

Razvoj raziskav cirkulirajočih tumorskih celic pri raku dojk na Onkološkem inštitutu Ljubljana

Advancing breast cancer circulating tumour cell research at the Institute of Oncology Ljubljana

Jesenko Tanja^{1,2}, Grašič Kuhar Cvetka^{1,2}, Pišljar Živa¹, Miceska Simona¹, Kloboves-Prevodnik Veronika^{1,3}, Čemažar Maja^{1,4}

¹Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

²Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

³Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

⁴Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju, Polje 42, 6310 Izola

Korespondenca: znan. sod. dr. Tanja Jesenko, univ. dipl. biokem.

E-mail: tjesenko@onko-i.si

Poslano / Received: 5.11.2024

Sprejeto / Accepted: 16.11.2024

doi:10.25670/oi2024-010on

IZVLEČEK

Cirkulirajoče tumorske celice (CTC) so postale pomemben biološki označevalec pri raku dojk, saj omogočajo vpogled v razvoj in napredovanje razsejane bolezni ter spremljanje odziva na zdravljenje. Zaradi njihove izjemne redkosti in kompleksnosti sestave krvi, v kateri se nahajajo, sta njihova izolacija in karakterizacija velik izziv. Posebne metode izolacije omogočajo obogatitev CTC iz vzorca krvi in olajšajo nadaljnjo analizo. Na Onkološkem inštitutu Ljubljana smo leta 2018 začeli s prvimi koraki v smeri razvoja preproste metode za izolacijo in karakterizacijo CTC, ki bi omogočala prepoznavanje teh celic s citopatološkimi analizami. Ocenili smo dve različni metodi izolacije CTC pri bolnicah z rakom dojk, ki temeljita na različnih pristopih. Prva metoda temelji na bioloških lastnostih celic, kot je izražanje epiteljskega označevalca celične adhezije (EpCAM), medtem ko druga metoda temelji na fizikalnih lastnostih CTC, kot sta večja velikost in stisljivost v primerjavi z drugimi krvnimi celicami. Ugotovili smo, da je fizikalna metoda primernejša, saj omogoča izolacijo večjega števila morfološko ohranjenih CTC in tudi skupkov CTC. Po izolaciji pripravimo citološke preparate, ki jih nato opredelimo s citopatološko analizo in dodatnimi imunocitokemičnimi ter imunofluorescenčnimi barvanji. Na ta način lahko trenutno določimo število CTC in skupkov CTC v krvi, ocenimo njihovo morfološko ohranjenost ter prepoznamo njihov fenotip. Poleg preučevanja vzorcev posamičnih CTC in skupkov CTC v okviru trenutno potekajočih kliničnih raziskav in načrtovane vzpostavitev translacijske platforme na mišjih modelih, pa v prihodnosti želimo nabor raziskav CTC še razširiti na genomsko in transkriptomsko analizo.

Ključne besede: cirkulirajoče tumorske celice (CTC), skupki CTC, rak dojk, raziskave raka

ABSTRACT

Circulating tumour cells (CTCs) have become an important biomarker in breast cancer, providing an insight into disease progression and monitoring of therapeutic response. Due to their extreme rarity in blood and the complexity of blood composition, their isolation and characterization is challenging. Specific isolation methods allow the enrichment of CTCs from a blood sample and facilitate further analysis. At the Institute of Oncology Ljubljana, in 2018 we initiated efforts to develop a simple method for the isolation and characterization of CTCs, aimed at identifying these cells through cytopathological analysis. We evaluated two different methods of CTC isolation in breast cancer patients based on different approaches. The first method is based on cell biological properties, such as the expression of the epithelial cell adhesion marker (EpCAM), while the second method is based on physical properties of CTCs, such as their larger size and deformability compared to other blood cells. We found that the physical method is more suitable, as it enables the isolation of higher numbers of morphologically intact CTCs. After isolation, cytological slides are prepared and then characterized by cytopathological analysis and immunocytochemical and immunofluorescence staining. This approach currently allows us to determine the number of single CTCs and CTC clusters in the blood, assess their morphological preservation, and identify their phenotype. In addition to evaluation of single CTCs and CTC clusters in ongoing clinical trials using currently established methods and the planned establishment of a translational platform in mouse models, we aim to expand the range of CTC studies in the future to include genomic and transcriptomic analysis.

Keywords: circulating tumour cells (CTC), CTC clusters, breast cancer, cancer research

UVOD

Tako kot je prvi korak za invazijo raka prečkanje rakavih celic prek bazalne membrane, je prvi korak za zasevanje rakavih celic v oddaljene organe njihov vstop v krvni obtok. Te rakave celice se imenujejo cirkulirajoče tumorske celice (CTC), njihov končni cilj pa je izstop iz krvnega obtoka in tvorba zasevka v oddaljenem organu (1,2). Čeprav CTC ohranjajo lastnosti primarnega tumorja, morajo pridobiti nove lastnosti, ki jim omogočajo, da se ločijo od primarnega tumorja, migrirajo in preidejo skozi endotelij v krvni obtok. Za CTC je potovanje skozi krvni obtok kot potovanje po razburkani reki, kar je za večino celic usodno zaradi škodljivega vpliva strižnih sil krvnega pretoka, zato so v krvi običajno prisotne zelo kratek čas. CTC lahko potujejo kot posamezne celice ali v obliki celičnih skupkov. Na poti jih lahko spremljajo različne krvne in stromalne celice, ki jim nudijo zaščito pred imunskimi celicami, nudijo rastne faktorje in jim s tem pomagajo pri potovanju v oddaljene organe (3). Sproščanje CTC je povezano s cirkadianim ritmom, v vzorcih krvi bolnikov so med spanjem zaznali več skupkov CTC kot čez dan, kar kaže na vključenost imunskega sistema v zasevanje, ki sledi dnevnomu ritmu in je ponoči v stanju počitka (4).

Metoda določanja CTC iz telesnih tekočin se imenuje tekočinska biopsija (Slika 1) in je načeloma lažje dostopna ter manj invazivna kot biopsija tumorja ali zasevkov (5). V zadnjem času se močno razvija tudi področje določanja cirkulirajoče tumorske DNA (ctDNA) s tekočinsko biopsijo. Ta metoda zaznava sledi tumorja v telesnih tekočinah, kar je težko zaznati, ko je breme boleznih nizko. Iskanje temelji predvsem na tumorsko specifičnih mutacijah, ki so se razvile z evolucijo tumorja in jih lahko ne odkrijemo, če ne uporabljamo ali nimamo na voljo ustrezne sonde za specifično tarčo ali ustrezne količine ctDNA (dovoljšno občutljivost metode). Proučevanje CTC kot živih komponent tumorja, ne le sledov razpadlih CTC (npr. njihove ctDNA), je zato veliko bolj privlačno, vendar hkrati težje izvedljivo.

Na začetku raziskovanja CTC je bil edini cilj izolirati CTC z različnimi metodami izolacije in opredeliti njihovo prisotnost oziroma odsotnost v krvi bolnikov. Pri zgodnjem raku dojke je bila 1 CTC na 7,5 ml krvi odkrita pri 20 % bolnikov (6). Pri razsejanem raku dojke je bil ta odstotek veliko višji, približno 75 % v prvi liniji razsejanega raka. Pri razsejanem raku je bilo prognostično pomembno, ali je bilo število CTC v 7,5 ml krvi večje ali manjše od 5 (7). Kasnejše raziskave so se osredotočile na fenotipske značilnosti CTC, ki izražajo epiteljske, mezenhimske ali hibridne celične označevalce. Sodobne raziskave so usmerjene v preučevanje profilov genske ekspresije posameznih celic v skupkih CTC (8).

Namen tega prispevka je predstaviti značilnosti CTC, ki močno vplivajo na njihovo možnost izolacije, razpravljati o različnih metodah izolacije CTC in predstaviti klinično uporabnost ter prognostično vrednost CTC pri raku dojke. Predstavili bomo tudi potek raziskovanja CTC pri raku dojke na Onkološkem inštitutu Ljubljana ter trenutno vzpostavljene metode raziskovanja, ki so na voljo na naši inštituciji.

ZNAČILNOSTI CTC

Ena izmed glavnih značilnosti CTC je njihova heterogenost, ki predstavlja velik izziv za njihovo izolacijo in detekcijo. Prvi vzrok heterogenosti izvira že iz same tumorske biologije, saj rak dojke sestavlja izjemno heterogena populacija tumorskih celic, ki so med evolucijo tumorja pridobile različne mutacije (9). Pri trojnem negativnem raku dojke so s sekvenciranjem posameznih CTC ugotovili, da izkazujejo izjemno visoko genomsko nestabilnost, kar se kaže v zelo veliki heterogenosti CTC (10). Dodaten vir

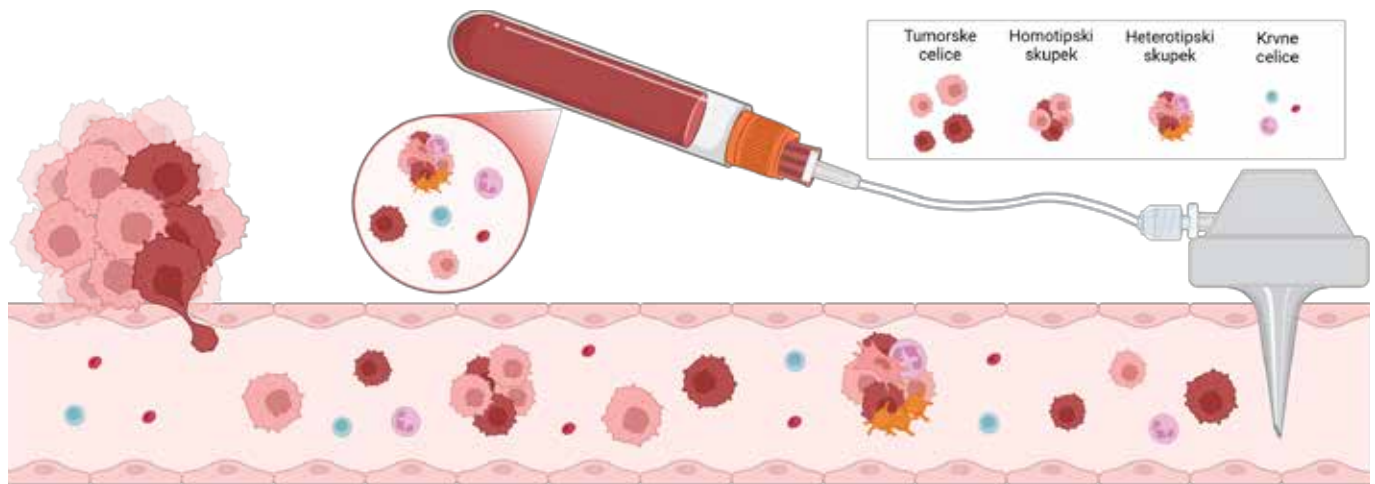
heterogenosti CTC raka dojk predstavljajo tudi pogoste okvare mehanizmov homologne rekombinacije pri popravljanju DNA. Tumorske celice zato, da bi preprečile celično smrt zaradi nako-pičenih napak pri okvarjeni homologni rekombinaciji, vključijo alternativne obhodne poti, ki še dodatno povečajo njihovo heterogenost (11).

Drugi vzrok njihove heterogenosti se skriva v njihovi fenotipski plastičnosti. V zgodnjih fazah procesa zasevanja epiteljske celice izgubijo svojo apikalno-bazalno orientacijo, medcelične stike in interakcije z zunajceličnim matriksom. Ta proces imenujemo epiteljsko-mezenhimski prehod (EMT), ki je temeljni fiziološki pojav, prisoten med embriogenezo in celjenjem ran. Med EMT CTC pridobi fenotip, podoben rakavim mezenhimskim matičnim celicam (CD44^{visok} in CD22^{nizek}) in epiteljskim podobnim rakavim celicam (ALDH1^{visok}) (12). Ravno ta proces pa tumorskim celicam omogoči, da se ločijo od primarnega tumorja in odpotujejo v krvno žilo. Med EMT-celice izgubijo svoje epiteljske označevalce, kot so E-kadherin, EpCAM, citokeratine in druge, ter pridobijo mezenhimske označevalce, kot sta vimentin in N-kadherin (13). Na novo pridobljeni mezenhimski fenotip omogoča celicam migracijo in invazijo skozi bazalno membrano v krvne žile. Raziskave so pokazale, da se tumorske celice lahko obnašajo različno invazivno, ena od najpomembnejših vrst invazije pa je kolektivna invazija in migracija v obliki celičnih skupkov (14,15). Med enotami, ki kolektivno migrirajo, lahko prepoznamo dve vrsti celic, vodilne in sledilne. Vodilne invazivne celice so lahko tako tumorske kot stromalne celice in ustvarjajo migratorne poti v okoliškem zunajceličnem matriksu, prek katerih lahko potujejo sledilne celice (14). V nasprotju z visoko invazivnimi vodilnimi celicami so sledilne najpogosteje opisane kot fenotipsko različna populacija rakavih celic, za katero je značilen nizek invazivni potencial. Zaradi tega lahko v krvi najdemo heterogeno populacijo CTC, ki lahko izražajo epiteljski (E), mezenhimski (M) ali pa mešani t. i. hibridni epiteljsko/mezenhimski (E/M) fenotip (Slika 1). Posamične CTC niso zelo uspešne pri tvorbi zasevkov; ocenjujejo, da manj kot 0,01 % posamičnih CTC lahko povzroči nastanek zasevkov, zato ni najbolj optimalno, da jih uporabljamo za evaluacijo potenciala zasevanja (16).

Celice v hibridnem E/M fenotipu imajo mešane epiteljske (npr. adhezijske) in mezenhimske (npr. migracijske in invazivne) lastnosti, ki jim omogoča kolektivno migracijo in invazijo v obliki celičnih skupkov. Skupki CTC so opredeljeni kot skupki dveh ali več celic, povezanih prek medceličnih povezav in predstavljajo le 2–5 % celotne populacije CTC (17). Skupki so lahko sestavljeni samo iz tumorskih celic (homotipski skupki CTC) ali pa poleg tumorskih tudi iz netumorskih stromalnih ali krvnih celic (heterotipski skupki CTC) (Slika 1) (18,19). Dokazano je bilo, da imajo skupki celic do 50-krat večji potencial zasevanja v primerjavi s posameznimi CTC, kar kaže na pomembno vlogo teh večceličnih agregatov v procesu zasevanja. Skupki CTC s tumorskimi fibroblasti imajo večji potencial zasevanja zaradi večje viabilnosti tumorskih celic v skupku (17).

Dodaten vir heterogenosti CTC pa je tudi njihova degeneracija v krvnem obtoku. V krvnem obtoku so CTC izpostavljene različnim škodljivim dejavnikom in zato le majhen delež CTC v krvi ostane viabilen. V krvnem obtoku so izpostavljene strižnim silam krvnega pretoka, pomanjkanju ravnih dejavnikov in napadu imunskih celic (1). S temi škodljivimi dejavniki se bolje spopadajo skupki CTC, saj jim interakcija z drugimi tumorskimi, krvnimi in stromalnimi celicami nudi mehansko zaščito, poleg tega pa jih stromalne celice oskrbujejo z različnimi rastnimi dejavniki (19). Podobno vlogo ima tudi interakcija s krvnimi celicami (trombociti, nevtrofilci in makrofagi), za katere je bilo dokazano, da pogosto interagirajo s CTC v krvnem obtoku (8,20,21).

Slika 1: Tekočinska biopsija heterogene populacije tumorskih celic v krvnem obtoku.



Raziskave kažejo, da so CTC v krvi kratkoživa populacija, čeprav se meritve razpolovnega časa v krvi zelo razlikujejo. Meng in sodelavci so s pretočno citometrijo ocenili, da je razpolovni čas CTC po odstranitvi primarnega tumorja dojke 1–2 uri (22), medtem ko je druga raziskava ocenila razpolovni čas glede na padec števila CTC po operativni odstranitvi raka prostate na približno 24 ur (23). Aceto in sodelavci so z dodajanjem tumorskih celic v kri miši ocenili razpolovni čas CTC na 10–30 minut (17). Ob tem ni znano, ali so CTC v tem kratkem času že podvržene celični smrti ali pa so le ustavljene v majhnih krvnih žilah in zato ne krožijo več v krvnem obtoku. Prisotnost skupkov CTC v krvnem obtoku je trikrat krajša od posamičnih CTC, verjetno zaradi še hitrejšega zagozdenja v majhnih žilah (občičijo v žilah s premerom 5–10 μm) (17).

Zaradi vseh opisanih dejavnikov, kot so heterogenost posamičnih CTC in skupkov CTC ter njihova kratkoživost v krvnem obtoku, predstavlja standardizacija njihove izolacije, detekcije in nadaljnje karakterizacije velik izziv. Zato je eden izmed ključnih korakov pri raziskovanju prav gotovo izbor najprimernejše metode izolacije, ki omogoča izolacijo zelo heterogene populacije CTC iz vzorca tekočinske biopsije (krvi, ascitesa ...).

METODE IZOLACIJE CTC IZ KRVI

Izolacija CTC iz krvi zaradi njihove redkosti in heterogenosti zahteva zelo občutljive in specifične metode. Načini izolacije temeljijo na fizikalnih ali bioloških lastnostih, ki ločujejo tumorske celice od krvnih.

Biološke metode izolacije

Biološke metode izolacije CTC temeljijo na selekciji celic na podlagi izražanja specifičnih površinskih označevalcev. Najpogostejši je pristop izolacije s pomočjo protiteles, ki prepoznajo epitelijski površinski označevalec EpCAM, ki je izražen na celicah epitelijskih tumorjev, zelo redko pa je prisoten na normalno prisotnih celicah v periferni krvi. Poleg EpCAM pa lahko za izolacijo CTC uporabljamo tudi druge površinske označevalce, kot so receptor za epidermalni rastni dejavnik (EGFR) (24), receptor humanega epidermalnega rastnega dejavnika 2 (HER2) (24,25), mucin 1 (MUC1) (26) in njihove kombinacije, ki omogočajo izolacijo CTC različnih fenotipov (24,26,27). Drug pristop za izolacijo CTC je odstranitev krvnih celic, ki temelji na odstranjevanju celic, ki izražajo specifične površinske označevalce, kot je skupni levkocitni antigen CD45.

Protitelesa za vezavo CTC ali krvnih celic so lahko vezana na površino kanalov v mikrofluidnih čipih, kot sta CTC-iChip ali GEDI, skozi katere prečrpamo kri (28,29). Pri tem se CTC vežejo na površino s protitelesi prevlečenih mikrokanalov znotraj čipov, za nadaljnjo analizo pa jih lahko iz čipov sprostimo z uporabo encima, ki jih odlepi s površine (30,31). Ena izmed glavnih pomanjkljivosti mikrofluidnih tehnologij je počasen pretok vzorca krvi in s tem nezmožnost analize velikega števila vzorcev. Protitelesa pa so lahko vezana tudi na površino magnetnih kroglic, ki jih inkubiramo z vzorcem krvi. Kroglice se s protitelesi vežejo na površino CTC, ki jih lahko nato od drugih celic ločimo z izpostavitvijo magnetnemu polju. Razvite so bile tudi magnetne kroglice, na katere so protitelesa vezana reverzibilno, kar omogoča kasnejšo sprostitvev CTC iz magnetnih kroglic (24). Tudi tehnologija CellSearch[®], ki jo odobri FDA za določanje CTC pri razsejanem raku dojk, črevesja ali prostate, ter tehnologija CellMag[™] temeljita na magnetnem ločevanju celic, ki izražajo epitelijski označevalec EpCAM, hkrati pa omogočata tudi avtomatizirano imunofluorescenčno barvanje ter štetje zajetih celic (32–34).

Za izolacijo CTC na podlagi odstranitve krvnih celic je razvit magnetni sistem EasySep[™], ki se veže na hematopoetske celice in trombocite s protitelesi, ki prepoznajo površinske označevalce CD2, CD14, CD16, CD19, CD45, CD61, CD66b in glikoforin A (34). Metode, ki temeljijo na odstranitvi krvnih celic, sicer vodijo v nižjo čistočo izoliranih CTC, njihova prednost pa je, da izolirajo neoznačene CTC, neodvisno od njihovega fenotipa in izražanja površinskih označevalcev (24,35,36).

Fizikalne metode izolacije

Poleg odstranitve krvnih celic se za izolacijo CTC neodvisno od njihovega fenotipa uporabljajo tudi fizikalne metode, ki izkoriščajo razlike v velikosti, stisljivosti in dielektričnih lastnostih med tumorskimi in krvnimi celicami. V splošnem velja, da so CTC večje od krvnih celic, kar izkoriščajo metode za izolacijo CTC na temelju velikosti. Kljub temu pa je del CTC in levkocitov primerljive velikosti – v literaturi najdemo podatke, da lahko premer CTC meri med 17 in 52 μm , medtem ko največji levkociti merijo do 25 μm (37). Za izolacijo celic na podlagi velikosti se lahko uporabljajo različni pristopi filtracije. To izkoriščata, npr. tehnologiji ISET[®] (*angl. Isolation by Size of epithelial cells*) in MetaCell[®], kjer se vzorec krvi prefiltrira čez membrano s porami premera 8 μm (38). Nekatere raziskave so pokazale, da lahko na

ta način izoliramo večje število CTC kot z metodo CellSearch®, ki je omejena le na izolacijo EpCAM+ CTC (39). Poleg tega so CTC, izolirane po teh dveh metodah, viabilne v visokem deležu, kar omogoča nadaljnje in vitro gojenje ali analize.

Poleg razlik v velikosti imajo tumorske celice tudi večjo stisljivost in elastičnost kot krvne celice, kar je potrebno za zasevanje in je povezano s preureditvijo aktinskega citoskeleta (40–42). Eden od sistemov, ki temelji na razlikah v velikosti in v stisljivosti tumorskih ter krvnih celic, je Parsortix®. Vzorec krvi prečrpamo skozi separacijsko kaseto, v kateri so kapilare, ki se postopoma ožijo do končnega premera 6,5 µm. Krvne celice lahko prosto potujejo skozi kaseto, tumorske celice pa se zaradi velikosti zaustavijo in jih lahko zberemo v epruveti s spremembo smeri pretoka pufra nazaj proti širšemu delu kapilar. Metoda omogoča izolacijo viabilnih CTC, ki pa so zaradi mehaničnih sil, ki so jim celice izpostavljene pri prehodu skozi kaseto, lahko poškodovane (43–45). Naprava omogoča tudi imunofluorescenčno barvanje celic znotraj separacijske kasete. Leta 2022 je sistem Parsortix® PCI odobrila FDA za izolacijo CTC iz periferne krvi bolnikov z razsejanim rakom dojke (46). Omogoča tudi detekcijo skupkov CTC.

Tumorske celice se od krvnih celic zaradi spremenjenega metabolizma razlikujejo tudi v dielektričnih lastnostih (47). To izkoriščajo metode, ki temeljijo na podlagi dielektroforeze, kot je npr. sistem ApoStream™, ki je sestavljen iz pretočne komore, ki ima na dnu elektrode za dovajanje električnega polja, kar privlači CTC na dno komore in odbija levkocite proti pretočnemu sredinskemu delu. Po prehodu vzorca krvi skozi električno polje lahko viabilne CTC zberemo skozi zbiralno odprtino na dnu komore (48).

Razvoj metod za izolacijo CTC stremi predvsem k vzpostavitvi zanesljivih, hitrih in učinkovitih pristopov, ki omogočajo izolacijo dobro ohranjenih CTC, kar poleg diagnostične vrednosti omogoča tudi nadaljnje in vitro gojenje ter poglobljene raziskave biologije CTC.

KLINIČNI POMEN CTC PRI RAKU DOJK

Največ raziskav na temo CTC in skupkov CTC je bilo narejenih pri raku dojke. Tako pri zgodnjem kot pri razsejanem raku dojke so CTC klinično pomembne in imajo prognostično vlogo. Pri zgodnjem raku dojke, kjer so v raziskavah uporabili metodo CellSearch®, ki zazna le CTC, ki izražajo epiteljske označevalce, so poročali o najdbi CTC pri samo 20–25 % bolnic, le pri vnetnem raku dojke in pri lobularnem histološkem tipu je bil ta odstotek višji, do 40 %. Prisotnost ≥ 2 CTC na 7,5 ml krvi pred neoadjuvantno kemoterapijo in ≥ 1 CTC pred operacijo ima prognostičen pomen pri zgodnjem raku dojke, saj napoveduje značilno slabše preživetje brez oddaljenih zasevkov (dDFS; *angl. distant disease free survival*) in celokupno preživetje (OS, *angl. overall survival*), ne vpliva pa na doseg popolnega patološkega odgovora po neoadjuvantni kemoterapiji (6,49). V raziskavi SUCCESS je detekcija CTC tako pred kot po adjuvantni kemoterapiji pomenila slabši DFS in OS (50). Bolnice s CTC so imele v primerjavi z bolnicami brez CTC pogostejše zasevke v multiplih oddaljenih organih in v skeletu (51). V drugi raziskavi so celo pet let po operaciji zasledili CTC pri 5 % bolnic in so napovedovale pozne relapse pri hormonsko pozitivnih rakih (52).

Novejše raziskave uporabljajo platforme za detekcijo CTC in skupkov CTC, ki temeljijo na velikosti celic in ločevanju na mikrofluidnih filtrih (npr. CellSieve™ in ScreenCell™). V teh raziskavah poročajo o detekciji CTC v višjem odstotku in celo o detekciji skupkov CTC pri 70 % bolnic z zgodnjim rakom dojke (in le pri 20 % pri razsejanem raku dojke), kar nakazuje, da je tvorba skupkov CTC zgodnji proces in sodeluje pri zasevanju raka

(53,54). Pri razsejanem raku dojke je prisotnost CTC robusten neodvisen napovedni dejavnik prognoze (za preživetje brez napredovanja bolezni (PFS, *angl. progression free survival*) in OS). V raziskavah je bilo validirano, da imajo bolnice s številom ≥ 5 CTC / 7,5 ml krvi, neodvisno od podtipa raka (trojno negativen, hormonsko odvisen ...) neugodno prognozo v primerjavi s tistimi, ki imajo število CTC < 5 / 7,5 ml krvi. Na podlagi tega so jih razdelili v stadij IV indolentna bolezen (mediana OS je bila 36,3 meseca) in stadij IV agresivna bolezen (mediana OS 16 mesecev); $p < 0,0001$ (7). Zaradi tega je smiselno število CTC obravnavati kot pomembno orodje za določanje stadija in stratifikacijo razsejane bolezni v prospektivnih kliničnih raziskavah. Nedavna raziskava pa nakazuje še, da je vzorec spremembe števila CTC med celotnim zdravljenjem močnejši prognostični faktor kot izhodiščno število CTC (55). Izraženost nekaterih celičnih označevalcev na CTC, med drugim izraženost HER2, je napovedni dejavnik za krajši PFS in OS (56).

S CellSearch® platformo zaznamo pri 80 % bolnic vsaj 1 CTC/7,5 ml, pri polovici pa ≥ 5 celic/7,5 ml krvi (57). S platformami, ki izolirajo CTC ne glede na izraženost celičnih označevalcev na CTC, lahko zaznamo večje število CTC in skupkov CTC, saj lahko zajamemo tudi tiste, ki so v procesu EMT, to je tiste, ki naj bi bile ključne pri migraciji in invaziji v oddaljene organe. Taka platforma je tudi Parsortix®, ki lahko ujame epiteljske, mezenhimske in hibridne vrste CTC (58).

Nedavna raziskava je preučevala tudi vlogo skupkov CTC. Bolniki z izhodiščno visokim številom CTC in skupki CTC so imeli večje tveganje za napredovanje bolezni in smrt. Izkazalo se je tudi, da je OS bolnikov, ki imajo skupke CTC bistveno krajše od OS bolnikov brez skupkov. Tudi večja velikost skupka CTC pomeni večje tveganje za smrt (59,60). Tudi v naši raziskavi KORALA smo preučevali CTC in skupke CTC pri 59 bolnicah z razsejanim rakom dojke ne glede na trajanje bolezni. Naši rezultati so pokazali, da je bila prisotna vsaj ena CTC pri 80 % bolnic, ≥ 5 CTC pa pri 35 % bolnic. Skupki CTC so bili prisotni samo pri bolnicah z ≥ 5 CTC (pri 19 % teh). Presenetljivo pa smo našli pri 52 % bolnic v krvi megakariocite, ki se nahajajo po navadi le v kostnem mozgu, ne v periferni krvi. O tem doslej pri raku dojke ni poročala še nobena raziskovalna skupina (61).

RAZISKOVANJE CTC RAKA DOJK NA OIL

Na OIL smo z raziskovanjem CTC pri raku dojke začeli leta 2018. Želeli smo najti sistem za izolacijo CTC, ki bo omogočal izolacijo morfološko ohranjenih celic, ki bi jih lahko prepoznali na klasičnih citoloških preparatih, barvanih po metodi Giemsa ali Papanicolaou (PAP). Poleg tega pa je bila naša želja, da so izolirane celice viabilne, kar bi nam omogočilo kasnejši razvoj gojenja teh celic v laboratoriju. Prvi sistem, ki smo ga ocenili, je bil sistem MACS® (sortiranje celic v magnetu) ponudnika Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Nemčija). Sistem MACS® temelji na pozitivni selekciji celic epiteljskega izvora s pomočjo magnetnih kroglic, ki so konjugirane s protitelesi proti epiteljskemu označevalcu EpCAM. Postopek izolacije obsega inkubacijo krvi z magnetnimi kroglicami in ločevanje označenih celic v magnetnem polju. Protitelesa na magnetnih kroglicah se vežejo na svoje tarče na površini celic, nato pa jih ločimo od okoliških celic s pomočjo magnetnega polja. Raziskave so potekale v sklopu klinične raziskave AKRA, ki je potekala na OIL (odobritev KME št. 0120-133/2017-2, glavna raziskovalka dr. Cvetka Grašič Kuhar). Metodo smo preizkusili na predkliničnem in kliničnem nivoju (62). Na predkliničnem nivoju smo v kri zdravih prstovoljcev dodajali znano število celic celične linije raka dojke MCF7 (epiteljske celice) in fibroblaste Wi-38 (mezenhimske celice) ter ugotavljali njeno občutljivost in specifičnost. Izkazalo se je,

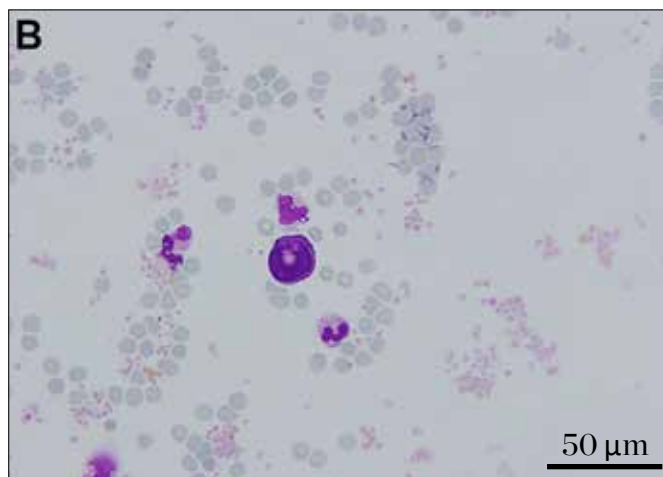
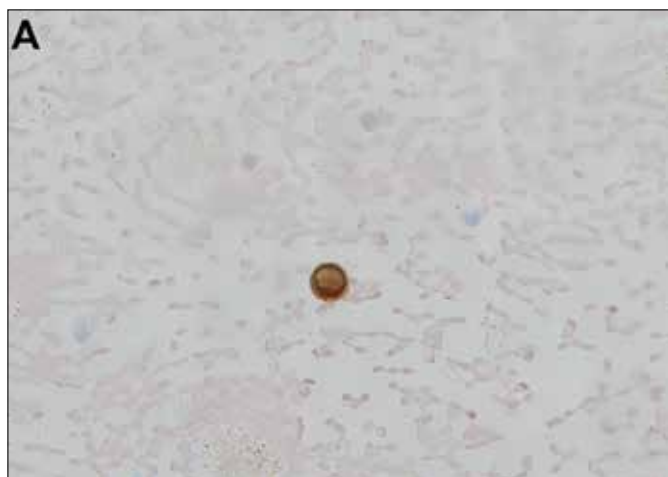
da je občutljivosti metode 34 %, medtem ko je bila specifičnost 100 %. Tumorske celice celične linije MCF7 so bile po izolaciji morfološko ohranjene. Opazili smo hidropsko degeneracijo celic ter prisotnost ozadja krvnih celic v citoloških preparatih. Imunocitokemično barvanje je pokazalo, da so celice po izolaciji ohranile antigenske lastnosti. Na kliničnem nivoju smo metodo izolacije preizkusili na vzorcih krvi 43 bolnic z zgodnjim rakom dojke. V vseh vzorcih so bile CTC morfološko degenerirane, kar je oteževalo njihovo identifikacijo. Pri 2 % bolnic smo opazili klasične CTC, ki so kazale morfološke značilnosti tumorskih celic in so bile pozitivne na imunocitokemično barvanje na pan-citokeratin CKAЕ1/AЕ3 (CK) (Slika 2A). Pri 33 % bolnic smo opazili neklasične CTC, ki so kazale morfološke značilnosti tumorskih celic in bile negativne na imunocitokemično barvanje na CK (Slika 2B). V 65 % vzorcev CTC niso bile prisotne. Z raziskavo smo dokazali, da se z metodo MACS® lahko izolira CTC, ki pa so morfološko neohranjene. Morfološko neohranjenost smo v tej točki pripisali že sami degeneraciji CTC v krvnem obtoku, saj smo raziskavo izvajali pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke in dejstvom, da je predklinični del raziskave pokazal ohranitev morfologije celic celične linije MCF7.

Zaradi slabe občutljivosti metode MACS® in dejstva, da z njo lahko izoliramo samo tisti del heterogene populacije CTC, ki izraža epiteljski fenotip, smo nadaljevali iskanje primernejše metode izolacije. Povezali smo se s podjetjem ANGLE plc. (Guildford, Združeno kraljestvo), ki nam je omogočilo kratkotrajno brezplačno ovrednotenje platforme Parsortix®. Njihova platforma omogoča izolacijo CTC na podlagi fizikalnih lastnosti, njihove velikosti in stisljivosti, kar pomeni, da lahko z njim izoliramo večji nabor heterogene populacije CTC v krvi, ki izražajo različne fenotipe. Celice se v sistemu Parsortix® ločujejo v separacijski kaseti, v kateri se nahaja sistem kapilar, ki se stopničasto ožijo do premera 6,5 µm. Tam se CTC in druge večje celice zagozdijo, ostale krvne celice pa stečejo naprej. Ko čez kapilare steče ves vzorec krvi, obrnemo pretok tekočine in na ta način izoliramo obogateno frakcijo večjih celic. Sistem Parsortix® smo prav tako testirali predklinično in klinično, tako da smo naredili sočasno primerjavo s sistemom MACS®, s katerim smo že imeli nekaj izkušenj (44). Na predkliničnem nivoju smo v kri zdravih prostovoljcev dodajali celice celične linije raka dojke MCF7 ter izolacijo izvedli po obeh postopkih. Po obeh načinih izolacije smo opazili morfološko ohranjene celice MCF7, ki so

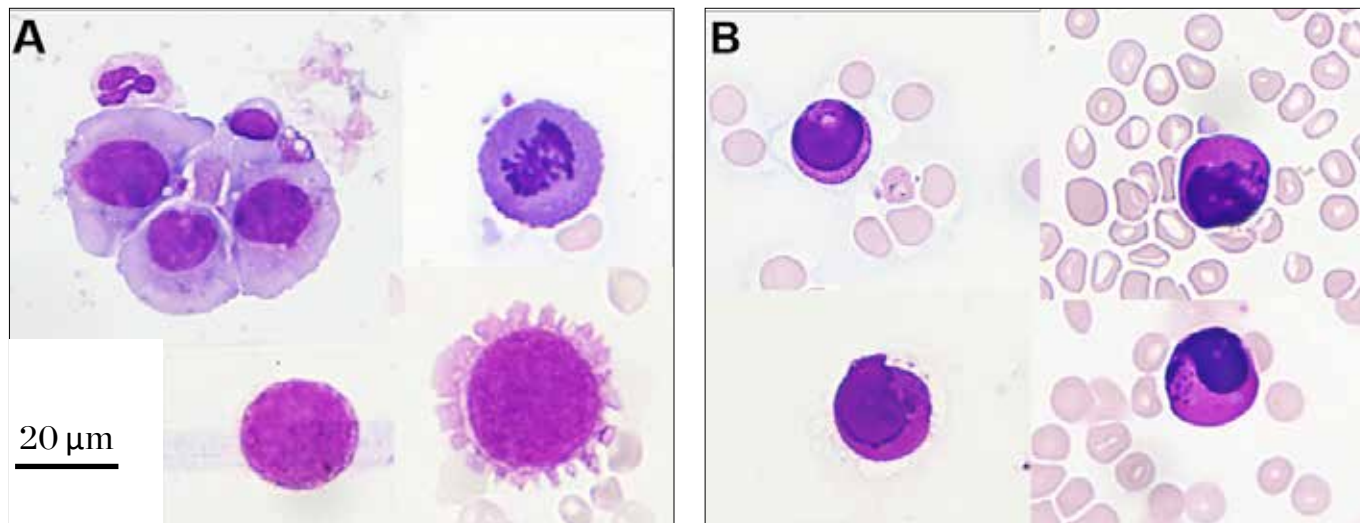
kazale znake hidropske degeneracije in prisotnost nekaterih degenerativnih značilnosti, kot so prisotnost resic in brstov na plazmalemi ter vakuol v citoplazmi. Pretočna citometrija je pokazala, da so po obeh načinih izolacije celice viabilne in bi lahko bile primerne za nadaljnje gojenje v laboratoriju. Pri kliničnem testiranju smo uporabili kri 30 bolnic z razsejanim rakom dojke, ki so bile vključene v klinično raziskavo KORALA (odobritev KME št. 0120-150-2019/4, glavna raziskovalka dr. Cvetka Grašič Kuhar). Pri tej skupini bolnic smo pričakovali večje število bolj morfološko ohranjenih CTC. Vsaki bolnici smo naenkrat odvzeli dve epruveti krvi (10 ml) ter iz vsake izolirali CTC z uporabo ene od metod. Ugotovili smo, da lahko z metodo Parsortix® izoliramo večje število CTC v primerjavi z metodo MACS®, kar smo tudi pričakovali, saj lahko metoda izolira CTC ne glede na fenotipov. Še bolj zanimiva ugotovitev pa je bila, da so bile CTC po izolaciji s sistemom Parsortix® morfološko bolj ohranjene od tistih, ki so bile izolirane z metodo MACS® (Slika 3). Na podlagi naše analize smo razvili tudi merila za identifikacijo in klasifikacijo CTC. Merila za morfološko ohranjene CTC so: celice z morfološki značilnostmi malignosti, kot so velika jedra, visoko razmerje med jedrom in citoplazmo, malo citoplazme, vidna struktura kromatina ali prisotnost mitoze. Kriteriji za opredelitev morfološko neohranjenih CTC so bili: celice z morfološki značilnostmi malignosti, kot so velika jedra, visoko razmerje med jedrom in citoplazmo, malo citoplazme ter izguba kromatinske strukture in celovitosti jedrske membrane.

Zaradi spodbudnih rezultatov smo klinično raziskavo KORALA razširili z vključitvijo dodatnih bolnic z namenom ovrednotenja potencialnih kliničnih korelacij. Od skupno 59 vključenih bolnic z razsejanim rakom dojke je 63 % imelo luminalni podtip A ali B, 20 % HER2 pozitivni podtip ter 17 % trojno negativni podtip (61). Naši rezultati so pokazali, da so bile CTC prisotne pri 80 % bolnicah, skupki CTC pa pri 9 % bolnicah. V raziskavi nismo dokazali signifikantnih razlik med številom CTC in posameznimi podtipi raka dojke, prav tako število CTC ni bilo povezano s celokupnim preživetjem, kar pripisujemo izboru bolnic z razsejano boleznijo ne glede na linijo zdravljenja ter nizkemu številu vključenih bolnic. V raziskavi pa smo zasledili zelo zanimivo najdbo, in sicer da je kar 52 % bolnic v krvi imelo megakariocite. Megakariociti so prekurzorji trombocitov in se običajno nahajajo v kostnem mozgu in ne v periferni krvni. Celice megakariocitov so zelo velike in smo jih zato lahko

Slika 2: Primer klasične CTC barvane po metodi PAP s pozitivnim barvanjem na CK (A) in neklasične CTC pobarvane po metodi Giemsa (B). CTC so bile izolirane z biološko metodo MACS® pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke. Pri A in B lahko opazimo veliko ozadja krvnih celic.



Slika 3: Morfološko ohranjene CTC, izolirane s sistemom Parsortix® (A) in morfološko neohranjene CTC, izolirane s sistemom MACS® (B) iz krvi bolnic z razsejanim rakom dojke.



izolirali s sistemom Parsortix® poleg CTC. Vzrok prisotnosti megakariocitov v krvi bolnic ni znan, najdba pa nam odpira nadaljnje možnosti raziskovanja, saj je znano, da imajo trombociti pomembno vlogo pri zaščiti CTC med potovanjem po krvi.

TRENTNO VZPOSTAVLJENE METODE IZOLACIJE IN DOLOČEVANJA CTC

V kliničnih raziskavah na Onkološkem inštitutu Ljubljana CTC izoliramo iz 10 ml periferne krvi, ki jo bolniku odvzamemo v epruveto s K_2 EDTA. Raziskave so pokazale, da imajo tumorske celice v vzorcu krvi zelo kratko življenjsko dobo, saj njihovo število po petih urah od odvzema upade za več kot 60 % (63,64). Zato izolacijo CTC izvedemo v najkrajšem možnem času (najkasneje štiri ure po odvzemu periferne krvi). Za izolacijo CTC uporabljamo aparat Parsortix®. Po separaciji izolirane celice prenesemo v hišni celični medij (4,5 % goveji serumski albumin, 0,45 % EDTA v fosfatnem pufru, 90.000 IE/ml penicilin in 4 g/ml garamicin) ter pripravimo tri citospine. Dva shranimo v metanolu za nadaljnje imunocitokemično ali imunofluorescenčno barvanje, enega pa posušimo na sobni temperaturi in nato obarvamo po metodi Giemsa. Obarvane preparate nato analiziramo pod svetlobnim ali fluorescenčnim mikroskopom, kjer določimo število, ohranjenost, morfologijo in fenotip izoliranih CTC. Potek obdelave vzorca za določanje CTC je prikazan na Sliki 4.

Citopatološka priprava vzorcev CTC za morfološko in imunofenotipsko analizo

Prednost citopatološke preiskave je, da omogoča hitro obdelavo tekočinskih vzorcev, saj lahko preparate za mikroskopsko analizo in dodatna imunocitokemična barvanja pripravimo, pobarvamo in ocenimo v manj kot 24 urah. Pri analizi morfoloških in imunofenotipskih značilnosti CTC smo zato želeli uporabiti že uveljavljene metode, opremo in preizkušene protokole, ki jih v našem citopatološkem laboratoriju skrbno optimiziramo in izpopolnjujemo že več kot 70 let (65). Ker vzorci z izoliranimi CTC vsebujejo zelo malo celic, smo se odločili, da preparate za mikroskopsko oceno pripravimo s citocentrifugo. Za pripravo citospinov smo uporabili posebna stekelca z vnaprej označenim območjem za nanos celic, ki se v rutinski diagnostiki uporabljajo predvsem za vzorce likvorja. Prednost citospinov pred klasičnimi razmazi je, da s centrifugiranjem celice iz tekočinskih vzorcev

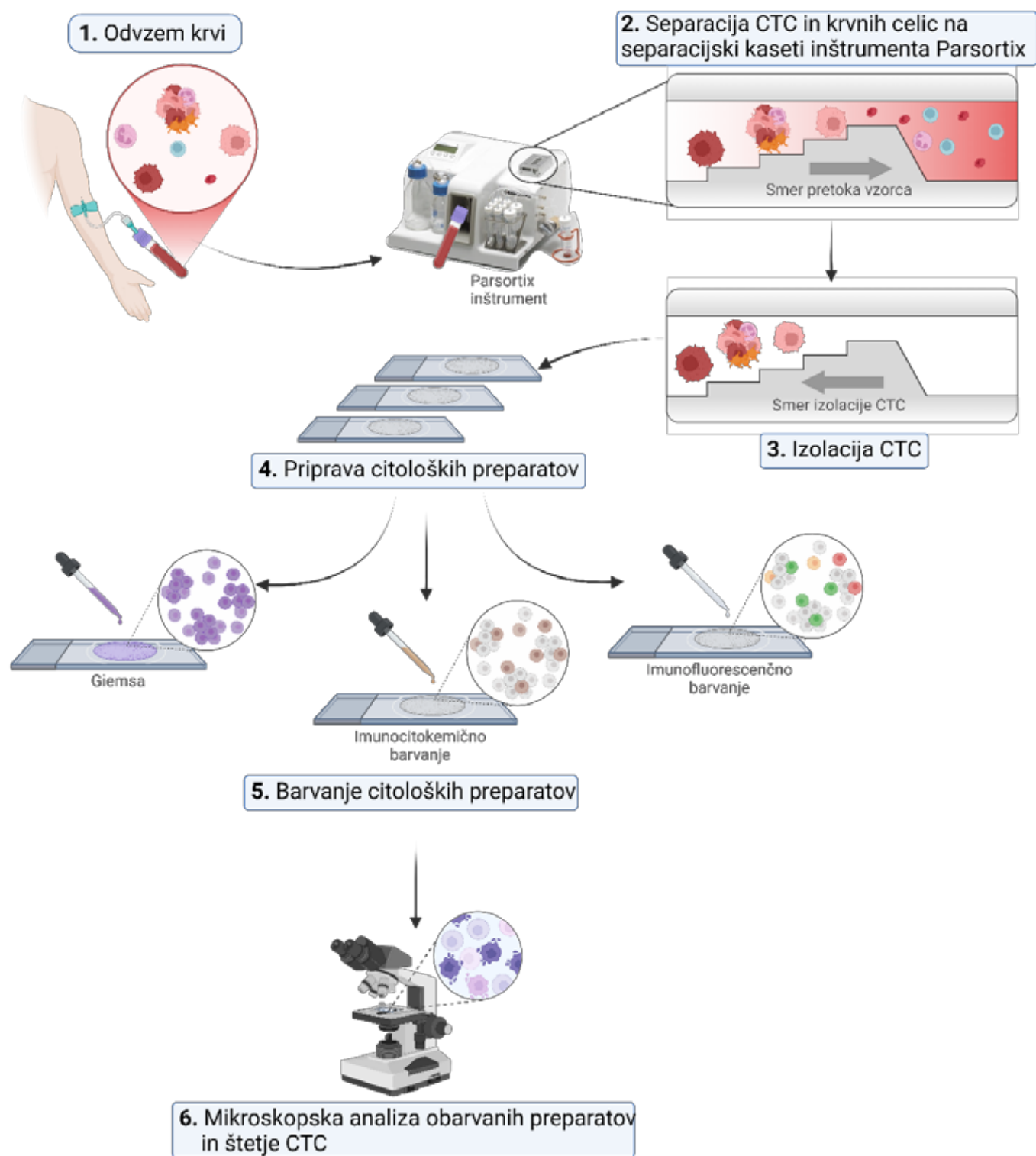
skoncentrirano naneseemo na majhno področje stekelca, ki je označeno s krogom, kar olajša mikroskopski pregled vzorcev pod svetlobnim mikroskopom. Za pripravo citospinov v citocentrifugi potrebujemo kovinske sponke, plastične komore in označena stekelca, kot je prikazano na Sliki 5 (A-E). Običajno iz enega vzorca pripravimo tri citospine. En citospin posušimo na zraku in ga obarvamo po metodi Giemsa z avtomatiziranim barvalcem Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems, Nussloch, Nemčija) (Slika 5D). Druga dva citospina takoj fiksiramo v absolutnem metanolu. Citospine lahko v metanolu hranimo več mesecev, kar nam omogoča lažje načrtovanje dodatnih imunocitokemičnih (Slika 5E) in imunofluorescenčnih barvanj (66). Imunocitokemična barvanja izvedemo z avtomatiziranim barvalcem BenchMark ULTRA (Ventana, Roche, Bazel, Švica).

V sklopu raziskave KORALA smo za analizo CTC pripravili tudi preparate, fiksirane v Delaunaju in pobarvane po metodi PAP, ki smo jih lahko uporabili za imunocitokemična barvanja. S primerjavo citospinov, pobarvanih po metodi Giemsa in PAP, smo ugotovili, da so preparati pobarvani po metodi Giemsa bolj primerni za oceno morfoloških značilnosti CTC. Poleg tega so rezultati imunocitokemičnih barvanj boljši na citospinih, ki so fiksirani v metanolu, kot na citospinih, ki so fiksirani v Delaunaju in pobarvani po metodi PAP.

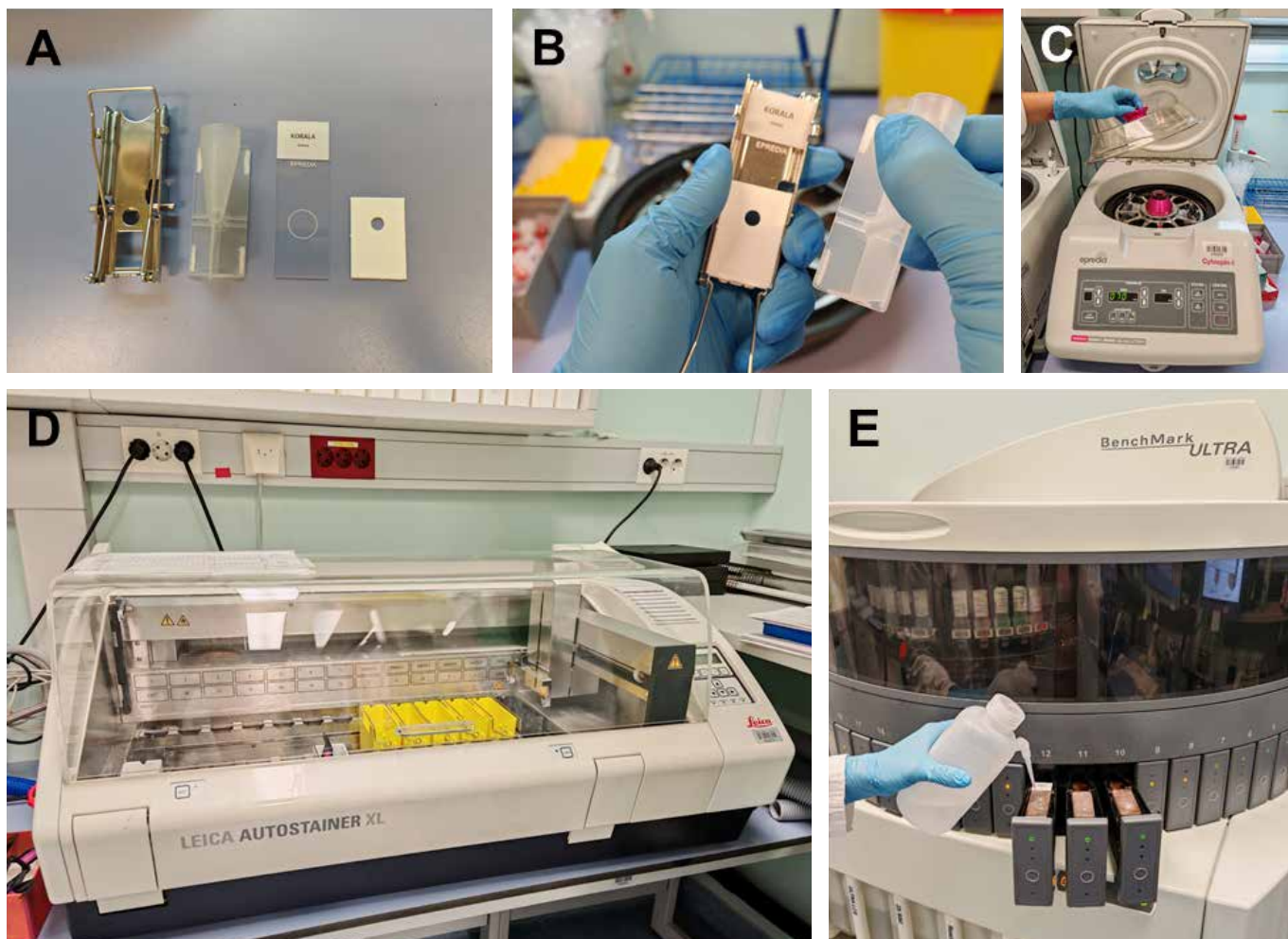
Barvanje po metodi Giemsa in imunocitokemično barvanje CTC

Na podlagi morfološke ocene CTC smo v sklopu raziskave KORALA ugotovili, da so morfološke značilnosti CTC drugačne kot v tkivnih vzorcih primarne biopsije karcinoma dojke (Slika 6A in 6C). Opazili smo, da so CTC v vzorcu iste bolnice veliko bolj polimorfne in se zelo razlikujejo po velikosti (44). Znano je, da so CTC v krvnem obtoku zelo krhke, zato postopek izolacije najverjetneje povzroči dodatne deformacije. Domnevamo, da je to tudi razlog za oteženo izolacijo CTC iz vzorcev krvi, njihovo prepoznavanje ter določanje morfoloških in antigenih lastnosti. Tumorske celice v primarnem tumorju so močno pozitivne za citokeratinske označevalce, posebej na CK (Slika 6B). Žal pa smo z imunocitokemičnim barvanjem CTC dokazali CK le v posameznih vzorcih bolnic s CTC (Slika 6, D, E). Predpostavljamo, da CTC zaradi EMT izgubijo epiteljske citokeratinske označevalce ali pa so prisotni v tako majhni količini, da jih z metodami, ki jih trenutno uporabljamo v rutinski diagnostiki, ne zaznamo.

Slika 4: Shematski prikaz poteka obdelave vzorca za določanje CTC v periferni krvi bolnikov na Onkološkem inštitutu Ljubljana.



Slika 5: Prikaz izdelave citospinov in barvanja vzorcev s CTC v našem rutinskem citopatološkem laboratoriju na OIL. (A) Kovinska sponka, plastična komora, stekelce za vzorce z majhnim številom celic in filter papir; (B) prikaz sestavljanja komponent s Slike A; (C) Citocentrifuga; (D) Avtomatiziran barvalec za barvanje po metodi Giemsa; (E) Avtomatiziran barvalec za imunocitokemično barvanje.



Zaradi naših prvih ne preveč spodbudnih rezultatov imunocitokemičnih barvanj na CTC, smo poskušali optimizirati protokol dvojnega imunocitokemičnega barvanja za CK in vimentin. Protokol barvanja smo testirali na ostankih citoloških vzorcev s celicami, ki so izražale CK ali vimentin. Naši rezultati so pokazali, da vimentin obarva tudi vse imunske celice. Močno obarvane imunske celice motijo oceno izražanja vimentina na CTC z mezenhimskim imunofenotipom, zato bi bilo za oceno mezenhimskega fenotipa CTC treba poiskati drug označevalec, ki ni izražen na belih krvnih celicah, trombocitih in njihovih prekursorjih celicah v kostnem mozgu. Druga možnost je imunofluorescenčno barvanje, kjer močne reakcije ne zamaskirajo signala drugih označevalcev. V literaturi je le malo objav o morfoloških in imunofenotipskih značilnostih CTC, določenih z rutinskim imunocitokemičnim barvanjem, kar dodatno potrjuje, da CTC predstavljajo velik raziskovalni izziv in odpirajo možnost za nadaljnje raziskave.

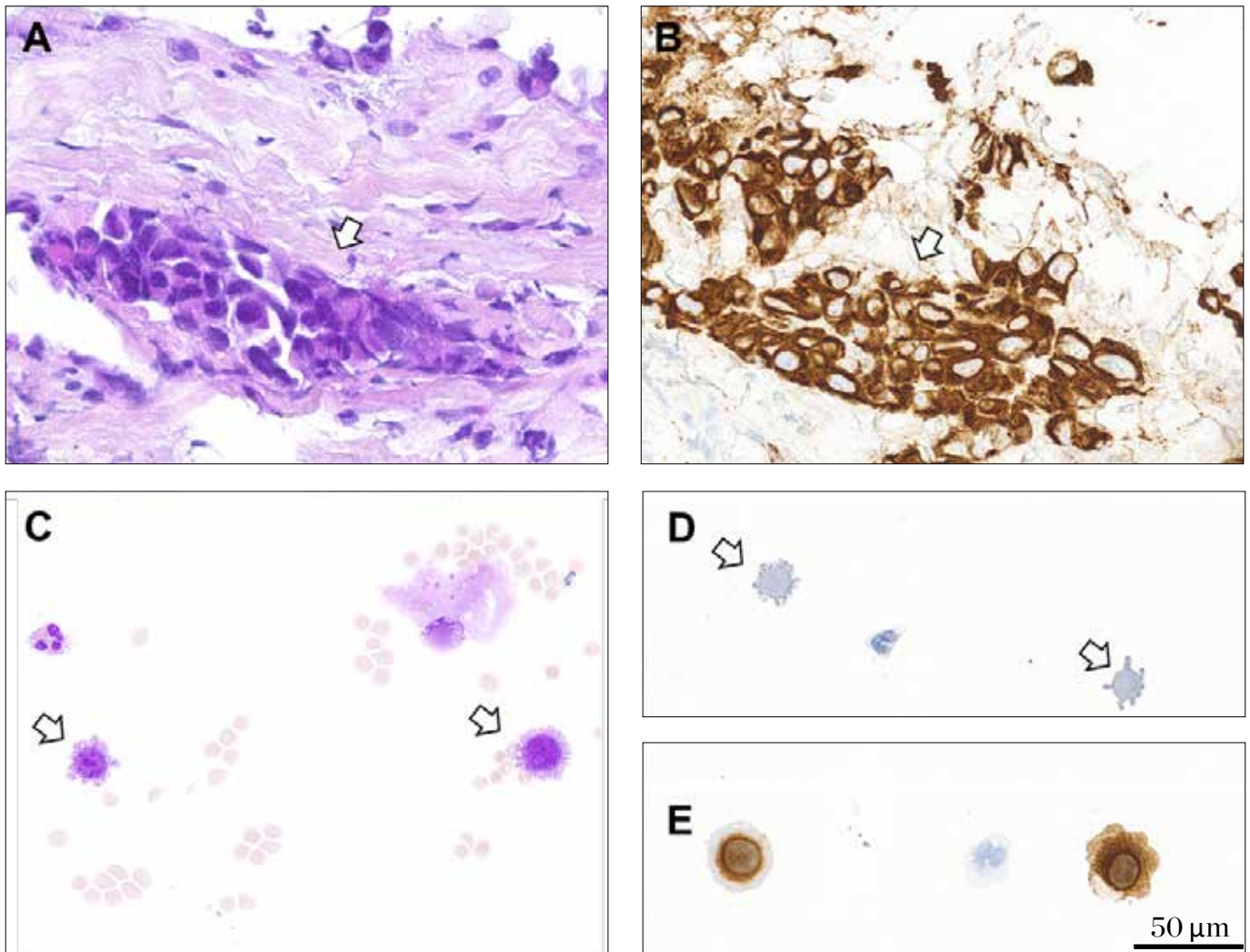
Imunofluorescenčno barvanje

Z imunofluorescenčnim barvanjem lahko na istem vzorcu naenkrat označimo in opredelimo več različnih celičnih označevalcev. V našem primeru smo želeli postaviti panel barvanja, s katerim bi lahko prepoznali CTC in določili njihov fenotip. V ta

namen smo si izbrali 4 označevalce – označevanje jeder z jedrnim barvilom Hoechst 33342, ki se veže na DNA, označevanje CK (epitelijski označevalci), označevanje vimentina (mezenhimski označevalci) ter označevanje skupnega levkocitnega antigena CD45 (označevalec za krvne celice, ki nam služi za razlikovanje CTC od krvnih celic). Kriteriji za opredelitev CTC so: celice s prisotnim jedrom, ki so negativne na barvanju za CD45 ter pozitivne na CK, vimentin ali oba.

V naši kohorti bolnic v sklopu raziskave KORALA smo večinoma zaznali prisotnost CTC mezenhimskega fenotipa (Slika 7A), pri eni bolnici pa tudi CTC v hibridnem fenotipu (Slika 7B). CTC z izključno epitelijskim fenotipom nismo zaznali. Nekatere celice, ki so fenotipsko ustrezale kriterijem za CTC (CD45 negativne, vimentin pozitivne), so imele zelo slabo vidna jedra ter so izkazovale druge morfološke znake degeneracije (brstenje membrane), kar lahko kaže na močno degeneracijo teh celic v krvi in močno otežuje njihovo identifikacijo (Slika 7C). Prav tako ni jasno, ali ima prisotnost močno degeneriranih CTC kakšen klinični pomen, saj celice najverjetneje nimajo več sposobnosti zasevanja. To pa odpira vrata nadaljnjim možnostim raziskav. Vimentin se je pri imunofluorescenčnem označevanju izkazal za bolj primerne kot pri imunocitokemičnem barvanju, saj s fluorescenčnim mikroskopom označevalce spremljamo v različnih kanalih in ne maskirajo signala drug drugemu.

Slika 6: Primerjava morfoloških značilnosti in rezultatov imunocitokemičnega barvanja celic karcinoma dojke v primarnem tumorju in v cistospih s CTC. (A) Histološka slika primarnega karcinoma dojke (tumorske celice so označene z belo puščico) v preparatu, ki je pobarvan z metodo hematoksilin-eosin; (B) Imuncitokemično barvanje z označevalcem CK na tkivni rezini primarnega karcinoma dojke (tumorske celice (rjave barve) so označene z belo puščico); (C) CTC (označene z belimi puščicami), pobarvane po metodi Giemsa; (D) Primer negativnega imunocitokemičnega barvanja na CK na CTC; (E) Primer pozitivnega imunocitokemičnega barvanja za CK na CTC (rjave celice). Slike A–D prikazujejo rezultate barvanj pri isti bolnici, Slika E prikazuje rezultate barvanj pri drugi bolnici. Vse slike so zajete ob 400-kratni povečavi.



Pogled v prihodnost

V prihodnosti načrtujemo izvajanje različnih kliničnih raziskav tekočinske biopsije in CTC, da bi poglobili razumevanje njihove vloge pri napovedovanju poteka bolezni in odziva na zdravljenje. Ena izmed ključnih raziskav je že potekajoča raziskava GALIA (odobritev KME št. 0120-156/2023/3, glavna raziskovalka dr. Cvetka Grašič Kuhar), kjer pri bolnicah z visoko tveganim rakom dojk preučujemo prognostični pomen CTC, skupkov CTC in megakariocitov. S to raziskavo želimo raziskati, ali lahko ti celični označevalci napovejo doseg patološkega popolnega odgovora po neoadjuvantni terapiji ter njihovo vlogo pri napovedovanju PFS in OS. V sklopu raziskave bolnice šestkrat med zdravljenjem darujejo vzorce krvi za izolacijo CTC in ctDNA.

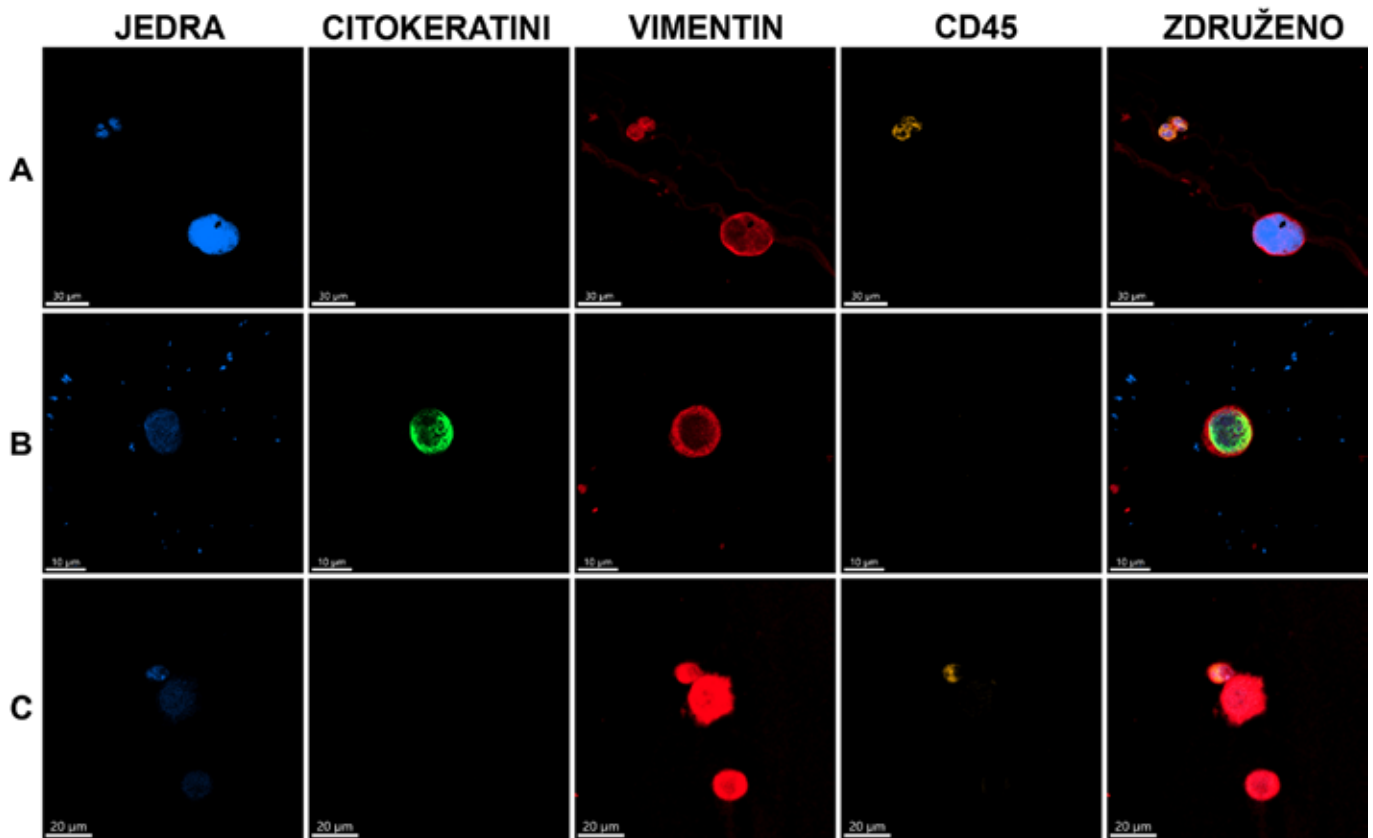
Načrtujemo tudi širitev raziskovanja na druge vrste rakov, kjer CTC še niso tako raziskane kot pri raku dojke. Poleg tega si prizadevamo vzpostaviti gojenje CTC v laboratoriju, kar bi omogočilo namnožitev teh celic in izvedbo različnih funkcionalnih celičnih testov ter transkriptomske analize posameznih celic. S tem bi lahko poglobili naše razumevanje CTC in samega procesa

zasevanja, kar bi lahko dolgoročno prispevalo k razvoju personaliziranih terapij in izboljšanju izidov zdravljenja.

ZAKLJUČEK

Raziskovanje CTC postaja vse bolj pomembno orodje pri razumevanju kompleksnega procesa zasevanja, ki je še vedno glavni vzrok smrti pri onkoloških bolnikih. Zasevki se lahko pojavijo že v zgodnjih fazah razvoja tumorja, vendar mehanizmi, ki vodijo do tega, še niso v celoti pojasnjeni. Prav CTC imajo potencial, da nam razkrijejo ključne informacije o tem procesu in omogočijo razvoj novih pristopov za njegovo preprečevanje. S hitrim tehnološkim napredkom pa pričakujemo, da bomo v prihodnosti razvili še bolj učinkovite in zanesljive pristope za izolacijo in identifikacijo teh redkih in raznolikih celic.

Slika 7. Primeri CTC, ki smo jih izolirali iz krvi bolnic z razsejanim rakom dojke. (A) CTC mezenhimskega fenotipa, (B) CTC hibridnega fenotipa, (C) CTC z mezenhimijskim fenotipom s slabo obarvanim jedrom in znaki degeneracije. Merilna skala 20 μm (A in C) ter 10 μm (B). Jedra so prikazana v modri barvi, CK v zeleni, vimentin v rdeči, skupni levkocitni antigen CD45 v oranžni. Slika združeno predstavlja sočasni prikaz vseh štirih kanalov.



LITERATURA

1. Lozar T, Gersak K, Cemazar M, Kuhar CG, Jesenko T. The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiol Oncol* 2019;53:131–47. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0024>.
2. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clin Chem* 2013;59:110–8. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194258>.
3. Amintas S, Bedel A, Moreau-Gaudry F, Boutin J, Buscail L, Merlio JP, et al. Circulating Tumor Cell Clusters: United We Stand Divided We Fall. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21072653>.
4. Diamantopoulou Z, Castro-Giner F, Schwab FD, Foerster C, Saini M, Budinjas S, et al. The metastatic spread of breast cancer accelerates during sleep. *Nature* 2022;607:156–62. <https://doi.org/10.1038/S41586-022-04875-Y>.
5. Kurma K, Eslami-SZ, Alix-Panabieres C, Cayrefourcq L. Liquid biopsy: paving a new avenue for cancer research. *Cell Adh Migr* 2024;18:1–26. <https://doi.org/10.1080/19336918.2024.2395807>.
6. Janni WJ, Rack B, Terstappen LWMM, Pierga JY, Taran FA, Fehm T, et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:2583–93. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1603>.
7. Cristofanilli M, Pierga JY, Reuben J, Rademaker A, Davis AA, Peeters DJ, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019;134:39–45. <https://doi.org/10.1016/J.CRITRETVONC.2018.12.004>.
8. Fridrichova I, Kalinkova L, Ciernikova S. Clinical Relevancy of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Epithelial or Mesenchymal Characteristics, Single Cells or Clusters? *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012141>.
9. Kavan S, Kruse TA, Vogsen M, Hildebrandt MG, Thomassen M. Heterogeneity and tumor evolution reflected in liquid biopsy in metastatic breast cancer patients: a review. *Cancer Metastasis Rev* 2022;41:433–46. <https://doi.org/10.1007/S10555-022-10023-9>.
10. Di Cosimo S, Silvestri M, De Marco C, Calzoni A, De Santis MC, Carnevale MG, et al. Low-pass whole genome sequencing of circulating tumor cells to evaluate chromosomal instability in triple-negative breast cancer. *Sci Rep* 2024;14. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-71378-3>.
11. Heitmeir B, Deniz M, Janni W, Rack B, Schochter F, Wiesmüller L. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: A Balancing Act between Stemness, EMT Features and DNA Damage Responses. *Cancers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14040997>.
12. Pereira-Veiga T, Martínez-Fernández M, Abuin C, Piñeir R, Cebej V, Cueva J, et al. CTCs Expression Profiling for Advanced Breast Cancer Monitoring. *Cancers (Basel)* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11121941>.
13. Debnath P, Huirem RS, Dutta P, Palchaudhuri S. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. *Biosci Rep* 2022;42. <https://doi.org/10.1042/BSR20211754>.
14. Vilchez Mercedes SA, Bocci F, Levine H, Onuchic JN, Jolly MK, Wong PK. Decoding leader cells in collective cancer invasion. *Nat Rev Cancer* 2021;21:592–604. <https://doi.org/10.1038/S41568-021-00376-8>.
15. Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2012;14:777–83. <https://doi.org/10.1038/NCB2548>.
16. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 2016;529:298–306. <https://doi.org/10.1038/NATURE17038>.
17. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014;158:1110–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>.
18. Aceto N. Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomed J* 2020;43:18. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2019.11.002>.
19. Schuster E, Taftaf R, Reduzzi C, Albert MK, Romero-Calvo I, Liu H. Better together: circulating tumor cell clustering in metastatic cancer. *Trends Cancer* 2021;7:1020–32. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2021.07.001>.
20. Jiang X, Wong KHK, Khankhel AH, Zeinali M, Reategui E, Phillips MJ, et al. Microfluidic isolation of platelet-covered circulating tumor cells. *Lab Chip* 2017;17:3498–503. <https://doi.org/10.1039/c7lc00654c>.
21. Lou X-L, Sun J, Gong S-Q, Yu X-F, Gong R, Deng H. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res* 2015;27:450–60. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2015.04.10>.
22. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004;10:8152–62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1110>.
23. Stott SL, Richard L, Nagrath S, Min Y, Miyamoto DT, Ulkus L, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med* 2010;2. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3000403>.
24. Lu NN, Xie M, Wang J, Lv SW, Yi JS, Dong WG, et al. Biotin-triggered decomposable immunomagnetic beads for capture and release of circulating tumor cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7:8817–26. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.5B01397>.
25. Xu H, Aguilar ZP, Yang L, Kuang M, Duan H, Xiong Y, et al. Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood. *Biomaterials* 2011;32:9758–65. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.08.076>.
26. Thege FI, Lannin TB, Saha TN, Tsai S, Kochman ML, Hollingsworth MA, et al. Microfluidic immunocapture of circulating pancreatic cells using parallel EpCAM and MUC1 capture: characterization, optimization and downstream analysis. *Lab Chip* 2014;14:1775–84. <https://doi.org/10.1039/C4LC00041B>.
27. Satelli A, Brownlee Z, Mitra A, Meng QH, Li S. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin Chem* 2015;61:259–66. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2014.228122>.

28. Kirby BJ, Jodari M, Loftus MS, Gakhar G, Pratt ED, Chanel-Vos C, et al. Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific microfluidic device. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035976>.
29. Burr R, Edd JF, Chirn B, Mishra A, Haber DA, Toner M, et al. Negative-Selection Enrichment of Circulating Tumor Cells from Peripheral Blood Using the Microfluidic CTC-iChip. *Methods Mol Biol* 2022;2471:309–21. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2193-6_18.
30. Adams AA, Okagbare PI, Feng J, Hupert ML, Patterson D, Götten J, et al. Highly efficient circulating tumor cell isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J Am Chem Soc* 2008;130:8633–41. <https://doi.org/10.1021/JA8015022>.
31. Sheng W, Ogunwobi OO, Chen T, Zhang J, George TJ, Liu C, et al. Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip. *Lab Chip* 2014;14:89–98. <https://doi.org/10.1039/C3LC51017D>.
32. Riethdorf S, O'Flaherty L, Hille C, Pantel K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;125:102–21. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.01.011>.
33. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:781–91.
34. M Saini V, Oner E, Ward MP, Hurley S, Henderson BD, Lewis F, et al. A comparative study of circulating tumor cell isolation and enumeration technologies in lung cancer. *Mol Oncol* 2024. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13705>.
35. Yang L, Lang JC, Balasubramanian P, Jatana KR, Schuller D, Agrawal A, et al. Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:521–34. <https://doi.org/10.1002/BIT.22066>.
36. Lara O, Tong X, Zborowski M, Chalmers JJ. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Exp Hematol* 2004;32:891–904. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2004.07.007>.
37. Low WS, Wan Abas WAB. Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties. *Biomed Res Int* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/239362>.
38. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000;156:57–63. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64706-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64706-2).
39. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2012;7:306–15. <https://doi.org/10.1097/JTO.0B013E31823C5C16>.
40. Chen CL, Mahalingam D, Osmulski P, Jadhav RR, Wang CM, Leach RJ, et al. Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate* 2013;73:813–26. <https://doi.org/10.1002/PROS.22625>.
41. Byun S, Son S, Amodei D, Cermak N, Shaw J, Kang JH, et al. Characterizing deformability and surface friction of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:7580–5. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1218806110/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201218806SI.PDF>.
42. Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron* 2007;38:824–33. <https://doi.org/10.1016/J.MICRON.2007.06.011>.
43. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A Novel Workflow to Enrich and Isolate Patient-Matched EpCAMhigh and EpCAMlow/negative CTCs Enables the Comparative Characterization of the PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/IJMS18091885>.
44. Jesenko T, Modic Z, Kuhar CG, Cemazar M, Matkovic U, Miceska S, et al. Morphological features of breast cancer circulating tumor cells in blood after physical and biological type of isolation. *Radiol Oncol* 2021;55:292–304. <https://doi.org/10.2478/RAON-2021-0033>.
45. Miller MC, Robinson PS, Wagner C, O'Shannessy DJ. The Parsortix™ Cell Separation System—A versatile liquid biopsy platform. *Cytometry Part A* 2018;93:1234–9. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23571>.
46. Templeman A, Miller MC, Cooke MJ, O'shannessy DJ, Gurung Y, Pereira T, et al. Analytical performance of the FDA-cleared Parsortix® PC1 system. *J Circ Biomark* 2023;12:26–33. <https://doi.org/10.33393/JCB.2023.2629>.
47. Becker FF, Wang XB, Huang Y, Pethig R, Vykoukal J, Gascoyne PRC. Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:860–4. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.3.860>.
48. Gupta V, Jafferji I, Garza M, Melnikova VO, Hasegawa DK, Pethig R, et al. ApoStream(TM), a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics* 2012;6. <https://doi.org/10.1063/1.4731647>.
49. Bidard FC, Michiels S, Riethdorf S, Mueller V, Esserman LJ, Lucci A, et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2018;110:560–7. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJY018>.
50. Rack B, Schindlbeck C, Jückerstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014;106. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJU066>.
51. Trapp EK, Fasching PA, Fehm T, Schneeweiss A, Mueller V, Harbeck N, et al. Does the Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer Patients Predict the Site of First Metastasis—Results from the Adjuvant SUCCESSA Trial. *Cancers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14163949>.

52. Sparano J, O'Neill A, Alpaugh K, Wolff AC, Northfelt DW, Dang CT, et al. Association of Circulating Tumor Cells With Late Recurrence of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2018;4:1700–6. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2018.2574>.
53. Mihalciou C, Li J, Badescu D, Camirand A, Kremer N, Bertos N, et al. Improved platform for breast cancer circulating tumor cell enrichment and characterization with next-generation sequencing technology. *Am J Cancer Res* 2023;13:25–44.
54. Reduzzi C, Di Cosimo S, Gerratana L, Motta R, Martinetti A, Vingiani A, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Frequently Detected in Women with Early-Stage Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13102356>.
55. Magbanua MJM, Hendrix LH, Hyslop T, Barry WT, Winer EP, Hudis C, et al. Serial Analysis of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Receiving First-Line Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2021;113:443–52. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJAA113>.
56. Wang C, Mu Z, Ye Z, Zhang Z, Abu-Khalaf MM, Silver DP, et al. Prognostic value of HER2 status on circulating tumor cells in advanced-stage breast cancer patients with HER2-negative tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2020;181:679–89. <https://doi.org/10.1007/S10549-020-05662-X>.
57. Dirix L, Buys A, Oeyen S, Peeters D, Liègeois V, Prové A, et al. Circulating tumor cell detection: A prospective comparison between CellSearch® and RareCyte® platforms in patients with progressive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2022;193:437–44. <https://doi.org/10.1007/S10549-022-06585-5>.
58. Cohen EN, Jayachandran G, Moore RG, Cristofanilli M, Lang JE, Khoury JD, et al. A Multi-Center Clinical Study to Harvest and Characterize Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Breast Cancer Using the Parsortix® PCI System. *Cancers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14215238>.
59. Piñeiro R, Martínez-Pena I, López-López R. Relevance of CTC Clusters in Breast Cancer Metastasis. *Adv Exp Med Biol* 2020;1220:93–115. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35805-1_7.
60. Costa C, Muínelo-Romay L, Cebey-López V, Pereira-Veiga T, Martínez-Pena I, Abreu M, et al. Analysis of a Real-World Cohort of Metastatic Breast Cancer Patients Shows Circulating Tumor Cell Clusters (CTC-clusters) as Predictors of Patient Outcomes. *Cancers (Basel)* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12051111>.
61. Grašič Kuhar C, Silvester J, Mencinger M, Ovčariček T, Čemažar M, Miceska S, et al. Association of Circulating Tumor Cells, Megakaryocytes and a High Immune-Inflammatory Environment in Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2023;15. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15133397>.
62. Lozar T, Jesenko T, Kloboves Prevodnik V, Cemazar M, Hosta V, Jericevic A, et al. Preclinical and Clinical Evaluation of Magnetic-Activated Cell Separation Technology for CTC Isolation in Breast Cancer. *Front Oncol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.554554>.
63. Ring A, Mineyev N, Zhu W, Park E, Lomas C, Punj V, et al. EpCAM based capture detects and recovers circulating tumor cells from all subtypes of breast cancer except claudin-low. *Oncotarget* 2015;6:44623–34. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5977>.
64. Ma Y, Zhang J, Tian Y, Fu Y, Tian S, Li Q, et al. Zwitterionic microgel preservation platform for circulating tumor cells in whole blood specimen. *Nat Commun* 2023;14. <https://doi.org/10.1038/S41467-023-40668-1>.
65. Pohar-Marinsek Z. 60 let Oddelka za citopatologijo. *Onkologija* 2012;16:109–10.
66. Kuhar A. Obstočnost antigenov za imunocitokemijo v hišnem mediju za tekočinsko citologijo: magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2018.

Financiranje:

Raziskava je bila finančno podprta s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS), programi št. P3-0003, P3-0289 in P3-0321 ter terciarnima projektoma Onkološkega inštituta Ljubljana (nosilki dr. Cvetka Grašič Kuhar in dr. Tanja Jesenko).

Zahvala:

Avtorice se zahvaljujejo vsem sodelujočim v raziskavah, še posebno vsem zaposlenim na Oddelku za citopatologijo, Oddelku za eksperimentalno onkologijo, Sektorju internistične onkologije in Oddelku za laboratorijsko diagnostiko.

© Avtor(ji). To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0.

© The author(s). This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>