

METODE DOLOČEVANJA CIRKULIRAJOČIH TUMORSKIH CELIC RAKA DOJKE NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA

Tanja Jesenko^{1,2}, Simona Miceska¹, Živa Pišljar^{1,2}, Maja Čemažar^{1,3}, Veronika Kloboves-Prevodnik^{1,4}, Cvetka Grašič Kuhar^{1,2}

¹ Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Izola, Slovenija

⁴ Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

Izvleček

Cirkulirajoče tumorske celice (CTC) so postale pomemben biološki označevalec pri raku dojk, saj ponujajo vpogled v potek in sledenje bolezni. Izolacija CTC predstavlja velik izziv zaradi njihove redkosti in kompleksnega okolja krvnih celic. Metode izolacije omogočajo obogatitev CTC iz vzorca krvi in olajšajo nadaljnjo analizo. Izolacija in analiza CTC postajata ključno raziskovalno področje vsakega onkološkega centra. Na Onkološkem inštitutu Ljubljana (OIL) smo prve korake naredili leta 2020. Iskali smo preprosto metodo za izolacijo in karakterizacijo CTC, ki bi omogočala prepoznavanje CTC s citopatološko analizo, ki je še vedno zlati standard v diagnostiki raka. Ocenili smo dve metodi za izolacijo CTC pri bolnicah z rakom dojk, ki temeljita na različnih pristopih. Ena od metod omogoča izolacijo CTC na podlagi njihovih bioloških značilnosti, izražanju epitelijskega markerja celične adhezije (EpCAM). Druga metoda pa omogoča izolacijo CTC na podlagi njihovih fizikalnih lastnosti, večje velikosti in stisljivosti napram ostalim krvnim celicam. Od ocenjenih metod se je za primernejšo izkazala fizikalna metoda, saj omogoča izolacijo večjih količin morfološko ohranjenih CTC. Po izolaciji CTC pripravimo citološke preparate, ki jih nato nadaljnje ovrednotimo z različnimi barvanji in citopatološko analizo. Na ta način lahko trenutno določimo število CTC v krvi, njihovo morfološko ohranjenost ter njihov fenotip (epitelijski, mezenhimski ali hibridni). Ob pridobivanju vzorcev tekočih kliničnih študij in načrtovano vzpostavitev translacijske platforme na mišjih modelih, pa v prihodnosti želimo nabor karakterizacije CTC še povečati, tudi z vzpostavitev gojenja CTC v laboratoriju *ex vivo*, kar bo odprlo vrata za nadaljnje kompleksne študije CTC.

CTC so postale pomemben biološki dejavnik pri raku, vključno z rakom dojk, saj ponujajo nepogrešljiv vpogled v proces napredovanja bolezni in odziva na terapijo (Cani & Hayes, 2024; Cortés-Hernández in sod., 2024). Ker CTC predstavljajo vmesno stopnjo v procesu metastaziranja, ima lahko spremljanje števila CTC v krvnem obtoku velik pomen pri spremljanju bolnikov med in po zdravljenju. V krvnem obtoku so CTC zelo heterogena populacija tumorskih celic. Zaradi neugodnega vpliva strižnih sil krvnega pretoka in napada imunskih celic je večina CTC v krvi mrtvih ali močno poškodovanih. CTC se pojavljajo tudi v različnih velikostih in z veliko epitelijsko-mezenhimsko plastičnostjo. Izražajo različne fenotipe, vključno s popolnoma epitelijskim (E), popolnoma mezenhimskim (M) ali hibridnim/delnim epitelijsko-mezenhimskim (E/M) fenotipom (Lozar in sod., 2019). Te celice izražajo značilnosti obeh fenotipov in predstavljajo CTC z najvišjim metastatskim potencialom, ki jih pogosto najdemo v obliki celičnih skupkov. CTC pri raku dojk imajo še posebno visoko stopnjo plastičnosti zaradi pogostih okvar mehanizmov homologne rekombinacije za popraviljanje DNA. Tumorske celice zato, da bi preprečile celično smrt zaradi nakopičenih napak pri okvarjeni homologni rekombinaciji, vključijo alternativne obhodne poti, ki še dodatno povečajo genomsko nestabilnost. CTC, ki nastanejo iz tumorjev dojk, zato pogosto razvijejo še večji nabor mehanizmov za pobeg, ki se lahko v različnih fazah njihove metastatske poti vklopijo in izklopijo glede na stresno spodbudo (Heitmeir in sod., 2022). CTC lahko najdemo v obliki posameznih celic ali skupkov celic. Skupki CTC so opredeljeni kot večcelični skupki CTC, sestavljeni iz dveh ali več celic, ki se držijo skupaj preko medceličnih povezav (Aceto in sod., 2014). Skupki so lahko sestavljeni samo iz tumorskih celic (tj. homotipski skupki CTC) ali pa poleg tumorskih tudi iz netumorskih celic (heterotipski skupki CTC), kar kaže na pomembno vlogo teh večceličnih agregatov v procesu metastaziranja (Aceto in

sod., 2020). Dokazano je bilo, da imajo skupki celic do 50-krat večji metastatski potencial v primerjavi s posameznimi CTC, kar je posledica večje viabilnosti tumorskih celic v skupku (Aceto in sod., 2014). Pri bolnicah z rakom dojke so opazili presenetljiv in nepričakovan vzorec sproščanja visoko metastatskih skupkov CTC. Sproščanje je temeljilo na cirkadianem ritmu, pri čemer se je večina spontanah intravazacijskih dogodkov CTC zgodila med spanjem (Diamantopoulou in sod., 2022).

Zaradi heterogenosti CTC so se razvile različne metode izolacije iz vzorca krvi, katerih cilj je ločiti CTC od okoliških krvnih celic. Strategije izolacije izkoriščajo biološke ali fizikalne lastnosti CTC. Biološke tehnike izolacije temeljijo na prisotnosti celičnih označevalcev in pogosto vključujejo pozitivno selekcijo na podlagi označevalcev epitelijskih celic ali negativno selekcijo na skupni levkocitni antigen CD45. Prva metoda za določanje števila CTC, ki jo je odobrila Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA), CELLSEARCH (Menarini Silicon Biosystems), temelji na izolaciji na podlagi bioloških lastnosti in uporablja fluorescenčno barvanje in slikanje za odkrivanje CTC epitelijskega izvora (CD45-, EpCAM+ in citokeratini 8, 18+ in/ali 19+) (Riethdorf in sod., 2018). Test je validiran za določevanje števila CTC kot prognostičnega dejavnika pri raku dojke, prostate in debelega črevesa. Poleg sistema CELLSEARCH, izkorišča pozitivno selekcijo na EpCAM tudi metoda MACS (z magnetom aktivirano sortiranje celic), ki omogoča izolacijo CTC z vezavo magnetih kroglic z vezanim protitelesom za EpCAM. Označene CTC z magnetnimi kroglicami se zadržijo v magnetu in jih na ta način lahko ločimo od ostalih celic. Glavna omejitev bioloških metod je izolacija le deleža celic CTC v krvi, saj omogočajo detekcijo le CTC, ki izražajo epitelijske markerje. Drugo platformo Parsortix (ANGLE plc.) je leta 2022 odobrila FDA kot diagnostični pripomoček *in vitro*, namenjen obogatitvi CTC iz periferne krvi pri bolnicah z diagnozo metastatskega raka dojke. Sistem Parsortix je mikrofluidni sistem, ki sortira celice v kapilarah v filtrirni kaseti in jih ločuje na podlagi fizikalnih lastnosti, njihove večje velikosti in manjše stisljivosti v primerjavi z drugimi komponentami krvi (Miller in sod. 2018). Kapilaram v filtrirni kaseti se manjša premer in na koncu se v kapilarah zadržijo večje celice, manjše krvne celice pa stečejo skozi njih v odpadni lonček. Na koncu obrnemo mikrofluidni tok in obogateno frakcijo večjih celic (CTC) zberemo v zbirno epruveto. Iz zbrane frakcije lahko pripravimo citološke preparate ali pa jo uporabimo za gojenje *ex vivo* in druge analize, na primer izolacijo nukleinskih kislin ali proteinov.

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana smo ocenili sistema MACS in Parsortix tako na predkliničnem nivoju z dodajanjem celične linije raka dojke v kri zdravih prostovoljcev ter na kliničnem nivoju pri bolnicah z rakom dojke (odobritev št. 0120-133/2017-2 in 0120-150-2019/4) (Jesenko in sod., 2021; Lozar in sod., 2020). Za bolj ustreznega se je izkazal sistem Parsortix, ki izolira CTC na podlagi fizikalnih lastnosti. Naša raziskava je potrdila, da sistem omogoča izolacijo viabilnih CTC z ohranjenimi morfološkimi značilnostmi in tako omogoča identifikacijo CTC na podlagi citopatološke ocene (Jesenko in sod., 2021). Prednost citopatološke analize je, da je v kliničnem okolju lahko dostopna, saj so citopatologi sestavni del oskrbe bolnikov z rakom. Razvili smo tudi merila za identifikacijo in klasifikacijo za citopatološko vrednotenje CTC raka dojke, saj je velika večina CTC v krvi mrtvih ali močno poškodovanih, kar vodi v degeneracijo celic in oteženo identifikacijo s citopatološko analizo (Jesenko in sod., 2021). Merila za morfološko ohranjene CTC so: celice z morfološkimi značilnostmi malignosti, kot so velika jedra, visoko razmerje med jedrom in citoplazmo, pičla citoplazma, vidna struktura kromatina ali prisotnost mitoze. Kriteriji za opredelitev morfološko neohranjenih CTC so: celice z morfološkimi značilnostmi malignosti, kot so velika jedra, visoko razmerje med jedrom in citoplazmo, pičla citoplazma ter znaki hude degeneracije (izguba kromatinske strukture ali celovitosti jedrske membrane ter prisotnost citoplazemskih vključkov). Z imunofluorescenčnim barvanjem citoloških preparatov lahko določimo tudi fenotip celic. Na istem preparatu pobarvamo jedra, citokeratin, vimentin ter skupni levkocitni antigen CD45. CTC predstavljajo populacijo celic z jedrom, negativno na CD45 ter pozitivnim barvanjem na CK, VIM ali oboje.

S trenutno vzpostavljenimi metodami lahko torej trenutno določimo število CTC in skupkov CTC v krvi ter opredelimo njihovo morfološko ohranjenost ter njihov fenotip (epitelijski, mezenhimski ali

hibridni). Ob pridobivanju vzorcev tekočih kliničnih študij in načrtovano vzpostavitev translacijske platforme na mišjih modelih, pa v prihodnosti želimo nabor karakterizacije CTC še povečati, tudi z vzpostavitev gojenja CTC v laboratoriju *ex vivo*, kar bo odprlo vrata za nadaljnje kompleksne študije CTC.

Literatura

1. Aceto, N. (2020). Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomedical Journal*, 43(1), 18.
2. Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Cani, A. K., & Hayes, D. F. (2024). Breast Cancer Circulating Tumor Cells: Current Clinical Applications and Future Prospects. *Clinical Chemistry*, 70(1), 68–80.
3. Cortés-Hernández, L. E., Eslami-S, Z., Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2024). Circulating Tumor Cells: From Basic to Translational Research. *Clinical Chemistry*, 70(1), 81–89.
4. Diamantopoulou, Z., Castro-Giner, F., Schwab, F. D., Foerster, C., Saini, M., Budinjas, S., Strittmatter, K., Krol, I., Seifert, B., Heinzlmann-Schwarz, V., Kurzeder, C., Rochlitz, C., Vetter, M., Weber, W. P., & Aceto, N. (2022). The metastatic spread of breast cancer accelerates during sleep. *Nature*, 607(7917), 156–162.
5. Heitmair, B., Deniz, M., Janni, W., Rack, B., Schochter, F., & Wiesmüller, L. (2022). Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: A Balancing Act between Stemness, EMT Features and DNA Damage Responses. *Cancers*, 14(4).
6. Jesenko, T., Modic, Z., Kuhar, C. G., Cemazar, M., Matkovic, U., Miceska, S., Varl, J., Kuhar, A., & Kloboves-Prevodnik, V. (2021). Morphological features of breast cancer circulating tumor cells in blood after physical and biological type of isolation. *Radiology and Oncology*, 55(3), 292–304.
7. Lozar, T., Gersak, K., Cemazar, M., Kuhar, C. G., & Jesenko, T. (2019). The biology and clinical potential of circulating tumor cells. In *Radiology and Oncology* (Vol. 53, Issue 2, pp. 131–147). Sciendo.
8. Lozar, T., Jesenko, T., Kloboves Prevodnik, V., Cemazar, M., Hosta, V., Jericevic, A., Nolde, N., & Grasic Kuhar, C. (2020). Preclinical and Clinical Evaluation of Magnetic-Activated Cell Separation Technology for CTC Isolation in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10.
9. Miller, M. C., Robinson, P. S., Wagner, C., & O'Shannessy, D. J. (2018). The Parsortix™ Cell Separation System—A versatile liquid biopsy platform. *Cytometry Part A*, 93(12), 1234–1239.
10. Riethdorf, S., O'Flaherty, L., Hille, C., & Pantel, K. (2018). Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 125, 102–121.