

Abstrakt

Úvod: Cirkulující nádorové buňky (CTC) a diseminované nádorové buňky (DTC) jsou zodpovědné za rozvoj metastazování nádorů. Detekce CTC z periferní krve (tzv. liquid biopsy) může přispět k diagnostice a volbě terapie u pacientů, u kterých není možné získat vzorky nádorové tkáně při chirurgickém zákroku. Obdobně monitorování efektu chirurgické léčby pomocí CTC a záchyt časné rekurence nádorového onemocnění představují další možnosti jejich využití.

Cíle: Cílem práce bylo izolovat CTC/DTC z krve či peritoneální laváže pacientů s různými druhy solidních tumorů a následně se pokusit o jejich kultivaci *in vitro* a cytomorfológickou charakterizaci. Práce měla zodpovědět následující hypotézy:

- I. Vyskytují se CTC u různých druhů solidních tumorů?
- II. Odráží se ve výskytu CTC stádium nádorového onemocnění?
- III. Lze využít CTC k molekulární charakterizaci nádorového onemocnění?
- IV. Je možné vizualizovat CTC/DTC ve viabilním stavu?

Metodika: CTC/DTC detekce proběhla celkem u 288 pacientů v průběhu chirurgické či systémové léčby: u 24 s karcinomem pankreatu, 165 s karcinomem prsu, 98 s kolorektálním karcinomem a u 1 s neuroendokrinním tumorem (NET) tenkého střeva. Pro obohacení CTC byl použit separační protokol založený na velikosti buněk. Po jednoduché filtraci krve přes polykarbonátovou membránu s póry byly zachycené buňky (větší než 8 μm) inkubovány *in vitro* po krátkou dobu (3–5 dnů) či dlouhodobě (déle než 5 dnů). Po krátkodobé inkubaci byly buňky barveny histochemickým barvením fixovaných buněk, imunohistochemickým barvením pomocí specifických protilátek k identifikaci buněčných organel či jádra a vitálními fluorescenčními barvivy. Přítomnost CTC byla vyhodnocena na základě cytomorfológické charakterizace podle definovaných histopatologických kritérií. Část vzorků ($n = 43$) byla využita k identifikaci CTC pomocí molekulárně-biologických metod. Ve frakci zachycených buněk byla u pacientek s karcinomem prsu provedena analýza genové exprese pomocí multimarkerového panelu genů spojených s tumorigenním či terapeutickým potenciálem. Celkem 20 pacientek bylo v průběhu léčby pravidelně sledováno se zaměřením na status HER2 a ER. Výskyt CTC/DTC (prokázaná přítomnost CTC/DTC v testovaných vzorcích krve či peritoneální laváže) byl u kohorty pacientů srovnán se stádium nádorového onemocnění.

Výsledky: Přítomnost CTC byla prokázána u 216 (75,3 %) testovaných vzorků krve pacientů s karcinomem prsu, kolorekta a pankreatu. Dále CTC/DTC byly inkubovány jako krátkodobé i dlouhodobé buněčné kultury. Některé izolované CTC/DTC (kolorektální karcinom, NET) byly kultivovány *in vitro* déle než 6 měsíců. Pozitivita CTC nekorelovala se stadiem onemocnění, velikostí nádoru ani postižením lymfatických uzlin. Stejné procento positivity CTC bylo pozorováno u metastatických i non-metastatických (66,7 % vs. 66,7 %) pacientů s karcinomem pankreatu. Dále se ukázalo, že charakter CTC se během sledovaného období probíhajícího onemocnění měnil. Z terapeutického hlediska bylo nejvýznamnějším zjištěním, že status humánního epidermálního receptoru 2 (HER2) a estrogenového receptoru (ER) u CTC se může lišit od stavu těchto receptorů u primárního tumoru.

Závěr: Použitá izolační metoda založená na velikosti umožnila zavedení životaschopných buněčných kultur CTC *in vitro* u pacientů s různými druhy solidních tumorů. Po obohacení CTC bylo možné tyto živé nádorové buňky vizualizovat a dále analyzovat i v průběhu léčby pacientů.