onemocnění; \* Chi-square test; † statisticky signifikantní korelace.

		Počet pacientů				
		CR	PR	SD	PD	p=hodnota*
CTC negativní před a během chemoterapie	1	1	1	0	0,8976	
CTC pozitivní před a negativní během chemoterapie	–	5	4	2		
CTC pozitivní před a během chemoterapie	–	6	7	3		
Pokles hladiny sPSA $\leq$ 30 %	1	6	1	1	0,1233	
Pokles hladiny sPSA > 30 %	–	6	11	4		
Pokles hladiny sPSA $\leq$ 50 %	1	8	4	1	0,0710	
Pokles hladiny sPSA > 50 %	–	4	8	4		
		Průměrná relativní změna (%)				
Relativní změna hladiny sPSA během chemoterapie	27	44	76	144	0,0333†	

### 6.3.5. Detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů před radikální prostatektomií

Během projektu jsme také testovali možnost detekce CTC pomocí metody AdnaTest u pacientů s předpokládaným lokalizovaným onemocněním před radikální prostatektomií. Vybrali jsme celkem čtyři pacienty s vysoce rizikovým KP podle D'Amicových kritérií (6). U žádného pacienta jsme nezjistili přítomnost CTC v krevním vzorku, nebyl exprimován žádný z nádorově specifických transkriptů, správnost zpracování bylo potvrzeno pozitivním nálezem kontrolního genu aktinu ve všech odběrech. Zajímavé je, že CTC nebyly detekovány ani u dvou pacientů, u kterých byl zjištěn metastatický rozsev v pánevních uzlinách. Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 9.

*Tabulka 10. Vlastnosti pacientů s vysoce rizikovým karcinomem prostaty před radikální prostatektomií. iPSA – hladina prostatického specifického antigenu v době diagnózy; cTNM – klinická klasifikace TNM (Tumor – Nodes – Metastasis), bGS – bioptické Gleasonovo skóre, pT – patologická klasifikace (Tumor), pGS – patologické Gleasonovo skóre, pN1 – pozitivní uzlinový nález po operaci.*

Kód vzorku	Věk (roky)	iPSA (ng/ml)	cTNM	bGS	pT	pGS	pN1
1RP	62,7	3,66	T3bN0M0	4+5	pT3b	4+4	ano
2RP	63,4	22,29	T2cNxMx	4+4	pT2c	4+3	ne
3RP	67,1	12,92	T2cNxM0	5+4	pT3a	5+4	ne
4RP	51,2	21,1	T2bN0M0	3+5	pT3b	5+3	ano

### 6.3.6. Detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů s elevací prostatického specifického antigenu bez nálezu karcinomu prostaty

U dvou pacientů s vysokou sérovou hladinou PSA a opakovanými biopsiemi prostaty bez záchytu karcinomu jsme provedli odběr krve pro detekci CTC.

První pacient byl 72letý muž, který podstoupil dvě standardní biopsie prostaty vždy s odběrem deseti vzorků a jednu saturační biopsii s odběrem 24 vzorků. V poslední biopsii byl nález atypické maloacinární proliferace (ASAP), bez přítomnosti nádorových struktur. Hladina PSA se u tohoto pacienta pohybuje dlouhodobě v rozmezí 12–16 ng/ml.

Druhý pacient měl 74 let a podstoupil celkem tři standardní biopsie a jednu saturační. V první standardní biopsii v roce 2009 byl záchyt mikroskopického ložiska ASAP, u kterého nebylo možné vyloučit přítomnost dobře diferencovaného KP, bylo ale doporučeno opakování biopsie. V dalších odběrech již nález potvrzen nebyl. Hladina PSA také kolísala, ale ve výrazně vyšších úrovních než u předchozího pacienta (14–59 ng/ml). V době odběru na vyšetření CTC byla hodnota PSA 30,6 ng/ml.

Ani u jednoho pacienta nebyla přítomnost CTC ve vzorcích krve potvrzena, nebyl detekován žádný nádorově specifický transkript a byl prokázán kontrolní gen pro aktin.

### **6.3.7. Detekce genu pro androgenní receptor v cirkulujících nádorových buňkách**

V roce 2015 bylo provedeno stanovení CTC pomocí AdnaTest Prostate Cancer Detect testu u tří nových pacientů a u dvou pacientů se jednalo o druhý odběr po třetím cyklu chemoterapeutické léčby. Celkem bylo tedy vyšetřeno 41 pacientů s CRPC, čtyři pacienti po radikální prostatektomii a dva pacienti s benigní hyperplazií prostaty (negativní kontroly). Celkem bylo vyšetřeno 77 vzorků periferní krve pacientů s CRPC, z toho 41 vzorků bylo odebráno před zahájením a 33 vzorků v průběhu chemoterapie.

V průběhu roku 2015 bylo prostřednictvím diagnostické soupravy AdnaTest Prostate Cancer Detect možné rozšířit stanovení základních sledovaných markerů (EGFR, PSA a PSMA) o stanovení genové exprese androgenního receptoru (AR). Stanovení bylo prováděno v singleplex PCR reakci s přidáním AR – specifických primerů. Prostřednictvím amplifikační PCR reakce byly generovány fragmenty o velikosti 440bp, jejichž vyhodnocení se stejně jako u základních markerů provádělo na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) pomocí DNA 1000 kitu. Vzorek byl hodnocen jako AR – pozitivní, pokud byl detekován pík o koncentraci vyšší než 0,15 ng/ $\mu$ l. Vzhledem k tomu, že do roku 2015 nebyly primery pro AR součástí diagnostické soupravy, vyjednali jsme s firmou AdnaGen poskytnutí alikvótů těchto primerů. Díky tomu jsme mohli provést stanovení AR u všech vzorků zahrnutých do projektu od jeho zahájení.

Celkem jsme tedy stanovili AR v 77 vzorcích. AR – pozitivita byla detekována ve vzorcích před chemoterapií u 27 (65,9 %) pacientů a u 14 případů (34,1 %) byl nález negativní. Ve vzorcích odebraných během chemoterapie byla AR – pozitivita stanovena u 26

pacientů (78,8 %) a v sedmi případech (21,2 %) byl nález negativní. Zajímavé bylo zjištění, že u čtyř pacientů AR – pozitivních před chemoterapií byl nález v druhém odběru negativní. U sedmi pacientů přetrvávala AR – pozitivita i v opakovaných vzorcích. U šesti pacientů z této skupiny došlo k poklesu koncentrace fragmentu AR. Koncentrace AR fragmentu byla ve vzorku odebraném během chemoterapie u těchto pacientů 1,5 – 11 x nižší ve srovnání se vzorkem odebraným před chemoterapií. U jednoho pacienta došlo naopak ke dvojnásobnému nárůstu koncentrace fragmentu AR v kontrolním vzorku (13,80 ng/μl) ve srovnání s odběrem provedeným před chemoterapií (6,53 ng/μl).

## 6.4. Kultivace cirkulujících nádorových buněk – experiment

### 6.4.1. Ověření metodiky izolace a kultivace nádorových buněk pomocí buněčné linie

Při pokusu byl do šesti vzorků krve zdravého dárce přidán definovaný počet (Bürkerova komůrka) buněk nádorové linie odvozené z KP Lymph Node Carcinoma of the Prostate (LNCaP). U každého ze šesti vzorků byla provedena izolace nádorových buněk dle protokolu výrobce (AdnaTest, Adnagen GmbH, Langenhagen, Německo). Výsledné koncentrace hledaných kontrolních (aktin) a tumor – asociovaných (EGFR, PSA a PSMA) PCR produktů změřené na přístroji 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) jsou uvedeny v tabulce 11. Přestože metoda AdnaTest není kvantitativní, pozorovali jsme vzrůstající koncentraci PCR produktů sledovaných tumor – asociovaných markerů ve vzorcích s vyšším počtem nádorových buněk.

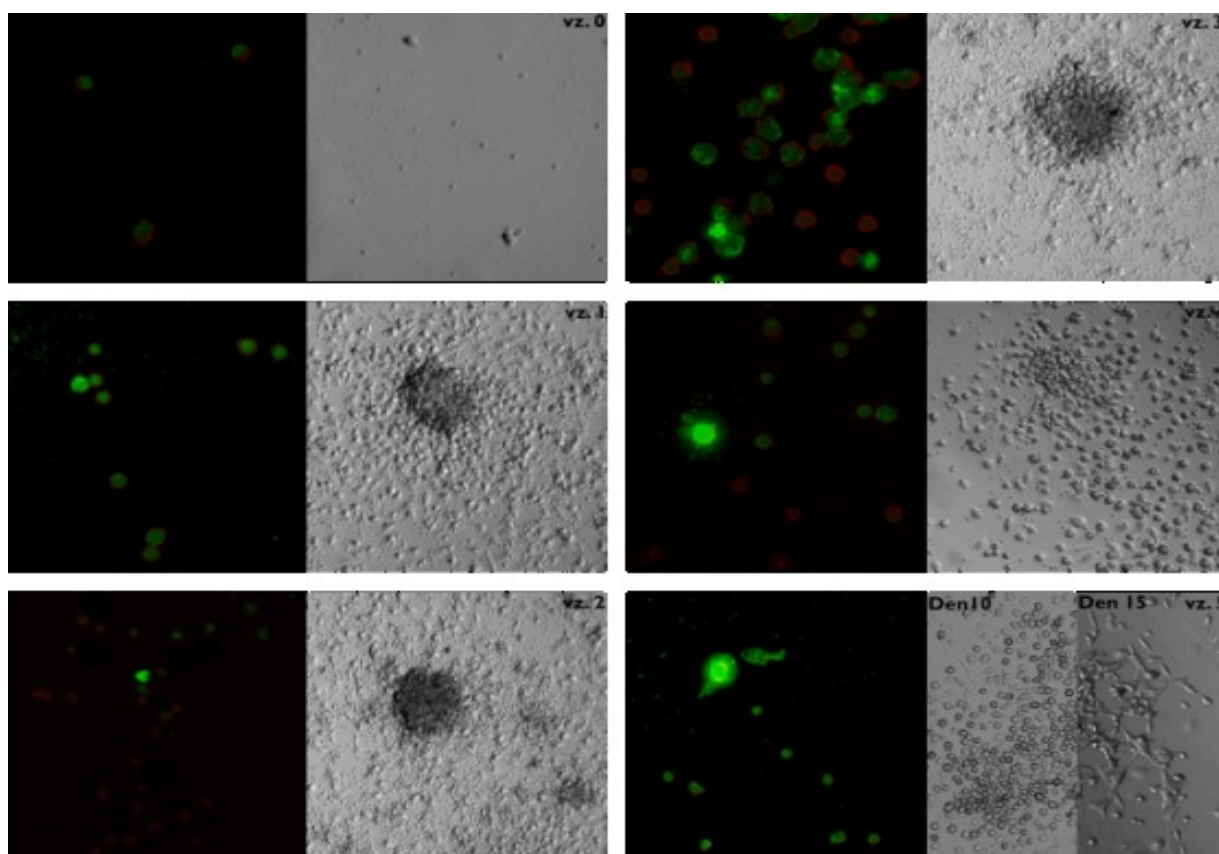
*Tabulka 11. Tabulka 10. Výsledek analýzy koncentrační řady nádorových buněk v krvi. LNCaP – lymph node carcinoma of the prostate; EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru; PSA – prostatický specifický antigen; PSMA – prostatický specifický membránový antigen.*

Číslo vzorku	Počet buněk LNCaP / ml krve	Hodnocení AdnaTestu	Změřené koncentrace PCR fragmentů (ng/μl)			
			Aktin (118 bp)	EGFR (163 bp)	PSA (357 bp)	PSMA (449 bp)
1	0	negativní	6,92	0,00	0,00	0,00
2	1	pozitivní	5,90	0,00	2,07	0,02
3	10	pozitivní	7,09	0,01	21,21	1,40
4	100	pozitivní	5,60	0,10	27,24	2,46
5	1000	pozitivní	6,63	0,47	37,18	3,64
6	10000	pozitivní	7,83	0,79	39,21	1,03

### 6.4.2. Kultivace nádorových buněk z mononukleární frakce

Totožná koncentrační řada jako pro ověření izolace nádorových buněk byla připravena pro ověření možnosti jejich kultivace. Z každého ze šesti vzorků byla gradientovou centrifugací (Histopaque®–1077, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) izolována mononukleární vrstva. Z části buněk (cca 1 milion/preparát) byl připraven preparát (StatSpin CytoFuge 2, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Zbytek buněk byl kultivován v Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médiu (RPMI–1640 Medium, Sigma – Aldrich) s 5 % fetálního telecího séra (fetal bovine calf serum [FBS], Sigma – Aldrich). Buněčné preparáty byly fluorescenčně obarveny protilátkou proti CD45 (leukocytární markér) konjugovanou s fykoerythrinem (mouse monoclonal to CD45, Exbio, Vestec, Česká republika) a protilátkou proti pancytokeratinu (nádorový markér) konjugovanou s fluorescein isothyokyanátem (FITC) (anti–cytokeratin pan–FITC, Sigma – Aldrich) (obrázek 17). Kultivovaným buňkám bylo 2x týdně vyměněno médium a byly průběžně sledovány pomocí inverzního mikroskopu (Novel NIB 100, Ningbo Yongxin Optics Co., Ltd., Zhejiang, Čína). Po deseti dnech od počátku kultivace byla pořízena fotodokumentace (obrázek 17).

**Obrázek 17. Porovnání vzorků koncentrační řady.** Fotografie: vlevo fluorescenčně obarvený vzorek (červeně CD45, zeleně pancytokeratin), vpravo foto z desátého dne kultivace (zvětšení 5x).



Přestože shluky adherujících buněk byly patrné ve všech vzorcích koncentrační řady kromě negativní kontroly (vzorek 1), morfologicky neodpovídaly buňkám linie LNCaP. Byly odebrány vzorky média z kultivačních nádob k zjištění přítomnosti PSA, které je buňkami LNCaP produkováno (Laboratoř biochemie, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN a 1. LF UK v Praze). Přítomnost PSA byla prokázána pouze ve vzorku č. 6 ( $c=106,6 \mu\text{g/l}$ ) a v kontrolním vzorku z čisté linie LNCaP ( $c=8,4 \mu\text{g/l}$ ). Ve vzorcích pravděpodobně došlo k aktivaci lymfocytů z krve dárce, které přidané buňky nádorové linie zničily. Pouze vzorek č.6 obsahoval dostatečné množství nádorových buněk. Vzorek č.6 také jako jediný vykazoval dlouhodobý růst buněk.

### **6.4.3. Kultivace cirkulujících nádorových buněk ze vzorků sledovaných pacientů**

V průběhu projektu bylo navrženo a vyzkoušeno několik přístupů k dosažení úspěšné kultivace CTC z krve pacienta.

#### **6.4.3.1. Izolace cirkulujících nádorových buněk z mononukleární frakce**

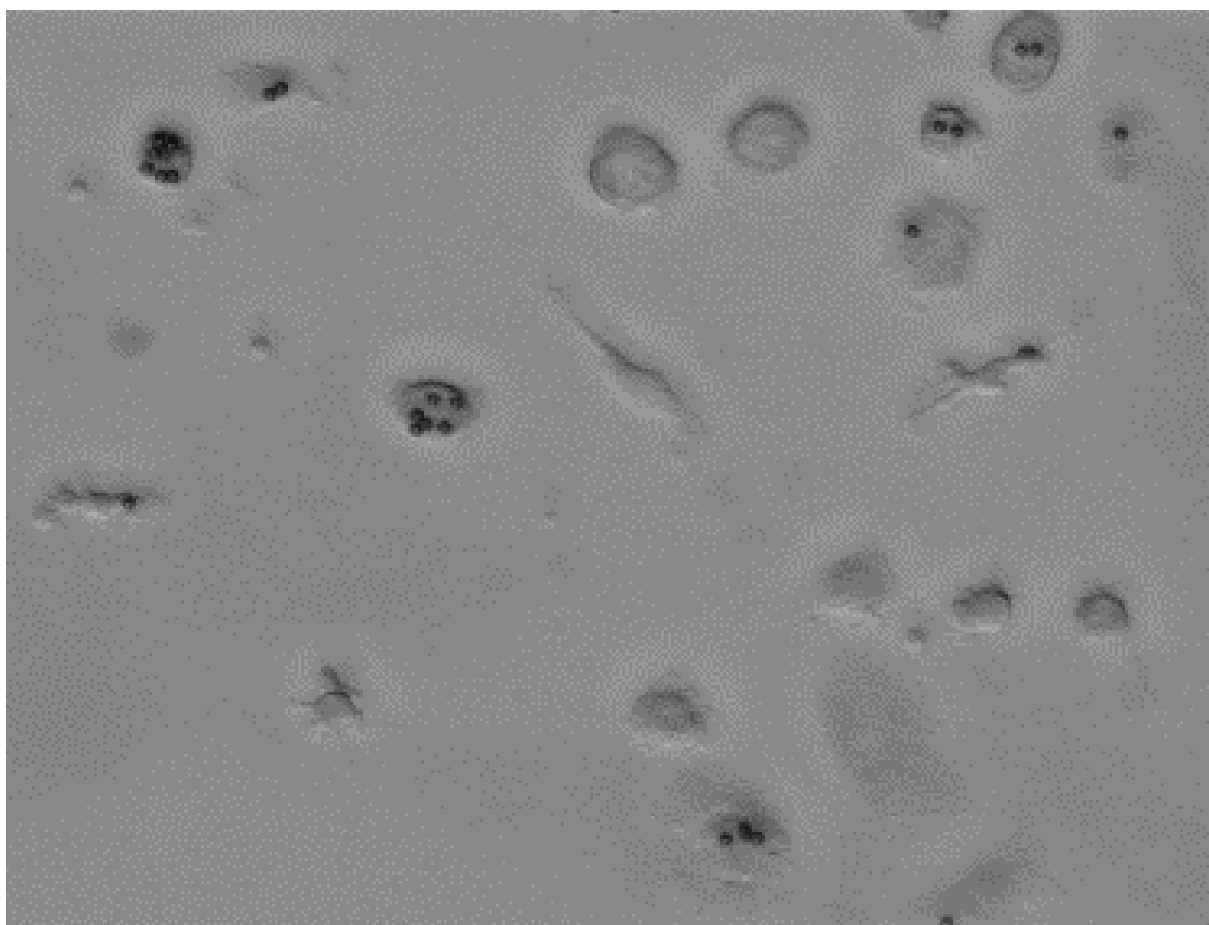
Metoda spočívá v izolaci vrstvy mononukleárních buněk gradientovou centrifugací plné krve pacienta (Histopaque®–1077, Sigma–Aldrich). Výhodou jsou malé ztráty buněk, optimální kultivační koncentrace buněk, finanční nenáročnost a rychlost provedení. Metoda se osvědčila a byla aplikována po celou dobu grantového projektu.

#### **6.4.3.2. Izolace cirkulujících nádorových buněk pomocí imunomagnetické separace (systém AdnaTest)**

Metoda spočívá v izolaci CTC v magnetickém poli pomocí magnetických kuliček konjugovaných s protilátkami proti Ep–CAM a receptor tyrosine–protein kinase erbB–2: HER2, které jsou součástí kitu AdnaTest Prostate Cancer Select. Výhodou je specifická izolace nádorových buněk. Takto izolované buňky na sobě nesou magnetické kuličky a jsou ve vzorku ve velmi malém množství (obrázek 18). Ani v jednom z testovaných vzorků nedošlo k růstu takto izolovaných buněk. Metoda je navíc finančně náročná, a proto bylo od jejího používání upuštěno.



**Obrázek 18. Kultivace CTC s navázanými magnetickými kuličkami (zvětšení 10x)**



#### **6.4.3.3. Metody kultivace cirkulujících nádorových buněk**

Kultivace probíhala z důvodu malého objemu vzorků v 96 jamkových deskách. Z každého vzorku byly připraveny čtyři kultivační jamky. Vzorky byly umístěny v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého. Médium bylo ošetřeno proti růstu bakterií přidáním antimikrobiálních látek (Antibiotic Antimycotic Solution 100x, Sigma–Aldrich).

##### **A) Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médium s 5 % FBS**

Adekvátní množství (200 µl/jamka) RPMI média (RPMI–1640 Medium, Sigma–Aldrich) bylo vytemperováno na 37 °C. Bylo přidáno FBS tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 5 %. Tento postup se pro kultivaci osvědčil nejvíce.

##### **B) RPMI bez séra**

Vzorky byly kultivovány pouze s RPMI médiem bez přidaného FBS. Lepší růst nádorových buněk oproti ostatním buňkám mononukleární frakce v prostředí bez FBS se nepotvrdil.

#### C) RPMI s patientským sérem

Testována byla také záměna FBS za sérum izolované přímo z krve daného pacienta, ale výsledky nebyly lepší než s FBS. Je možné, že transport vzorků a manipulace s nimi se negativně odrazil na kvalitě séra. Nadále jsme proto od tohoto postupu upustili.

#### D) American Type Culture Collection (ATCC)<sup>®</sup> Primary Cell Solutions<sup>™</sup> Media, Supplements and Reagents (Teddington, Velká Británie) s FBS sérem

Zajistili jsme kultivační médium se suplementy navržené přímo pro podporu růstu buněk prostaty. Na jednu kultivační jamku jsme použili 200  $\mu$ l média s 5 % FBS. Při simultánní kultivaci vzorku s tímto a RPMI médiem jsme nepozorovali žádný rozdíl.

#### E) ATCC<sup>®</sup> Primary Cell Solutions<sup>™</sup> Media, Supplements and Reagents, bez FBS séra

Část vzorků jsme vždy kultivovali i bez přidání FBS, abychom ověřili, zda tento způsob nepodpoří růst nádorových buněk oproti leukocytům. Tento předpoklad se nepotvrdil.

#### F) Využití matrigelu

U vybraných vzorků byly kultivační jamky potaženy matrigelem (Basement Membrane Matrix, BD Bioscience, San Jose, CA), který simuluje mezibuněčnou hmotu, a který by CTC měly být schopny rozložit. Tato metoda měla podpořit adhezi a růst nádorových buněk oproti krevním buňkám. Nepozorovali jsme průnik CTC do matrigelu. Je možné, že nádorové CTC v krvi prodělávají EMT a nejsou tak schopny mezibuněčnou hmotu štěpit.

### **6.4.3.4. Metody detekce cirkulujících nádorových buněk**

#### A) Inverzní mikroskop

Buňky byly v průběhu kultivace nejméně dvakrát týdně kontrolovány pomocí inverzního mikroskopu (Novel NIB 100). Byly hodnoceny jejich množství a morfologie.

#### B) Fluorescenční barvení

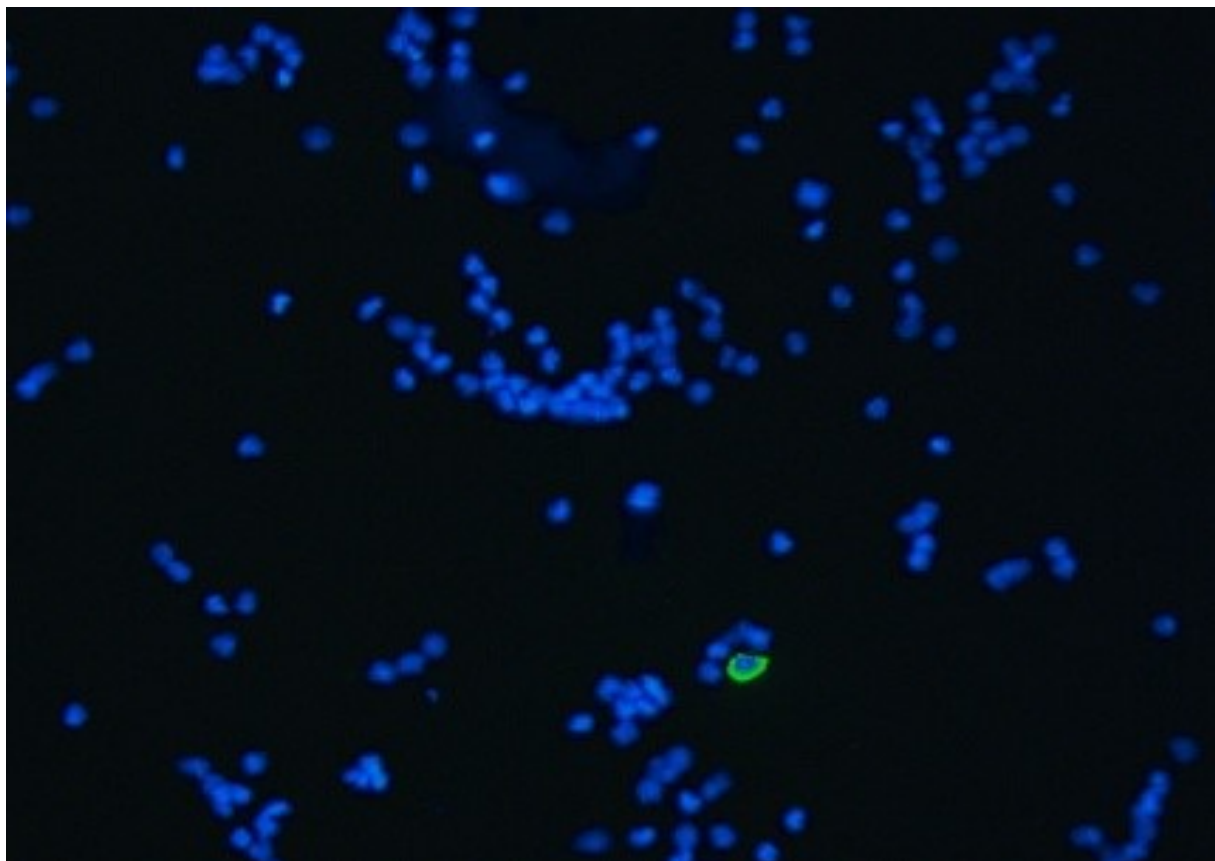
Před kultivací byly vytvořeny tři preparáty (cca 1 milion buněk/preparát) z izolované mononukleární vrstvy. Při ukončení kultivace byl vytvořen kontrolní preparát. Vzorky před a po kultivaci byly barveny protilátkou proti CD45 (leukocytární markér) konjugovanou

s fykoerythrinem (mouse monoclonal to CD45, Exbio) a protilátkou proti pancytokeratinu (epiteliální a tumor asociovaný markér) konjugovanou s fluorescein isothyokyanátem (anti-cytokeratin pan-FITC, Sigma-Aldrich). V preparátech z mononukleární vrstvy byly nalezeny nádorové buňky. V preparátech po kultivaci nebyly nádorové buňky zaznamenány.

### C) CytoTrack

V průběhu projektu byl testován nově vyvíjený přístroj CytoTrack (CytoTrack ApS, Lyngby, Dánsko) určený k detekci ojedinělých buněk metodou skenovací mikroskopie spojené s fluorescenčním barvením (obrázek 19). Přístroj je schopen zaznamenat buňky v preparátu na základě obarvených jader (ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagent with DAPI, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a následně vyhodnotit přítomnost hledaných specifických buněk na základě dalšího barvení (anti-cytokeratin pan-FITC, Sigma-Aldrich). Přestože potenciál přístroje je velký, byla příprava vzorků a práce s ním velmi náročná. V době jeho testování na projektu ještě nebyl přístroj dostatečně citlivý, aby mohl být k detekci CTC rutinně využíván.

**Obrázek 19. Fotografie pořízená přístrojem CytoTrack ze vzorku 47C**



#### D) AdnaTest – reverzní transkriptáza – polymerázová řetězová reakce

Část kultivovaných buněk byla odebrána, lyzována a pomocí kitu AdnaTest Prostate Cancer Detect byla hledána exprese sledovaných markerů, aby byla potvrzena přítomnost nádorových buněk ve vzorku. Vzhledem k finanční náročnosti testu byl prováděn pouze u vzorků, kde došlo k dlouhodobému přežívání buněk nebo k jejich množení (vzorky 2C, 13C, 47C, 54C a 55C). Přestože před počátkem kultivace byly všechny sledované vzorky pozitivní, po kultivaci se přítomnost sledovaných markerů nepotvrdila v žádném z nich.

### 6.5. Izolace mRNA z histologických preparátů karcinomu prostaty

V rámci spolupráce s Ústavem patologie VFN a 1. LF UK v Praze se nám podařilo získat celkem 24 histologických preparátů fixovaných formaldehydem a montovaných v parafínu (FFPE vzorky). U devíti pacientů jsme v době odevzdání grantové zprávy očekávali dohledání preparátů. U sedmi pacientů ztracených v rámci sledování nebyly vzorky FFPE k dispozici.

Z 24 preparátů jsme v 19 případech získali vzorek z tkáně odebrané při biopsii prostaty a u pěti pacientů jsme získali vzorek primární nádorové tkáně odebraný při radikální prostatektomii. U vzorků z biopsie prostaty jsme získali od každého pacienta přibližně 10 mg vzorku, zatímco u primárního vzorku po radikální prostatektomii se nám podařilo získat 4 řezy o tloušťce 10 um pro každého pacienta. Pro každého pacienta byly připraveny vzorky v duplikátech až triplikátech podle dostupného množství histologických vzorků.

#### 6.5.1. Izolace mRNA z fixovaných vzorků – optimalizace metody

Před vlastním zpracováním FFPE vzorků pacientů s CRPC jsme provedli porovnání dvou metod pro izolaci mRNA z šesti kontrolních FFPE vzorků (dva technické replikáty pro každý vzorek). Pro srovnání jsme použili RNeasy FFPE kit (Qiagen, Hilden, Německo) a FFPE RNA Purification kit (Norgen Biotek, Thorold, ON, Kanada).

Obě srovnávané metodiky byly založeny na purifikaci mRNA s využitím centrifugace na kolonkách. Nejdříve byly vzorky FFPE deparafinizovány, následně byla přidána proteináza K, která způsobila uvolnění mRNA ze tkáně. Poté byl přidán etanol a lyzační pufr a směs byla nanášena na kolonku a centrifugována. mRNA obsažená ve vzorku se navázala na kolonku,

kteřá byla v několika krocích promyta puřry k odstranění přebytečných nečistot, proteinů a genomické DNA. V posledním kroku byla mRNA uvolněna z kolonky elučním puřrem.

Vzhledem k očekávaným nízkým koncentracím mRNA jsme provedli stanovení kvantity, kvalita a DNA kontaminace na přístroji Agilent® 2100 Bioanalyzer místo spektrofotometrického stanovení. Izolovaná mRNA byla skladována při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  v RNase free vodě do doby další analýzy.

### 6.5.2. Izolace mRNA z fixovaných vzorků – výsledky

Z kontrolních FFPE vzorků jsme extrahovali mRNA v koncentračním rozmezí 0–127 ng/μl. Integrita izolované mRNA byla hodnocena na základě RIN (RNA integrity number). Hodnota RIN a míra degradace mRNA se lišila mezi jednotlivými vzorky. Tabulka 12 shrnuje naměřené údaje. Z výsledků je patrná odlišná výtěžnost mRNA za použití dvou purifikačních kitů. Je zřejmé, že kit RNeasy FFPE umožňuje purifikovat mRNA ve vyšších koncentracích s vyšší integritou mRNA, což je žádoucí pro následné analýzy. Ideální hodnota RIN pro následné analýzy s purifikovanou mRNA je hodnota 8–10. V našem případě se hodnoty pohybují okolo hodnoty 2. Tyto nízké hodnoty jsou způsobeny délkou a způsobem archivace FFPE vzorků, kdy kvalita mRNA rapidně klesá se zvyšujícím se stářím vzorku. Působením fixačních a montovacích látek (formaldehyd a parafin) dochází k fragmentaci a modifikaci RNA v FFPE vzorcích. mRNA z FFPE má často nižší molekulovou hmotnost. Z těchto důvodů je třeba pro následné analýzy (kvantitativní PCR) využít genově specifické primery a proby, které budou navrženy na kratší amplikony pro RT–PCR.

**Tabulka 12. Výtěžnost mRNA ze vzorků FFPE při použití dvou purifikačních kitů.** FFPE – fixovaný formaldehydem a montovaný v parafínu (formalin-fixed paraffin-embedded); RIN – RNA integrity number.

	RNeasy FFPE (QIAGEN)		FFPE RNA Purification kit (Norgen Biotek)	
	Koncentrace (ng/μl)	RIN	Koncentrace (ng/μl)	RIN
Vzorek 1	27,4	2,0	18,6	1,1
Vzorek 2	41,5	2,3	35,2	1,5
Vzorek 3	98,1	2,3	70,2	2,1
Vzorek 4	62,4	2,0	55,7	1,8
Vzorek 5	126,9	2,8	100,3	4,5
Vzorek 6	0,2	1,0	0,0	1,0

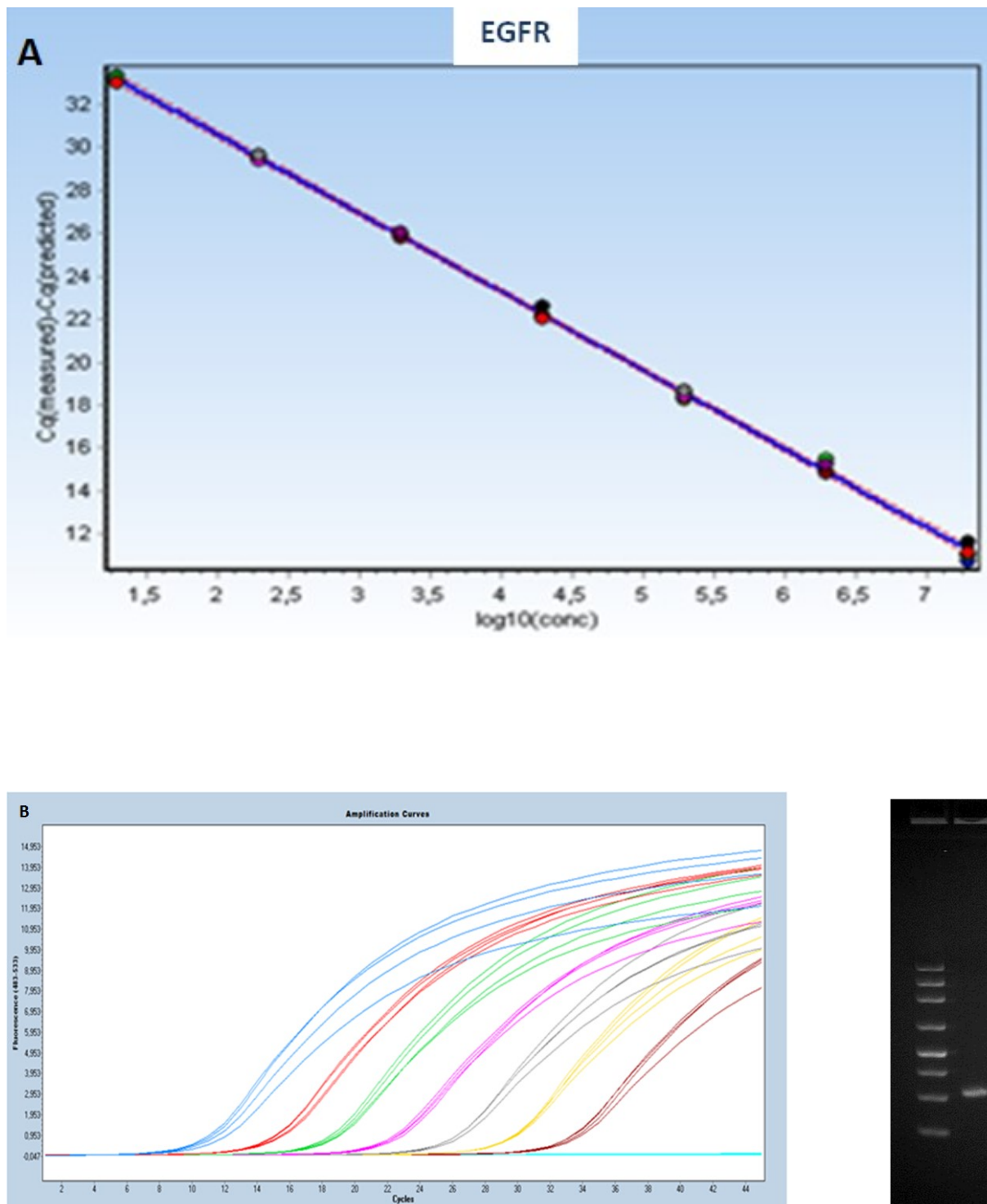
## 6.6. Purifikace mRNA z fixovaných vzorků pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty

U pacientů s CRPC byla RNA z FFPE vzorků purifikována pomocí RNeasy FFPE kitu (QIAGEN) podle protokolu výrobce. Výťažnost a kvalita RNA se lišily v závislosti na vzorcích jednotlivých pacientů. Naměřená koncentrace RNA u vzorků přesahovala  $\geq 18$  ng/ $\mu$ l. Hodnota RIN byla dle očekávání nižší, a to v rozmezí 1,1 – 3,2. U třech pacientů se nám nepodařilo opakovaně izolovat RNA. Tyto vzorky byly archivovány od roku 1999 a obsahovaly velké množství parafinu ve srovnání s množstvím biopticky odebraného nádoru.

### 6.6.1. Testování genové exprese – návrh a optimalizace primerů

Před vlastním testováním genových expresních profilů v CTC a buňkách primárního nádoru (FFPE vzorky) jsme provedli návrh primerů pomocí Primer-BLAST softwaru. Primery byly navrhovány tak, aby byly zahrnuty intron/exon a exon/exon vazby, prostřednictvím kterých nebude docházet v amplifikačních krocích k namnožení úseků případně kontaminující genomické DNA. Syntéza jednotlivých námi navržených oligonukleotidových primerů byla zadána společnosti Integrated DNA Technologies (zastoupení v ČR – společnost KRD s.r.o.). Primery byly následně testovány na zkušebních esejích s použitím komerčně dodávané cDNA (cDNA-huge, TATAA Biocenter AB, Göteborg, Švédsko) z lidské tkáně. Na těchto esejích byla ověřena nejen účinnost primerů, ale také linearita a specificita dané reakce. Účinnost všech testovaných primerů byla  $>80$  %. Sedmibodová standardní křivka byla vytvořena měřením čtyř replikátů pro každý bod. Ředící řada pokrývala rozmezí od  $2e7$  do 20 kopií. Pipetování bylo prováděno roboticky s využitím EpMotion 5070 (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Německo). Pro kvantitativní PCR analýzu byl použit TATAA SYBR® GreenMaster Mix (TATAA Biocenter AB) s využitím Bio-Rad cykleru. Pro kontrolu PCR produktů všech testovaných oligonukleotidových primerů byla použita gelová elektroforéza na 2,2 % gelu. V případě všech testovaných primerů nebyl přítomen žádný nespecifický produkt. Obrázek 20 zobrazuje sedmibodovou standardní křivku a amplifikační křivku s obrázkem gelu při kontrole kvality PCR produktu v rámci testování navržených primerů pro gen EGFR.

Obrázek 20. Sedmibodová standardní křivka účinnosti detekce genu EGFR (A), záznam amplifikační křivky a obrázek gelu při kontrole kvality PCR produktu (B)



## **6.6.2. Testování genové exprese – analýza cirkulujících nádorových buněk a fixovaných vzorků**

Od druhé poloviny roku 2015 probíhala v rámci spolupráce s Laboratoří genové exprese Biotechnologického ústavu Akademie věd ČR analýza veškerých vzorků získaných v průběhu řešení tohoto projektu. Vzhledem k nízkým koncentracím cDNA a fragmentované a málo koncentrované mRNA z FFPE vzorků bylo nezbytné nejdříve provést preamplifikaci se všemi navrženými a optimalizovanými primery. Pro zvýšení specificity a senzitivity amplifikační reakce jsme provedli návrh genově specifických prób a opět provedli jejich optimalizaci. Syntéza těchto prób byla stejně jako u primerů zadána společností Integrated DNA Technologies. V době odevzdání grantové zprávy probíhalo testování těchto prób na vzorcích pacientů. Z důvodu velkého množství získaných dat nebyly výsledky v době odevzdání zprávy k dispozici. Po jejich zpracování a statistickém vyhodnocení bylo plánované sepsání publikace zaměřené na testování genových expresí.

## **7. DISKUZE**

### **7.1. Detekce cirkulujících nádorových buněk a prognóza pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty**

V našem projektu jsme zhodnotili prognostické parametry v nehomogenním souboru pacientů s CRPC. Z klinických parametrů byly pro nepříznivé celkové přežití významné pouze mnohočetné metastázy skeletu. Pacienti s CTC negativním vzorkem před i během chemoterapie měli nejdelší přežití a rozdíl byl statisticky významný vzhledem ke skupině pacientů, u kterých nedošlo k vymizení CTC během léčby docetaxelem. Změna v sérových hladinách PSA také dobře korelovala s nejlepší odpovědí na chemoterapii. Velký počet metod detekce CTC byl testován mimo použití v klinické praxi (82). O přesnosti těchto metod v populaci pacientů s CRPC existují jen omezená data. První a zatím jediný klinicky validovaný krevní test určený k izolaci a detekci CTC, CellSearch<sup>TM</sup>, byl v roce 2008 schválen úřadem FDA pro monitoring pacientů s metastatickým KP na základě výsledků multicentrické prospektivní klinické studie (83). Studie porovnávací AdnaTest a CellSearch<sup>TM</sup> byly provedeny u pacientek s karcinomem prsu. Ve dvou z nich byla shoda v detekci CTC přes 80 % (84, 85) a ve dvou byla shoda v 64 % (86, 87). Pouze jedna z těchto studií byla naplánovaná tak, aby posoudila prognostický význam hodnocení přítomnosti CTC



pomocí systému AdnaTest a současně metodou CellSearch<sup>TM</sup>. V multivariantní analýze stejné kohorty pacientek s metastatickým karcinomem prsu byla pozitivita CTC metodou CellSearch<sup>TM</sup> nezávislým prediktorem celkového přežití, na rozdíl od systému AdnaTest, kde nebyla prokázána korelace positivity testu a celkového přežití (87).

Několik studií prokázalo klinický význam systému AdnaTest u pacientů s KP. Todenhöfer zjistil, že pozitivní nález CTC před zahájením chemoterapie koreloval s horší radiografickou odpovědí na léčbu a také kratší dobou do radiografické progresy po čtyřech cyklech docetaxelu. Přetrvávání positivity CTC během chemoterapie však nemělo žádný vliv ani na jeden z výše uvedených primárních cílů studie (58).

V naší studii jsme prokázali, že pacienti, u nichž byl vzorek krve negativní pro CTC před chemoterapií a zůstal negativní také během léčby, měli nejdelší přežití z celého souboru. Celkové přežití bylo také významně delší než u pacientů, u nichž byly oba vzorky CTC pozitivní. Také ti pacienti, u nichž došlo během léčby k vymizení CTC, měli delší OS než v případě CTC pozitivních pacientů, zde však nebyl rozdíl statisticky signifikantní. Další studie hodnotila eventuální význam detekce CTC pro sledování pacientů buď s nízkou rizikovou nebo vysoce rizikovou KP. Srovnávací skupinou byli dobrovolníci bez podezření na přítomnost KP. U všech zdravých mužů a u pacientů bez metastatického karcinomu byly vzorky negativní pro přítomnost CTC. Ve skupině vysokého rizika byly všichni pacienti, kteří dobře odpovídali na léčbu, také CTC negativní. U všech tří pacientů, kteří měli i přes léčbu ihned progresi onemocnění, však byly CTC detekovány (88).

Nepozorovali jsme významnou korelaci mezi detekcí CTC a nejlepší odpovědí na léčbu podle hodnocení ošetřujícího onkologa. Nicméně všichni pacienti, kteří měli negativní vzorek před léčbou i během léčby, byli v remisi nebo měli stabilizované onemocnění. Podle našeho názoru může být největším přínosem detekce CTC během náročné a často nákladné léčby metastatického CRPC možnost identifikovat ty pacienty, kteří mají špatnou prognózu (v případě přetrvávání positivity CTC i během léčby), jak bylo již dříve prokázáno (83). U těchto pacientů je pak možné doporučit spíše podpůrnou léčbu nebo hledat jiné formy terapie, například nové antiandrogeny, místo toho, aby bylo pokračováno v chemoterapii.

Podle našich znalostí, je tato studie první, která u systému AdnaTest hodnotí prognostický význam stran OS v populaci pacientů s CRPC. Zhodnotili jsme skupinu 39 pacientů indikovaných ke standardní chemoterapii docetaxelem kvůli progresi metastatického onemocnění. Data o sledování byla k dispozici u 30 mužů a u všech byly podány nejméně tři cykly docetaxelu (průměrný počet byl 8 cyklů).

Pozorovali jsme relativně vyšší záchyt CTC pozitivních vzorků ve srovnání s předchozími studiemi, které hodnotily systém AdnaTest u pacientek s karcinomem prsu, a také ve srovnání s pozitivitou CTC při použití metody CellSearch<sup>TM</sup> (83 – 85). To může být vysvětleno stanovením limitní hodnoty nejméně pěti CTC pro potvrzení positivity vyšetření pomocí CellSearch<sup>TM</sup>, což je vyšší limit než detekční limit metody AdnaTest. Vzhledem ke zcela rozdílnému hodnocení positivity vzorků pro CTC nemohou být tyto metody přímo porovnány. Musí být také zdůrazněno, že na rozdíl od metody CellSearch<sup>TM</sup>, systém AdnaTest neprezentuje absolutní počet CTC, ale spíše jejich přítomnost nebo nepřítomnost v krevním vzorku pacienta. Tato metoda poskytuje informaci o expresi nádorově specifických transkriptů ve vzorcích individuálních pacientů a umožňuje další molekulární charakterizaci přítomných CTC (58).

V porovnání s jedinou studií, která použila systém AdnaTest v podobné skupině pacientů s CRPC, jsme zaznamenali vyšší záchyt CTC pozitivních vzorků (86,5 vs. 68,8 %). Jedním z možných vysvětlení je zařazení menšího počtu pacientů s pouhým postižením lymfatických uzlin v naší studii (10,8 vs. 25,0 %) a relativně menším počtem pacientů s zařazených v Todenhöferově práci. Další nedávno publikovaná studie prokázala celkem 46 % CTC pozitivních pacientů v kastroresistentním stádiu identifikovaných metodou CellSearch<sup>TM</sup> a 53 % pacientů s nádorově specifickou mRNA v periferní krvi. U některých pacientů však již byla před vyšetřením podána chemoterapie, což může společně s jinou použitou metodou vysvětlit nižší záchyt CTC oproti naší studii (89). Rozdílné protokoly RT-PCR a definice CTC positivity tak znemožňují srovnání výsledků současných studií. Protokol výrobce a jasně stanovený detekční limit metody AdnaTest by toto porovnání mohl v budoucnu usnadnit.

Sérové markery, například PSA, mají v současnosti u CRPC jen omezené využití. Vztahy mezi detekcí CTC a hladinami sérových markerů nebyly dostatečně studovány a jejich prognostický význam je zatím nejasný. V naší studii sérová hladina PSA korelovala dobře s hodnotami téměř všech nádorově specifických transkriptů CTC jak před chemoterapií, tak i během léčby, nicméně význam této korelace zůstává také nejasný. Zjistili jsme také, že sérová hladina PSA nekoreluje s hodnocením CTC positivity před chemoterapií, nicméně u pacientů, kteří zůstali během léčby CTC pozitivní, byly také současně zjištěny vyšší hladiny PSA. Naopak jsme neprokázali, že by změny v hladině PSA během léčby byly signifikantně odlišné ve skupinách pacientů, kteří zůstali CTC negativní, stali se CTC negativními nebo zůstali CTC pozitivními. Ve výše uvedené studii bylo zjištěno, že změna z „nepříznivého“ počtu

CTC na „příznivý“ počet významně zlepšila prognózu pacientů s ohledem na OS. Navíc změna v počtu CTC korelovala s OS lépe než změna v sérových hladinách PSA (83). Podobně také v naší studii pacienti, kteří byly během léčby CTC negativní, přežívali déle. Na základě našich výsledků nemůžeme uzavřít, že by změna v hladinách PSA byla méně významná než změna v detekci CTC.

V současnosti je také intenzivně studována role EGFR ve vzniku kostních metastáz KP a tento receptor je aktuálně jedním z potenciálních molekulárních cílů jak pro radionuklidové zobrazovací metody, tak pro nová systémová léčiva. V Todenhöferově studii došlo k progresi u všech tří pacientů s pozitivním transkriptem pro EGFR v odběru před zahájením léčby (58). Oproti těmto výsledkům je prognostický význam positivity EGFR v naší studii obtížně hodnotitelný. Také v našem souboru byl u tří pacientů před chemoterapií zjištěn transkript pro EGFR. Dva z nich zemřeli pro progresi onemocnění během 4,1 a 8,4 měsíců. Jeden pacient zemřel kvůli plicní embolii po 16 měsících bez známek progresu karcinomu. Během chemoterapie byl EGFR transkript detekován u jiných tří pacientů. Dva z nich byly naživu v době statistické analýzy (oba s částečnou remisí onemocnění), jeden pacient zemřel kvůli progresi po 22,6 měsících.

Limity naší studie studie spočívají převážně v relativně malém počtu pacientů. Statisticky významný rozdíl v OS tak byl prokázán pouze mezi CTC pozitivními a CTC negativními pacienty během chemoterapie. Rozdíl mezi sérovými hladinami PSA jsme u těchto dvou skupin pacientů nepozorovali.

## **7.2. Detekce genu pro androgenní receptor v cirkulujících nádorových buňkách**

Signální dráha androgenů a jejich receptorů sehraává významnou úlohu v progresi KP. Současná léčba CRPC se zaměřuje na podávání preparátů, které buď potlačují syntézu extragonadálních androgenů nebo přímo působí na AR. V rámci studií bylo zjištěno již více než 70 somatických mutací právě v AR. U časných stádií KP jsou mutace v AR vzácné, ale jejich frekvence výrazně stoupá u pokročilých stádií androgen – závislých nádorů prostaty, kterým je právě CRPC (91). Zdá se, že mutace v AR mohou hrát nejen důležitou roli v progresi nádoru, ale mohou být také zodpovědné za selhání léčby. Proto jsme se rozhodli rozšířit metodickou část o stanovení AR receptoru v izolovaných CTC.

Jedna z prvních prací, která se týká možnosti personalizované léčby metastatického CRPC, se stala prakticky přes noc „bestsellerem“. Američtí autoři hodnotili přítomnost splice-varianty AR-V7 v CTC u pacientů, kteří byli léčeni abirateronem nebo enzalutamidem. Tato forma receptoru nemá vazebnou doménu, která je cílem obou hormonálních preparátů, ale zachovává si aktivitu transkripčního faktoru. V případě pozitivního nálezu AR-V7 byla odpověď na léčbu abirateronem, resp. enzalutamidem horší než při nepřítomnosti AR-V7 (0 vs. 68 %, resp. 0 vs. 52,6 %,  $p=0,004$ ) (47). Ukazuje se také, že v případě resistance na nové antiandrogeny je vhodnější zvolit další linii chemoterapie, tj. cabazitaxel. *In vitro* tento preparát snížil viabilitu stejnou mírou jak u buněk KP senzitivních k enzalutamidu, tak u buněk rezistentních. Buněčná linie negativní pro AR (PC3) vykazovala také podobnou citlivost ke cabazitaxelu (92). Další výzkum bude směřovat k inhibici N-terminální domény AR, která má transkripční aktivitu a nese vazebnou doménu pro antiandrogeny. První studie fáze I/II s molekulou EPI-506 proti N-terminální doméně AR u pacientů progredujících po enzalutamidu nebo abirateronu bude hodnotit bezpečnost, farmakokinetiku a optimální dávku preparátu (93).

Během našeho projektu jsme provedli návrh a optimalizaci specifických primerů pro isoformu AR-V7. Stanovení AR-V7 je prováděno v rámci spolupráce s Laboratoří genové exprese Biotechnologického ústavu AV ČR, výsledky nejsou v současné době k dispozici. Hodnocení isoformy AR-V7 bude na našem pracovišti v budoucnosti prováděno rutinně u všech pacientů indikovaných k léčbě novými hormonálními preparáty.

### 7.3. Kultivace cirkulujících nádorových buněk

V rámci projektu jsme testovali několik metod kultivace CTC z periferní krve pacientů s CRPC. Nejvíce se osvědčila metoda izolace mononukleární vrstvy buněk a její následná kultivace v RPMI médiu s přídavkem FBS. Přes testování různých přístupů se nám nepodařilo potvrdit, že by v některém vzorku došlo k růstu CTC. Ukazuje se, že volba metody izolace je zcela zásadní pro zachycení viabilních nádorových buněk. Jednou z úspěšných metod publikovanou českými autory je izolace podle velikosti buněk pomocí porézní polykarbonátové membrány (MetaCell®, MetaCell s.r.o., Ostrava, Česká republika). Autoři ověřili metodu u pacientek s gynekologickými malignitami a u pacientů s karcinomem žaludku před resekcčním výkonem a lokalizovaným KP. V případě KP bylo jako CTC pozitivní hodnoceno celkem 28 z 55 (52 %) pacientů. Jak jsme uvedli ve výsledcích, metoda AdnaTest nebyla pozitivní ani u jednoho ze čtyř vysoce rizikových KP před radikální

prostatektomií. Ve všech studiích dále pokračovala kultivace obdobně v RPMI médiu s přídavkem fetálního telecího séra (94–96). Vzhledem k velmi malému počtu CTC v periferní krvi je extrémně obtížné založit dlouhodobou kultivaci nebo dokonce permanentní buněčnou linii. V ojedinělých projektech však bylo dokázáno, že i toto je možné, včetně buněčné linie vycházející z CTC u pacienta s CRPC (97). V této studii byly CTC od pacienta metastatickým KP a vysokým počtem CTC v krvi ( $> 100$  buněk / 8 ml krve) vloženy do trojrozměrného organoidu a udrženy v kultivaci po dobu devíti měsíců. Podobné kultury buněčných linií pak mohou sloužit k detekci genetických alterací nebo ověření účinnosti nových léčiv *in vitro*. Téma kultivace CTC si jistě zaslouží další zkoumání a může být velkým přínosem jak pro výzkum KP, tak pro jeho léčbu.

#### 7.4. Izolace mRNA z fixovaných vzorků a testování genové exprese

Karcinom prostaty je ve většině případů primárně hormonálně senzitivní. Podle jedné systematické analýzy několika studií přejde do kastračně rezistentní fáze během pětiletého sledování přibližně 10 – 20 % pacientů. Více než 80 % mužů bude mít v té době metastatické onemocnění. U třetiny pacientů původně nemetastatických dojde během dvou let k diseminaci karcinomu. Střední doba přežití pacientů s CRPC v hodnocených studiích dosahovala 9 – 30 měsíců, souhrnná analýza uvedla střední dobu přežití 14 měsíců (98). V mnoha případech probíhá léčba KP řadu let, od primární radikální léčby, přes relaps onemocnění, adjuvantní lokální léčbu a následně paliativní hormonální terapii. Ve fázi kastrační rezistence zahrnuje léčebný algoritmus podání chemoterapie, nových antiandrogenů, imunoterapie, alfa zářiče radium–223 a v neposlední řadě zařazení do klinických studií s dalšími antiandrogeny, malými molekulami nebo monoklonálními protilátkami. Během mnoha linií léčby dochází zákonitě ke genetickým změnám, které odlišují primární tumor od karcinomu v kastračně rezistentní fázi.

V řadě studií byly k určení prognózy pacientů s karcinomem prostaty použity FFPE vzorky, neboť se jedná o dostupnou a dlouho skladovatelnou tkáň, ačkoliv extrahovaná mRNA může mít nižší kvalitu. Dostupné práce však ukazují, že degradovaná mRNA z FFPE vzorků umožňuje dostatečnou analýzu genové exprese pomocí metody RT–PCR (99, 100). Rozsah této diskuze nemůže postihnout všechny aspekty významu analýzy genové exprese u pacientů s KP, zmíníme proto jednu přehlednou práci, která hodnotila prognostický význam microRNA a proteinových markerů získaných z FFPE (101). Ukazuje se, že nejméně 40 různých microRNA se může uplatnit v diagnostice nebo určení prognózy u KP, včetně jejich

kombinací s ohledem na predikci časného relapsu onemocnění (102). Také velké množství proteinů bylo zkoumáno v rámci diagnostiky, určení prognózy nebo odpovědi na léčbu. Mezi slibné bílkoviny asociované s horší prognózou patří cysteine–rich secretory protein 3, Ki67, B7–H3, Bcl–2 a marker neuroendokrinní diferenciaci chromogranin A (101). Změny v genové expresi byly dále zkoumány i v našem projektu s cílem identifikovat takový genetický profil CTC, který by predikoval horší odpověď na léčbu docetaxelem a kratší celkové přežití pacientů s CRPC.

## 8. ZÁVĚR

Cílem této dizertační práce bylo popsání problematiky CTC u pacientů s metastatickým CRPC. Pro základní stanovení CTC v periferní krvi byla vybrána metoda, založená na kombinaci imunomagnetické separace s RT–PCR. Využili jsme komerční a certifikovanou technologii AdnaTest ProstateCancer Select/Detect. Pomocí této metody jsme vyšetřili původně 39 pacientů s CRPC před zahájením chemoterapie docetaxelem a také během léčby. V průběhu grantového projektu jsme indikaci k vyšetření CTC rozšiřovali, včetně pilotních projektů, které se týkaly jiné klinické situace. Celkem bylo tedy vyšetřeno 41 pacientů s CRPC, čtyři pacienti po radikální prostatektomii a dva pacienti s benigní hyperplazií prostaty (negativní kontroly). Celkem bylo vyšetřeno 77 vzorků periferní krve pacientů s CRPC, z toho 41 vzorků bylo odebráno před zahájením a 33 vzorků v průběhu chemoterapie.

V průběhu výzkumné práce jsme pracovali s následujícími hypotézami:

***Hypotéza č. 1: pacienti s CRPC a přítomností CTC v periferní krvi mají horší prognózu stran OS.*** Analýza údajů o sledování byla provedena celkem u 37 pacientů. Z celkem 33 pacientů, u nichž byly validní údaje o sledování, vstoupilo do analýzy OS 30 mužů. Střední doba do úmrtí od zařazení do studie byla 15,3 měsíců. Během sledování zemřelo celkem 20 pacientů. V důsledku progresu KP zemřelo 15 (75 %) mužů. Střední doba OS skupiny 30 hodnocených pacientů byla 15,3 (0,9–35,2) měsíců. Statisticky významný rozdíl v délce přežití byl pouze u skupiny pacientů s žádnými nebo minimálním počtem kostních metastáz proti skupině s mnohočetným metastatickým postižením skeletu. Ostatní klinické parametry nebyly ve vztahu k OS statisticky významné. Pacienti s hodnotou PSA před chemoterapií nižší než medián přežívali déle než pacienti s vyšší hodnotou PSA, obdobný trend byl pozorován u pacientů s hodnotou PSA nižší než medián během chemoterapie. V obou

případech však nebyl rozdíl v OS statisticky signifikantní. Nezjistili jsme žádný rozdíl v přežití pacientů, kteří byli před zahájením chemoterapie hodnoceni jako CTC pozitivní proti CTC negativním pacientům. Pacienti s CTC negativním vzorkem během chemoterapie přežívali déle než pacienti, kteří zůstali CTC pozitivní i během podání docetaxelu, rozdíl v OS však nebyl statisticky významný. Nejdelší přežití bylo zaznamenáno u čtyř pacientů, kteří byli hodnoceni jako CTC negativní v obou odběrech. Celkové přežití u těchto čtyř pacientů bylo významně delší než u skupiny pacientů, kteří byli v obou odběrech hodnoceni jako CTC pozitivní (střední doba 19,2 vs. 12,7 měsíců;  $p=0,0228$ ). Součástí grantového projektu bylo také zhodnocení eventuálního klinického významu absolutních hodnot jednotlivých nádorově specifických transkriptů ve vztahu k OS. Kromě hodnot transkriptů PSA a PSMA během chemoterapie nebyl žádný z CTC transkriptů pro OS statisticky významný.

***Hypotéza č. 2: u izolovaných CTC lze zhodnotit expresi zkoumaných genů a určit kombinaci exprimovaných genů predikující odpověď na chemoterapii.*** V roce 2015 náš tým publikoval dílčí výsledky projektu se zaměřením na charakterizaci genové exprese u CTC. Tento projekt byl navržen tak, aby studoval vlastnosti PCR fragmentů detekovaných pomocí technologie Bioanalyzer Agilent 2100 (DNA Labchip 1000, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Navzdory relativně častému použití této metody zatím chybí komplexní analýza výsledků v rámci dlouhodobého projektu. Jako finální krok v detekci CTC byla použita komerčně dostupná technologie Bioanalyzer Agilent 2100 pro stanovení přítomnosti fragmentů PCR generovaných pomocí multiplex PCR. Údaje od 30 pacientů s KP získaných během dvouletého výzkumu byly analyzovány pro určení správnosti a přesnosti stanovení velikosti fragmentů PCR. Další experimenty byly provedeny za účelem prokázání přesnosti a robustnosti stanovení koncentrace fragmentů PCR. Schopnost opakování stanovení koncentrace PCR fragmentů byla stanovena na 15 % a po normalizaci dosáhla pouze 5 %. Robustnost stanovení koncentrace PCR fragmentů dosáhla  $17 \pm 2$  %. Po normalizaci dosáhla relativní standardní odchylka 4 %. Autoři uzavírají, že charakteristiky stanovené v jejich studii jsou v souladu se specifikacemi výrobce stanovenými pro diagnostický vzorek. Určení koncentrace se však může lišit v závislosti na přípravě čipu, skladování a koncentraci každého vzorku. Patnáctiprocentní rozdíl v opakovatelnosti stanovení koncentrace se ukazuje být částečně proporcí a může být potlačen správnou normalizací (103).

***Hypotéza č. 3: expresi zkoumaných genů lze hodnotit i v histologickém preparátu a lze posoudit změnu genové exprese v době diagnózy a ve stádiu CRPC.*** U pacientů s CRPC byla RNA z FFPE vzorků purifikována pomocí RNeasy FFPE kitu (QIAGEN) podle protokolu

výrobce. Tyto vzorky byly archivovány od roku 1999 a obsahovaly velké množství parafinu ve srovnání s množstvím biopticky odebraného nádoru. Před vlastním testováním genových expresních profilů v FFPE vzorcích jsme provedli návrh primerů pomocí Primer-BLAST softwaru. Primery byly následně testovány na zkušebních esejích s použitím komerčně dodávané cDNA z lidské tkáně. Na těchto esejích byla ověřena nejen účinnost primerů, ale také linearita a specificita dané reakce. Obrázek 20 pak zobrazuje sedmibodovou standardní křivku a amplifikační křivku s obrázkem gelu při kontrole kvality PCR produktu v rámci testování navržených primerů pro gen EGFR. Od druhé poloviny roku 2015 probíhala v rámci spolupráce s Laboratoří genové exprese Biotechnologického ústavu Akademie věd ČR analýza veškerých vzorků získaných v průběhu řešení tohoto projektu. Pro zvýšení specificity a senzitivity amplifikační reakce jsme provedli návrh genově specifických prób a opět provedli jejich optimalizaci. V době odevzdání grantové zprávy probíhalo testování těchto prób na vzorcích pacientů. Z důvodu velkého množství získaných dat nebyly výsledky v době odevzdání zprávy k dispozici.

**Kultivace CTC.** V rámci projektu jsme testovali několik metod kultivace CTC z periferní krve pacientů s CRPC. Nejvíce se osvědčila metoda izolace mononukleární vrstvy buněk a její následná kultivace v RPMI médiu s přidavkem FBS. Ukazuje se, že volba metody izolace je zcela zásadní pro zachycení viabilních nádorových buněk. Téma kultivace CTC si jistě zaslouží další zkoumání a může být velkým přínosem jak pro výzkum KP, tak pro jeho léčbu.

## 9. SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha č. 1:** Čapoun O, Mikulová V, Jančíková M, Honová H, Kološtová K, Sobotka R, Michael P, Zima T, Hanuš T, Soukup V. Prognosis of Castration-resistant Prostate Cancer Patients - Use of the AdnaTest® System for Detection of Circulating Tumor Cells. *Anticancer Res.* 2016 Apr;36(4):2019-26. **IF 1,937.**

**Příloha č. 2:** Čapoun O., Soukup V., Mikulová V., Jančíková M., Honová H., Kološtová K., Zima T., Hanuš T.: Cirkulující nádorové buňky a prognóza karcinomu prostaty. *Cas Lek Cesk.* 2014; 153(2):72-77. **IF nemá.**

**Příloha č. 3:** Škereňová M, Mikulová V, Čapoun O, Švec D, Kološtová K, Soukup V, Honová H, Hanuš T, Zima T. Gene Expression Analysis of Immunomagnetically Enriched



Circulating Tumor Cell Fraction in Castration-Resistant Prostate Cancer. Mol Diagn Ther. 2018 May 3. doi: 10.1007/s40291-018-0333-0. [Epub ahead of print]. **IF 2,716.**

**Příloha č. 4:** Škereňová M, Mikulová V, Čapoun O, Zima T, Tesařová P. Circulating tumor cells and serum levels of MMP-2, MMP-9 and VEGF as markers of the metastatic process in patients with high risk of metastatic progression. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2017 Sep; 161(3):272-280. **IF 1,087.**

**Příloha č. 5:** Škereňová M, Mikulová V, Čapoun O, Zima T. The characterization of four gene expression analysis in circulating tumor cells made by Multiplex-PCR from the AdnaTest kit on the lab-on-a-chip Agilent DNA 1000 platform. Biochem Med (Zagreb). 2016;26(1):103-13. **IF 2,934.**

## **10. PŘEHLED AKTIVNÍ ÚČASTI NA KONGRESECH A KONFERENCÍCH**

**2012 - Výroční konference SUS, Martin:** Detekce cirkulujících nádorových buněk a sledování exprese genů u kastročně rezistentního karcinomu prostaty – pilotní studie

**2012 - Výroční konference ČUS, Ostrava:** Analýza cirkulujících nádorových buněk u CRPC.

**2013 - Výroční konference ČUS, Karlovy Vary:** Hladina prostatického specifického antigenu a detekce cirkulujících nádorových buněk u kastročně rezistentního karcinomu prostaty.

**2013 - EAU 13th Central European Meeting, 4-6.10.2013, Praha, Česká republika:** Prostate-specific antigen level and detection of circulating tumour cells in castration-resistant prostate cancer.

**2014 - Výroční konference SUS, Nitra:** Hladina prostatického specifického antigenu a detekce cirkulujících nádorových buněk u kastročně rezistentního karcinomu prostaty.

**2014 - 29th Annual EAU Congress, Stockholm, Švédsko:** Prostate-specific antigen level and detection of circulating tumour cells in castration-resistant prostate cancer.

**2014 - 6th European Multidisciplinary Meeting on Urological Cancers (EMUC):** Prostate-specific antigen level and detection of circulating tumour cells in castration-resistant prostate cancer.

**2016 - CTC Meeting Prague, Praha, Česká republika:** Cirkulující nádorové buňky ve vztahu k urologickým malignitám.

**2016 - EAU 16th Central European Meeting, Vídeň, Rakousko:** Circulated tumour cells in oncurology.

**2016 - Výroční konference ČUS, České Budějovice:** Prognóza pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty - využití detekce cirkulujících nádorových buněk.

**2017 - Diagnostický a prognostický význam biomarkerů u uro-onkologických onemocnění, SLČ, Praha:** Význam biomarkerů u karcinomu prostaty.

## 11. OCENĚNÍ

### **First Richard Wolf Award for Best Poster Presentation:**

Čapoun O., Mikulová V., Jančíková M., Honová H., Kološtová K., Zima T., Hanuš T., Soukup V. Prostate-specific antigen level and detection of circulating tumour cells in castration-resistant prostate cancer. EAU 13th Central European Meeting, 4-6.10.2013, Praha, Česká republika.

### **První cena České urologické společnosti za publikaci v žurnálu s IF v roce 2017:**

Čapoun O, Mikulová V, Jančíková M, Honová H, Kološtová K, Sobotka R, Michael P, Zima T, Hanuš T, Soukup V. Prognosis of Castration-resistant Prostate Cancer Patients - Use of the AdnaTest® System for Detection of Circulating Tumor Cells. Anticancer Res. 2016 Apr;36(4):2019-26.

## 12. VÝZKUMNÉ PROJEKTY

**2011–2014:** „Stanovení panelu nových nádorových markerů u vybraných onkologických onemocnění“. Spoluřešitel projektu, grant TIP Ministerstva průmyslu a obchodu ČR, č. FR-TI3/666. Hlavní řešitel prof. MUDr. Tomáš Hanuš, DrSc.

**2011–2015:** „Detekce cirkulujících nádorových buněk a sledování exprese genů u kastročně rezistentního karcinomu prostaty jako součást individualizace systémové

**léčby**“. Spoluřešitel projektu, grant IGA MZ ČR č. NT-12205-5. Hlavní řešitel doc. MUDr. Viktor Soukup, PhD.

**2011–2015: „Využití mikro RNA, mRNA a volné DNA pro časnou neinvazivní detekci a stanovení prognózy u pacientů s karcinomem močového měchýře“**. Spoluřešitel projektu, grant IGA MZ ČR č. NT-12417-5. Hlavní řešitel prof. MUDr. Marek Babjuk, CsC.

**od 2015 : „Diagnostický a prognostický význam vybraných laboratorních a imunohistochemických markerů u nejčastějších urologických malignit – karcinom prostaty“**. Spoluřešitel projektu, výzkumný projekt MZ ČR Institucionální podpora RVO-VFN64165/2015. Hlavní řešitel prof. MUDr. Tomáš Hanuš, DrSc.

### 13. POUŽITÁ LITERATURA

1. Mužík J., Dušek L., Babjuk M., Kubásek M., Fínek J., Petruželka L. Uroweb – webový portál pro analýzu a vizualizaci epidemiologie, diagnostiky a léčby urologických malignit [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2018. [cit. 2018-04-15]. Dostupný z WWW: <http://www.uroweb.cz>. ISSN 1804-6371. Verze 1.6d.
2. Grossmann M. et al. (2013) *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **27(4)**:603-16.
3. Mottet N. et al. (2017) *Eur Urol.* **71(4)**:618-629.
4. Brierley JD et al eds. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 8th Edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2017: 272s. ISBN: 978-1-119-26357-9
5. Epstein JI. et al. (2016) *Eur Urol.* **69(3)**:428-35.
6. D'Amico AV. et al. (1998) *JAMA* **280(11)**:969-74.
7. Cornford P. et al. (2017) *Eur Urol.* **71(4)**:630-42.
8. Mottet N. et al. (2011) *Eur Urol.* **59(4)**: 572-83.
9. Bandini M. et al. (2018) *Int Urol Nephrol* **50(1)**:71-8.
10. Halabi S. et al. (2014) *J Clin Oncol.* **32(7)**:671-7.
11. Ravi PK et al. (2014) *J Clin Oncol* **32:5s** (suppl; abstr 5013).
12. Zhao J et al. (2018) *BJU Int.* **May 17**. doi: 10.1111/bju.14398. [Epub ahead of print].
13. Čapoun O. (2014) *Urol. praxi* **15(2)**: 55-60.
14. Ashworth TR. (1869) *The Medical Journal of Australia* **14**:146-147.

15. Paget S. (1889) *Lancet* **133**:571–573.
16. Patel LR. et al. (2011) *Future Oncol* **7(11)**:1285–1297.
17. Fidler IJ. (1970) *J Natl Cancer Inst.* **45(4)**:773-82.
18. van Zijl F. et al. (2011) *Mutat Res.* **728(1-2)**:23-34.
19. Thiery JP. et al. (2009) *Cell* **139(5)**:871–890.
20. Tam WL, Weinberg RA. (2013) *Nat Med.* **19(11)**:1438-49.
21. Parri M, Chiarugi P. (2010) *Cell Commun Signal.* **7**:8-23.
22. Gadea G. et al. (2007) *J Cell Biol.* **178(1)**:23-30.
23. Friedl P, Wolf K. (2010) *J Cell Biol.* **188(1)**:11-9.
24. Giampieri S. et al. (2009) *Nat Cell Biol.* **11(11)**:1287-96.
25. Condeelis J, Segall JE. (2003) *Nat Rev Cancer.* **3(12)**:921-30.
26. Hegerfeldt Y. et al. (2002) *Cancer Res.* **62(7)**:2125-30.
27. Alitalo K. et al. (2005) *Nature.* **438(7070)**:946-53.
28. Hicklin DJ, Ellis LM. (2005) *J Clin Oncol.* **23(5)**:1011-27.
29. Wyckoff JB. et al. (2007) *Cancer Res.* **67(6)**:2649-56.
30. Tsuji T. et al. (2009) *Cancer Res.* **69(18)**:7135-9.
31. Im JH. et al. (2004) *Cancer Res.* **64(23)**:8613-9.
32. Nash GF. et al. (2002) *Lancet Oncol.* **3(7)**:425-30.
33. Joyce JA, Pollard JW. (2009) *Nat Rev Cancer.* **9(4)**:239-52.
34. Mundy GR. (2002) *Nat Rev Cancer.* **2(8)**:584-93.
35. Egeblad M, Werb Z. (2002) *Nat Rev Cancer.* **2(3)**:161-74.
36. Gaggioli C. et al. (2007) *Nat Cell Biol.* **9(12)**:1392-400.
37. van Zijl F. et al. (2009) *Future Oncol.* **5(8)**:1169-79.
38. Condeelis J, Pollard JW. (2006) *Cell* **124(2)**:263-6.
39. Duda DG et al. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107(50)**:21677-82.
40. Shiozawa Y. et al. (2010) *Neoplasia.* **12(2)**:116-27.
41. Meng S. et al. (2004) *Clin Cancer Res.* **10(24)**:8152-62.
42. Racila E. et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95(8)**:4589-94.
43. Woelfle U. et al. (2004) *Clin Cancer Res.* **10(8)**:2670-4.
44. Gao XL. et al. (2017) *Onco Targets Ther.* **10**:5219-5228.
45. Kanwar N, Done SJ. Molecular Profiling and Significance of Circulating Tumor Cell Based Genetic Signatures. In: Magbanua MJM, Park JW, eds. Isolation and molecular

characterization of circulating tumor cells. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2017: 143-167. ISBN 978-3-319-55947-6 (eBook)

46. Godbole AM, Njar VC. (2011) *Prostate Cancer*. **2011**:918707.
47. Antonarakis ES. et al. (2014) *N Engl J Med*. **371(11)**:1028-38.
48. Diamandis EP. (1996) *Anticancer Res*. **16(6C)**:3983-4.
49. Virgolini I. et al. (2018) *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **45(3)**:471-495.
50. Owczarek W et al. (2017) *Postepy Dermatol Alergol*. **34(5)**:418-428.
51. van der Toom EE. et al. (2016) *Oncotarget*. **7(38)**:62754-62766.
52. Tibbe AG. et al. (2007) *Cytometry A*. **71(3)**:154-62.
53. Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. (2010) *Methods*. **50(4)**:289-97.
54. Kim MS. et al. (2012) *Lab Chip*. **12(16)**:2874-80.
55. Gogoi P. et al. (2016) *PLoS One*. **11(1)**: e0147400.
56. Poklepovic AS. et al. (2012) *J Clin Oncol*. **30**: abstr e21058.
57. Danila DC. et al. (2011) *Clin Cancer Res*. **17(12)**:3903-12.
58. Todenhöfer T. et al. (2012) *Anticancer Res*. **32(8)**:3507-13.
59. Park MH. et al. (2017) *J Am Chem Soc*. **139(7)**:2741-2749.
60. Naume B. et al. (2004) *Cytotherapy*. **6(3)**:244-52
61. Robinson JP. (2005) *Curr Protoc Cytom*. **Chapter 12**: Unit 12.1.
62. Ao Z. et al. (2017) *Methods Mol Biol*. **1634**:235-246.
63. Beltran H et al. (2016) *Clin Cancer Res*. **22(6)**:1510-9.
64. Taylor SC. et al. (2017) *Sci Rep*. **7(1)**:2409.
65. Atale N. et al. (2014) *J Microsc*. **255(1)**:7-19.
66. Pantel K, Alix-Panabières C. (2013) *Cancer Res*. **73(21)**:6384-8.
67. Miller MC. et al. (2010) *J Oncol 2010*; **2010**:617421.
68. Danila DC. et al. (2007) *Clin Cancer Res*. **13(23)**:7053–7058.
69. Anand A. et al. (2010) *Journal of Clinical Oncology* **28:15\_suppl**, 4546-4546.
70. Scher HI. et al. **European Cancer Congress 2013**.
71. Armstrong AJ. et al. (2013) *Clin Genitourin Cancer*. **11**:397–406.
72. Lee RJ. et al. (2013) *Clin Cancer Res*. **19(11)**:3088–3094.
73. Shamash J et al. (2012) *Clin Cancer Res*. **18(8)**:2352–2359.
74. Goldkorn A. et al. (2014) *J Clin Oncol*. **32(11)**:1136-42.
75. Kollermann J. et al. (2008) *J Clin Oncol*. **26(30)**:4928–4933.

76. Maas M. et al. (2017) *Asian J Androl.* 2017 **Aug 22**. [Epub ahead of print]
77. Eisenhauer EA. et al. (2009) *Eur J Cancer.* **45(2)**:228-47.
78. AdnaGen. AdnaTest ProstateCancerDetect manual. Dostupné na:  
[http://www.adnagen.com/m088v01\\_upload/150520\\_ProstateCancerDetect\\_en\\_IVD.pdf](http://www.adnagen.com/m088v01_upload/150520_ProstateCancerDetect_en_IVD.pdf).  
Přístup 29.8.2018.
79. AdnaGen. AdnaTest ProstateCancerSelect manual. Dostupné na:  
[http://www.adnagen.com/m088v01\\_upload/150520\\_ProstateCancerSelect\\_en\\_IVD.pdf](http://www.adnagen.com/m088v01_upload/150520_ProstateCancerSelect_en_IVD.pdf).  
Přístup 29.8.2018.
80. Kaplan E, Meier P. (1958) *J Am Stat Assoc* **53**:457–481.
81. Cox DR. (1972) *J R Stat Soc* **34**:187–220.
82. Mikulová V. et al. (2011) *Folia Biol (Praha)* **57(4)**:151-61.
83. de Bono JS. et al. (2008) *Clin Cancer Res.* **14(19)**:6302-9.
84. Andreopoulou E. et al. (2012) *Int J Cancer.* **130(7)**:1590-7.
85. Van der Auwera I. et al. (2010) *Br J Cancer.* **102(2)**:276-84.
86. Fehm T. et al. (2010) *Breast Cancer Res Treat.* **124(2)**:403-12.
87. Müller V. et al. (2012) *Breast Cancer Res.* **14(4)**:R118.
88. Albino G. et al. (2013) *Arch Ital Urol Androl.* **85(4)**:164-9.
89. Danila DC. et al. (2014) *Eur Urol.* **65(6)**:1191-7.
90. Carlsson J. (2012) *Tumour Biol.* **33(3)**:653-9.
91. Steinestel J. et al. (2015) *Oncotarget.* **Apr 23**. [Epub ahead of print]
92. Al Nakouzi N. et al. (2015) *Eur Urol.* **68(2)**:228-35.
93. Montgomery RB. et al. (2015) *J Clin Oncol* **33**: (suppl; abstr TPS5072).
94. Kolostova K et al. (2015) *Cytotechnology.* **Apr 11**. [Epub ahead of print]
95. Kolostova K. et al. (2014) *Anticancer Res.* **34(7)**:3641-6.
96. Kolostova K. et al. (2015) *Am J Transl Res.* **15;7(7)**:1203-13.
97. Gao D. et al. (2014) *Cell.* **159(1)**:176-87.
98. Kirby M. et al. (2011) *Int J Clin Pract.* **65(11)**: 1180–1192.
99. Fleige S. et al. (2006) *Molecular aspects of medicine.* **27(2–3)**:126–39.
100. Godfrey TE. et al. (2000) *The Journal of molecular diagnostics: JMD.* **2(2)**:84–91.
101. Sequeiros T. et al. (2013) *Biomed Res Int.* **2013**:283635.
102. Schubert M. et al. (2013) *PLoS ONE.* **8(6)**:e65064.
103. Skerenova M. et al. (2016) *Biochemia Medica.* **26(1)**:103-113.