

CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY – SLIBNÝ MULTIFUNKČNÍ BIOMARKER

TEREZA HULIČKOVÁ a LUDMILA KARAMONOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
ludmila.karamonova@vscht.cz

Došlo 17.3.21, přijato 12.8.21.

Klíčová slova: cirkulující nádorové buňky, metastázy, metastatická kaskáda, biomarker

Obsah

1. Úvod
2. Cirkulující nádorové buňky
 - 2.1. Metastatická kaskáda
 - 2.1.1. Lokální invaze a epiteliálně mezenchymální přechod
 - 2.1.2. Intravazace a cirkulace
 - 2.1.3. Extravazace a usídlení
 - 2.2. Detekce cirkulujících nádorových buněk
 - 2.2.1. Metody separace založené na fyzikálních vlastnostech
 - 2.2.2. Metody separace využívající biologických vlastností
3. Závěr

1. Úvod

V současné době jsou obvykle terapeutická rozhodnutí při onkologické léčbě založena na analýze bioptických vzorků primárního nádoru či metastáz. Nicméně vzhledem k velké časové i prostorové intraindividuální heterogenitě nádorových buněk, obzvláště pokud jsou vystaveny selektivnímu tlaku jako např. při systémové léčbě, může být tento přístup nedostačující. Alternativu představují cirkulující nádorové buňky (CTC, z angl. Circulating Tumor Cells). Zatímco klasická biopsie je invazivní a v některých případech i technicky náročná, k vyšetření CTC postačuje odběr 8 ml periferní krve, což pacienta zatíží výrazně méně. Vzhledem k podobnosti s histologickou analýzou je někdy vyšetření CTC označováno jako tekutá biopsie¹. Největší výhodou tekuté biopsie oproti klasické je však možnost sériových odběrů, které umožňují kontinuální sledování léčby a v případě změn v molekulárním profilu nádorových buněk i rychlou reakci².

Využití CTC v diagnostice podporuje i teorie tzv. časné diseminace. Dříve byla diseminace považována za

terminální stádium vývoje maligního nádoru. V posledních letech se však ukazuje, že diseminace není doménou pouze vysoce diferenciováných nádorů, ale může k ní docházet již ve stádiu premaligní buňky. Důsledkem je paralelní vývoj primárního ložiska a jeho metastáz, takže u nich dochází ke kumulaci rozdílných genetických, epigenetických i dalších změn a nárůstu heterogenity³. CTC tak mohou být v krvi detekovány ještě před nalezením primárního nádorového ložiska. V širším kontextu však tento objev není překvapivý, protože u 5–10 % všech případů metastatických nádorových onemocnění není známo primární místo původu⁴.

V současné době se výzkum v oblasti CTC soustřeďuje do čtyř hlavních oblastí, kterými jsou: hlubší porozumění procesu metastazování, odhadnutí nebezpečí metastatického relapsu či progresu onemocnění, identifikace terapeutických cílů a pochopení mechanismu vzniku chemorezistence⁵.

V klinické praxi mají CTC vysoký potenciál, protože jejich včasná detekce a molekulární charakterizace umožňují zvolení vhodné terapie a průběžné sledování účinnosti léčby¹.

2. Cirkulující nádorové buňky

CTC byly poprvé popsány australským lékařem Thomasem Ramsdenem Ashworthem, který si při pitvě pacienta s četnými tumory povšiml zvláštního typu buněk v jeho krvi, jež svou morfologií odpovídaly buňkám izolovaným z nádoru⁶. Během následujících let byla postupně potvrzena jeho domněnka, že by přítomnost těchto buněk v krvi pacienta mohla vysvětlit nádorový rozsev po celém těle. Jde většinou o buňky uvolňované z primárního tumoru, které se krevním řečištěm dostávají do dalších tkání, kde z nich mohou vzniknout sekundární nádorová ložiska neboli metastázy. Jsou tedy přímým účastníkem procesu metastazování, který je hlavní příčinou úmrtí v souvislosti s nádorovým onemocněním. Úmrtnost v těchto případech dosahuje až 90 % (cit.⁷).

2.1. Metastatická kaskáda

Proces metastazování se poprvé pokusil vysvětlit Stephen Paget v roce 1889 svou teorií semínka a živné půdy (z angl. seed and soil). V této hypotéze semínka představují CTC, které se mohou uchytit pouze v kompatibilním orgánovém prostředí neboli živné půdě⁸. Nejenže tato teorie odolala v konkurenčním prostředí celé řady dalších teorií, ale byla i dále rozvinuta. V současné době vychází ze tří hlavních faktorů, které ovlivňují úspěšnost celého procesu⁹.

Za prvé, primární tumor bývá často tvořen mnoha subpopulacemi buněk s odlišnou biologickou charakteristikou včetně metastatického potenciálu. Tato biologická heterogenita může být způsobena mnohobuněčným původem tumoru, nicméně byla potvrzena i v případech tumorů vycházejících z jednoho buněčného typu⁹. Významný zdroj intratumorální heterogenity byl objasněn s objevem nádorových kmenových buněk (CSC, z angl. Cancer Stem Cells), což jsou nádorové buňky s vlastnostmi kmenových buněk, především schopností sebeobnovy, proliferace a diferenciaci. CSC mohou vzniknout mutací kmenové buňky konkrétní tkáně, nebo z progenitorové buňky, která schopnost sebeobnovy získá mutací¹⁰. Tyto buňky stojící na vrcholu hierarchického uspořádání nádorových buněk vykazují vysoký stupeň malignity, invazivity, pohyblivosti a odolnosti⁷ a obvykle jsou hlavní příčinou selhání onkologické léčby, protože pokud přežijí, může velmi rychle dojít k obnově nádoru a relapsu onemocnění¹⁰.

Za druhé, proces metastazování je tvořen celou řadou po sobě jdoucích a vzájemně propojených kroků, přičemž v kterémkoliv z nich může dojít k zastavení celého procesu⁹. Těmito kroky jsou: lokální invaze, přestup do blízkých krevních cév neboli intravazace, cirkulace, přilnutí k endotelu, extravazace, dormance (stav snížené či silně redukováné činnosti) a proliferace¹¹.

A za třetí, metastázy vznikají pouze ve specifických orgánech vzhledem k biologické jedinečnosti orgánového mikroprostředí. Jen velmi malé množství CTC je schopné vstoupit do nového mikroprostředí a přežít v něm jako diseminované nádorové buňky (DTC, z angl. Disseminated Tumor Cells)⁴. Úspěšnost nádorových buněk je pravděpodobně podmíněna citlivostí a adaptabilitou na proliferativní signály přítomné v novém mikroprostředí, které podporují jejich růst a invazivitu⁹. Ne všechny buňky jsou však schopné se na nové prostředí adaptovat a přechází do klidového stádia, což vede ke snížení množství DTC schopných progresu k tvorbě metastáz. Nicméně i toto prostředí se může měnit v důsledku stárnutí, nemoci či zranění a nakonec může dojít ke vzniku signálů, které v dormantních buňkách vyvolají proliferaci⁷.

2.1.1. Lokální invaze a epiteliálně mezenchymální přechod

U nádorů vycházejících z epiteliálních buněk bývá obvykle součástí lokální invaze do okolních tkání epiteliálně mezenchymální přechod (EMT, z angl. Epithelial-Mesenchymal Transition). EMT je reverzibilní, vysoce koordinovaný proces, který je charakterizován ztrátou epiteliálních znaků, především apiko-bazální polarity a naopak získáním mezenchymálních znaků. Při EMT dochází ke třem vzájemně propojeným procesům: změně tvorby povrchových proteinů, přestavbě cytoskeletu spojené s tvorbou výběžků a k produkci proteas. Tyto procesy jsou indukovány a regulovány celou řadou transkripčních a růstových faktorů¹¹. Zároveň jsou však známy případy agresivních a vysoce invazivních nádorů, u kterých CTC nevykazovaly znaky EMT, nebo u nich přeměna proběhla pouze částečně^{11,12}.

Pro EMT je klíčové uvolnění těsných spojů mezi buňkami a ztráta adheze v důsledku změny zastoupení povr-

chových proteinů¹². Jde především o kadheriny, zajišťující těsná spojení s ostatními buňkami, a integriny, které buňku ukotvují v bazální membráně. Vedle adhezivní funkce mají oba dva typy proteinů i signalizační funkci, takže se spolupodílejí i na dalších krocích EMT¹³. Integrinová a kadherinová výměna vede ke snížení afinity těchto buněk k jejich epiteliálním sousedům, čímž je podpořena jejich invazivita a schopnost migrace¹².

Dalším procesem, ke kterému dochází během EMT, je přestavba cytoskeletu. Na úrovni intermediálních filament jsou cytokeratiny nahrazeny vimentinem a dále jsou periferní aktinová vlákna nahrazena stresovými vlákny, která se shlukují v určitých oblastech¹³. S tím souvisí i další důležitý faktor podporující migraci buněk, kterým je produkce proteas, především matrixových metaloproteas, cysteinových kathepsinů a serinových proteas, jež podporují uvolňování mezibuněčných spojů, umožňují degradaci extracelulární matrix a bazální membrány a aktivují uvolňování růstových faktorů a chemokinů, aby byla buňka schopna opustit primární místo výskytu¹⁴.

2.1.2. Intravazace a cirkulace

Posledním krokem migrace z mikroprostředí primárního nádoru je intravazace neboli vstup CTC do krevních či lymfatických cév. Buď může jít o aktivní průchod, který vyžaduje zapojení specifických molekul např. chemokinů a adhezivních molekul, nebo jde o zcela pasivní a neregulovaný proces, při kterém dochází spíše k prorůstání celého nádoru přes stěnu cév^{15,16}. Dalším způsobem je kolektivní migrace, při které CTC s invazivním fenotypem prochází endotelem aktivně a další buňky pak využívají pozmeněného endotelu k pasivnímu průchodu¹⁵. Dalším faktorem, který usnadňuje transendoteliální migraci CTC, je neovaskularizace, protože endoteliální buňky nově vytvořených cév mají mezi sebou slabší spoje. Vedle potřeby zvýšeného zásobování živinami je to další z důvodů indukce angiogeneze¹⁷.

Za nejčastější cestu šíření CTC je považována krevní cirkulace, a přestože mohou být každý den do krve uvolňovány desetitisíce buněk, pouze malé procento přežije v tomto naprosto odlišném mikroprostředí¹⁴. Jakmile CTC vstoupí do krevního řečiště, stávají se velmi zranitelnými, protože jsou vystaveny jak mechanickým vlivům např. smykovým silám, tak imunitnímu systému a zároveň jim hrozí anoikis – apoptóza v důsledku ztráty adheze k extracelulární matrix¹⁶. Některé CTC jsou schopné vytvořit klastry označované jako cirkulující nádorové mikroembolie, které snižují náchylnost CTC k anoikis a zároveň se uplatňují v dalších fázích metastatické kaskády, protože mohou založit metastázy intravaskulárně bez potřeby extravazace¹¹. Tyto klastry zároveň často obsahují i stromální buňky z místa původu, které mohou zvyšovat schopnost proliferace. Dalším, více specifickým, způsobem rezistence vůči anoikis je potlačení aktivity kaspas účastnících se apoptózy¹⁶.

Hlavním obranným mechanismem před imunitním systémem je produkce tkáňového faktoru na povrchu CTC, která vede k lokální agregaci krevních destiček. Destičky pak tvoří jakýsi štít kolem CTC, který je chrání před kon-

taktem s NK buňkami (z angl. Natural Killer cells), jejichž lytický účinek je založen hlavně na přímém kontaktu s CTC. Aktivované destičky zároveň produkují transformující růstový faktor β , který inhibuje aktivitu NK buněk, a vaskulární endoteliální růstový faktor, který inhibuje zrání dendritických buněk. Z toho důvodu indikuje zvýšené riziko trombózy u onkologických pacientů rychlejší progresi onemocnění^{17,18}.

Existují i další obranné mechanismy, které jsou však specifické pouze pro určité typy CTC. Například cirkulující buňky karcinomu prsu produkují jaderný faktor kappa B, který ovlivňuje aktivitu tumorového nekrotizujícího faktoru α , jenž pak chrání CTC před útokem NK buněk. Buňky kolorektálního karcinomu na svém povrchu tvoří ve vyšším množství protein CD47, který by je pravděpodobně mohl chránit před fagocytózou makrofágy¹¹.

2.1.3. Extravazace a usídlení

Pro cílení CTC do určité tkáně jsou důležité receptory na jejich povrchu a následná chemotaxe k ligandům těchto receptorů^{11,14}. CTC karcinomu prsu nesou chemokinové receptory, jejichž ligandy se ve zvýšeném množství nacházejí v lymfatických uzlinách, plicích, játrech a kostní dřevě, což jsou tkáně, ve kterých se obvykle vyskytují metastázy odvozené od tohoto typu nádoru¹¹. Dalším zajímavým příkladem je neurotropní šíření pankreatického adenokarcinomu¹⁴. V případě některých nádorů však nad tropismem vítězí uspořádání cévního systému: CTC kolorektálního karcinomu často tvoří metastázy v játrech, přestože nejsou na toto prostředí adaptovány. Jejich velké množství, které je do jater přinášeno portálním oběhem, však výrazně zvyšuje pravděpodobnost jejich usídlení v jaterním parenchymu. V tomto případě jde tedy spíše o pasivní proces⁷.

K extravazaci dochází obvykle v menších kapilárách, kde se CTC v důsledku zúžení průsvitu kapilár zachytí. Zastavení může být podpořeno i přítomností klastru destiček obklopujících CTC, čímž je zvětšen jejich efektivní průměr. Poté následuje adheze na stěnu cév, které se účastní celá řada molekul včetně selektinů, integrinů, kadherinů či imunoglobulinových receptorů¹⁹. Adheze je zároveň podpořena i krevními destičkami, které produkcí celé řady faktorů zvyšují vaskulární permeabilitu a podporují růst, životnost a pohyblivost CTC (cit.¹⁸). Při dalším postupu skrz extracelulární matrix se opět uplatňují integriny, které umožňují adhezi k fibronektinu a lamininu a tedy další vstup do tkáně a kolonizaci¹².

Obecně je kolonizace velmi neefektivní proces a většina CTC, které se dostanou na sekundární místo, prodělá do 24 hodin od extravazace apoptózu. Ne všechny přeživší buňky se však dělí dostatečně rychle, aby daly vzniknout aktivně rostoucím makrometastázám. Některé buňky vytváří pouze malé mikrometastázy, které však dál nerostou, pravděpodobně v důsledku rovnováhy mezi proliferací a apoptózou⁷. Jiné buňky po úspěšné diseminaci vstupují do fáze dormance, která může trvat i několik let¹⁵. Jejich příčinou je často EMT, který buňky prodělaly v začátcích své migrace, protože mezenchymální fenotyp sice umožňuje snazší migraci, ale snižuje schopnost proliferace¹⁶. Proto u nich obvykle dochází k mezenchymálně epiteliál-

nímu přechodu (MET, z angl. Mesenchymal-Epithelial Transition), díky kterému se buňkám vrací vyšší agresivita a schopnost tvořit metastázy¹¹. Dalším důležitým faktorem, který podporuje proliferaci a tvorbu makrometastáz je vaskularizace, jež bývá obvykle vyvolána produkcí angiogenních růstových faktorů¹⁴.

Je odhadováno, že se úspěšnost CTC v procesu metastazování pohybuje pod hranicí 0,1 %. Nicméně i neúspěšné buňky mohou ovlivněním mikroprostředí v hostitelské tkáni napomoci založení metastáz z jiných CTC (cit.¹⁵).

2.2. Detekce cirkulujících nádorových buněk

Pro detekci CTC byla vyvinuta celá řada metod, kterým však kvůli nízké koncentraci CTC musí předcházet jejich separace ze vzorku.

Metody separace lze rozdělit na dvě hlavní skupiny podle toho, jestli využívají odlišných fyzikálních vlastností např. velikosti, deformability, hustoty a náboje, nebo biologických znaků, čímž je míněna především tvorba specifických povrchových proteinů. Některé metody oba přístupy kombinují²⁰. Obě skupiny metod můžeme ještě dále dělit na konvenční makroskopické analytické systémy a mikrofluidní zařízení. Výhody mikrofluidních zařízení oproti běžným metodám spočívají v nižší spotřebě vzorku a kratší době analýzy, takže mohou být použity při testování v místě péče o pacienta²¹.

K detekci úspěšně izolovaných CTC se pak nejčastěji využívá polymerasová řetězová reakce, imunohistologie a mikroskopie²⁰.

2.2.1. Metody separace založené na fyzikálních vlastnostech

Výhodou metod využívajících fyzikálních vlastností je skutečnost, že umožňují separaci bez potřeby označení protilátkami a nedochází tedy k aktivaci povrchových antigenů. Z makrotechnik je používána především filtrace, která umožňuje separaci na základě rozdílné velikosti buněk. Velkou výhodou je použitelnost metody pro buňky pocházející ze všech typů solidních tumorů a dále zachování viability a morfologických vlastností buněk s možností další kultivace a analýzy²².

Alternativou je izopyknická centrifugace v hustotním gradientu, při které částice migrují skrze médium s hustotním gradientem, dokud se nedostanou do bodu, ve kterém jejich hustota odpovídá okolnímu médiu. Syntetický sacharosový polymer s vysokou molekulární hmotností umožňuje oddělení částic s hustotou vyšší než 1,077 g ml⁻¹, tedy CTC, plasmy a mononukleárních buněk. Využívá se však přednostně pro separaci lidských mezenchymálních kmenových buněk. Jeho velkou nevýhodou je nízká účinnost a cytotoxicita^{21,23}. Rovněž je možno použít koloidní suspenzi křemíkových částic. Výhodou je vyšší účinnost, stále však dochází ke ztrátě buněk v důsledku promísení média s krví ještě před začátkem centrifugace. Tuto nevýhodu lze částečně překonat použitím porézní membrány, umístěné nad separačním médiem, čímž se zároveň zjednoduší i odběr buněk po separaci²¹.

Naprostu odlišný způsob izolace představuje využití akustoforézy, neboli separace částic za použití piezoelektrických převodníků, které vytvářejí stojaté vlnění. Pokud je buněčná suspenze vystavena akustickému poli, dochází k migraci buněk do kmiten (bod, který kmitá s největší amplitudou) či uzlů stojatého vlnění (bod, jehož amplituda je nulová) v závislosti na hustotě a stlačitelnosti buněk. CTC mají ve srovnání s ostatními buňkami vyšší hustotu a jsou stlačitelnější, takže se shlukují ve středu mikrokánalky, kde se nacházejí uzly, na rozdíl od ostatních buněk, jež migrují ke stěnám²¹.

Izolaci životaschopných CTC o vysoké čistotě umožňuje frakcionace tokem, která dělí buňky na základě rozdílné velikosti a deformability.

2.2.2. Metody separace využívající biologických vlastností

Pro izolaci CTC pomocí metod založených na výskytu specifických povrchových markerů lze využít dvě strategie. Buď tzv. pozitivní selekci, při které jsou protilátky cíleny na povrchové proteiny typické pro CTC, nebo tzv. negativní selekci, kdy jsou naopak použity protilátky proti CD45 a CD61, které jsou charakteristické pro leukocyty a megakaryocyty. Při pozitivní selekci jsou cílovými strukturami buď epiteliální markery např. EpCAM (z angl. Epithelial Cell Adhesion Molecule) a cytokeratiny, nebo konkrétní antigeny specifické pro nádor. Problém však nastává u CTC, které prošly EMT, a tak vzhledem k jejich mezenchymálnímu fenotypu nejsou zachyceny. U obou způsobů jsou protilátky navázány na magnetické kuličky, takže je možné je po interakci s buňkami oddělit od zbylé krve magnetickým polem²³.

Příkladem negativní selekce je technologie RosetteSepTM, která používá tetramerní komplexy protilátek, jež se vážou na specifické antigeny na povrchu buněk, které chceme odstranit a vytváří tak imunorozety s červenými krvinkami, jež lze oddělit od ostatních buněk centrifugací^{20,23}.

Jedním z mikročipů, který umožňuje záchyt a kvantifikaci CTC s vysokou specifitou a citlivostí je CytoTrapNanoTM CTC Enumeration systém, jehož součástí je CytoTrapNanoTM Chip známý též jako NanoVelcro, který se skládá ze dvou funkčních jednotek. Jednou z nich jsou křemíkové nanopilíře pokryté avidinem, takže mohou vázat biotinylované anti-EpCAM protilátky. Druhou částí je speciální mikrofluidní zařízení, které podporuje vertikální průtok krve čipem, což výrazně zvyšuje frekvenci interakcí mezi protilátkami a buňkami ve srovnání se statickým uspořádáním. Pro zobrazení buněk zachycených v čipu slouží fluorescenční mikroskop²⁴.

Oficiálně schváleným zařízením pro separaci CTC je CellSearch[®] CTC Test, který byl vyvinut pro kvantifikaci CTC v plné krvi. Prvním krokem je izolace epiteliální frakce buněk pomocí ferrofluidních částic s protilátkami proti EpCAM. Poté následuje imunofluorescenční značení protilátkami proti CD8, CD18, CD19 a CD45 pro rozlišení CTC a leukocytů. Zároveň se používá fluorescenční barvivo DAPI ke zvýraznění jader. Poté se kazeta s obarveným vzorkem vloží do přístroje CellTrack Analyzer II[®], který

na základě analýzy obrazu potvrdí či vyvrátí přítomnost CTC (cit.²⁵).

3. Závěr

Specifické a citlivé biologické markery jsou potřeba ve všech fázích diagnostiky onkologických onemocnění, ať již při screeningu, odhadu prognózy, volbě vhodné terapie, nebo při predikci či zhodnocení její účinnosti. Největšími výhodami vyšetření CTC jsou menší invazivita a jednoduchost odběru oproti klasické biopsii, podchycení intraindividuální heterogenity nádorových buněk, která může být příčinou neúčinnosti terapie, a možnost sériových odběrů, které umožňují dlouhodobé sledování léčby.

Autorky by rády poděkovaly zvláště doc. MUDr. Vladimíru Bobkovi Ph.D. a Mgr. Katarině Kološťové z Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Seznam použitých zkratk

CSC	nádorové kmenové buňky
CTC	cirkulující nádorové buňky
DTC	diseminované nádorové buňky
EMT	epiteliálně mezenchymální přechod
EpCAM	molekula epiteliální buněčné adheze
MET	mezenchymálně epiteliální přechod
NK buňky	typ lymfocytů tzv. „přírození zabijáci“
TEM	transendoteliální migrace

LITERATURA

- Hwang W. L., Pleskow H. M., Miyamoto D. T.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 125, 122 (2018).
- Lianidou E. S., Strati A., Markou A.: *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 51, 160 (2014).
- Klein C. A.: *Science* 321, 1785 (2008).
- Dasgupta A., Lim A. R., Ghajar C. M.: *Mol. Oncol.* 11, 40 (2017).
- Alix-Panabières C., Pantel K.: *Clin. Chem.* 59, 110 (2013).
- Ashworth T. R.: *Med. J. Aust.* 14, 146 (1869).
- Chaffer C. L., Weinberg R. A.: *Science* 331, 1559 (2011).
- Paget S.: *Lancet* 133, 571 (1889).
- Fidler I. J.: *Nat. Rev. Cancer* 3, 453 (2003).
- Jordan C. T., Guzman M. L., Noble M.: *N. Engl. J. Med.* 355, 1253 (2006).
- Caixeiro N. J., Kienzle N., Lim S. H., Spring K. J., Tognola A., Scott K. F., de Souza P., Becker T. M.: *Cancer Metastasis Rev.* 33, 747 (2014).
- Yilmaz M., Christofori G.: *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15 (2009).
- Micalizzi D. S., Farabaugh S. M., Ford H. L.: *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 117 (2010).
- Joyce J. A., Pollard J. W.: *Nat. Rev. Cancer* 9, 239 (2009).

15. Bidard F. C., Pierga J. Y., Vincent-Salomon A., Poupon M. F.: *Cancer Metastasis Rev.* 27, 5 (2008).
16. Joosse S. A., Gorges T. M., Pantel K.: *EMBO Mol. Med.* 7, 1 (2015).
17. Reymond N., d'Água B. B., Ridley A. J.: *Nat. Rev. Cancer* 13, 858 (2013).
18. Chang M. C., Jeng J. H., v knize: *Encyclopedia of Cancer* (Schwab M., ed.), str. 3793. Springer, Berlin 2011.
19. Ferreira M. M., Ramani V. C., Jeffrey S. S.: *Mol. Oncol.* 10, 374 (2016).
20. Yap T. A., Lorente D., Omlin A., Olmos D., de Bono J. S.: *Clin. Cancer Res.* 20, 2553 (2014).
21. Low W. S., Wan Abas W. A. B.: *BioMed Res. Int.* 2015, 239362 (2015).
22. Bobek V., Kolostova K., v knize: *Urothelial Carcinoma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 1655* (Schulz W. A., Hoffmann M. J., Niegisch G., ed.), kap. 20. Springer Science + Business Media LLC, New York 2018.
23. Alunni-Fabbroni M., Sandri M. T.: *Methods* 50, 289 (2010).
24. CytoLumina: <https://cytolumina.com/technology/cytotrap-nano-ctc-enumeration-system/>, staženo 10. 4. 2018.
25. Menarini Silicon Biosystems: <http://cellsearchctc.cllstg.net/>, staženo 10. 4. 2018.

T. Huličková and L. Karamonová (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Circulating Tumor Cells – a Promising Multifunctional Biomarker**

Circulating tumor cells are most often released into the blood or lymph from the primary tumor. They are distributed by circulation to other tissues, where they can form metastases. In clinical practice, these cells have a high potential because their collection is non-invasive and, in addition, their early detection and molecular characterization allow the choice of appropriate therapy and continuous monitoring of the effectiveness of anticancer treatment. This paper describes the mechanisms of penetration of tumor cells into the circulation, the possibilities of their survival in the bloodstream and ways of settling in the new organ microenvironment. It also focuses on various ways of separating these cells from the sample and the possibility of their subsequent detection.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: circulating tumor cells, metastases, metastatic cascade, biomarker

Acknowledgements

The authors would like to thank doc. MUDr. Vladimír Bobek Ph.D. and Mgr. Katarína Kološtová from the University Hospital Královské Vinohrady and the Third Faculty of Medicine, Charles University.

CIRCULATING TUMOR CELLS – A PROMISING MULTIFUNCTIONAL BIOMARKER

TEREZA HULIČKOVÁ
and LUDMILA KARAMONOVÁ

*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6
ludmila.karamonova@vscht.cz*

Keywords: circulating tumor cells, metastasis, metastatic cascade, biomarker

Content

1. Introduction
2. Circulating tumor cells
 - 2.1. Metastatic cascade
 - 2.1.1. Local invasion and epithelial-mesenchymal transition
 - 2.1.2. Intravasation and circulation
 - 2.1.3. Extravasation and resettlement
 - 2.2. Detection of circulating tumor cells
 - 2.2.1. Separation methods based on physical properties
 - 2.2.2. Separation methods using biological properties
3. Conclusion

1. Introduction

Currently, therapeutic decisions in cancer treatment are usually based on the analysis of biopsy samples of the primary tumor or metastases. However, due to the large temporal and spatial intra-individual heterogeneity of cancer cells, especially when subjected to selection pressure such as in systemic therapy, this approach may not be sufficient. Circulating tumor cells (CTCs) are an alternative. While a conventional biopsy is invasive and in some cases technically demanding, an 8 ml peripheral blood sample is sufficient to examine CTCs, which places significantly less burden on the patient. Due to its similarity to histological analysis, CTC is sometimes referred to as liquid biopsy¹. However, the biggest advantage of liquid biopsy over conventional biopsy is the possibility of serial sampling, which allows continuous monitoring of treatment and rapid response in case of changes in the molecular profile of tumor cells².

The use of CTC in diagnostics is also supported by the theory of early dissemination. Previously, dissemination was considered the terminal stage of malignant tumor

development. In recent years, however, it has been shown that dissemination is not the domain of highly differentiated tumors only, but can occur as early as the premalignant cell stage. The consequence is the parallel development of the primary lesion and its metastases, resulting in the accumulation of different genetic, epigenetic and other changes and an increase in heterogeneity³. Thus, CTCs can be detected in the blood even before the primary tumor is found. However, in a broader context, this discovery is not surprising, as the primary site of origin is unknown in 5–10% of all cases of metastatic cancer⁴.

Currently, research in CTCs is focused on four main areas: a deeper understanding of the metastatic process, estimating the risk of metastatic relapse or disease progression, identifying therapeutic targets and understanding the mechanism of chemoresistance⁵.

CTCs have a high potential in clinical practice, as their early detection and molecular characterization allow the selection of appropriate therapy and continuous monitoring of treatment efficacy¹.

2. Circulating tumor cells

CTCs were first described by the Australian physician Thomas Ramsden Ashworth, who, while dissecting a patient with multiple tumors, noticed a particular type of cells in his blood that matched the morphology of the cells isolated from the tumor⁶. Over the following years, his hypothesis that the presence of these cells in the patient's blood could explain the tumor spread throughout the body was gradually confirmed. These are mostly cells released from the primary tumor that pass through the bloodstream to other tissues where they can form secondary tumor foci or metastases. They are therefore directly involved in the process of metastasis, which is the main cause of cancer-related death. The mortality rate in these cases is as high as 90% (ref.⁷).

2.1. Metastatic cascade

Stephen Paget first tried to explain the process of metastasis in 1889 with his seed and soil theory. In this hypothesis, seeds represent CTCs that can only take hold in a compatible organ environment or nutrient soil⁸. Not only has this theory withstood competition from a number of other theories, but it has also been further developed. It is currently based on three main factors that influence the success of the process⁹.

First, the primary tumor often consists of many subpopulations of cells with different biological characteristics, including metastatic potential. This biological heterogeneity may be due to the multicellular origin of the tu-

mor, but has also been confirmed in cases of tumors arising from a single cell type⁹. An important source of intratumoral heterogeneity has been elucidated with the discovery of Cancer Stem Cells (CSCs), which are tumor cells with stem cell characteristics, particularly the ability to self-renew, proliferate and differentiate. CSCs can arise from a mutation of a stem cell of a specific tissue or from a progenitor cell that acquires the ability to self-renew by mutation¹⁰. Standing at the top of the cancer cell hierarchy, these cells exhibit a high degree of malignancy, invasiveness, motility and resistance⁷ and are usually the main cause of cancer treatment failure, as if they survive, tumor recurrence and disease relapse can occur very quickly¹⁰.

Second, the process of metastasis consists of a series of successive and interconnected steps, any of which can halt the process⁹. These steps are: local invasion, transfer to nearby blood vessels or intravasation, circulation, adherence to the endothelium, extravasation, dormancy (a state of reduced or severely reduced activity) and proliferation¹¹.

And third, metastases arise only in specific organs due to the biological uniqueness of the organ microenvironment. Only a very small number of CTCs are able to enter and survive in the new microenvironment as Disseminated Tumor Cells (DTCs)⁴. The success of tumor cells is likely to be determined by their sensitivity and adaptability to proliferative signals present in the new microenvironment that promote their growth and invasiveness⁹. However, not all cells are able to adapt to the new environment and enter a quiescent state, leading to a reduction in the number of DTCs capable of progression to metastasis. However, this environment can also change as a result of ageing, disease or injury, and eventually signals may be generated that trigger proliferation in dormant cells⁷.

2.1.1. Local invasion and epithelial-mesenchymal transition

In tumors arising from epithelial cells, epithelial-mesenchymal transition (EMT) is usually a part of the local invasion into the surrounding tissues. EMT is a reversible, highly coordinated process characterized by loss of epithelial features, especially apico-basal polarity, and gain of mesenchymal features. During EMT, three interrelated processes occur: alteration of surface protein formation, cytoskeleton remodeling associated with protrusion formation, and protease production. These processes are induced and regulated by a variety of transcription and growth factors¹¹. However, there are known cases of aggressive and highly invasive tumors in which CTCs did not show signs of EMT or in which the transformation was only partially performed^{11,12}.

The loosening of tight junctions between cells and the loss of adhesion due to changes in the abundance of surface proteins are crucial for EMT¹². These are mainly cadherins, which provide tight junctions with other cells, and integrins, which anchor the cell in the basement membrane. In addition to their adhesive function, both types of proteins have a signalling function, so that they are involved in other steps of EMT¹³. Integrin and cadherin switch leads to a reduction in the affinity of these cells for

their epithelial neighbours, thus promoting their invasiveness and ability to migrate¹².

Another process that occurs during EMT is cytoskeleton remodeling. At the level of intermediate filaments, cytokeratins are replaced by vimentin, and furthermore, peripheral actin filaments are replaced by stress fibers that cluster in specific regions¹³. Related to this is another important factor that promotes cell migration, which is the production of proteases, especially matrix metalloproteases, cysteine cathepsins and serine proteases, which promote the release of intercellular junctions, allow degradation of the extracellular matrix and basement membrane, and activate the release of growth factors and chemokines to enable the cell to leave its primary site¹⁴.

2.1.2. Intravasation and circulation

The final step of migration from the microenvironment of the primary tumor is intravasation or entry of CTCs into blood or lymphatic vessels. This can either be an active passage, requiring the involvement of specific molecules such as chemokines and adhesion molecules, or it can be a completely passive and unregulated process, where the entire tumor grows through the vessel wall^{15,16}. Another way is collective migration, in which CTCs with an invasive phenotype pass through the endothelium actively, and other cells then use the altered endothelium to passively pass through¹⁵. Another factor that facilitates transendothelial migration of CTCs is neovascularization, as the endothelial cells of the newly formed vessels have weaker connections between them. In addition to the need for increased nutrient supply, this is another reason for the induction of angiogenesis¹⁷.

Blood circulation is considered the most common route of spread of CTCs, and although tens of thousands of cells may be released into the blood each day, only a small percentage survive in this very different microenvironment¹⁴. Once CTCs enter the bloodstream they become very vulnerable as they are exposed to both mechanical influences e.g. shear forces and the immune system, as well as being at risk of anoikis - apoptosis due to loss of adhesion to the extracellular matrix¹⁶. Some CTCs are capable of forming clusters referred to as circulating tumor microemboli, which reduce the susceptibility of CTCs to anoikis and also apply at later stages of the metastatic cascade as they can establish metastases intravascularly without the need for extravasation¹¹. At the same time, these clusters often also contain stromal cells from the site of origin, which may enhance the ability to proliferate. Another, more specific, mode of resistance to anoikis is suppression of the activity of caspases involved in apoptosis¹⁶.

The main defense mechanism against the immune system is the production of tissue factor on the surface of CTCs, which leads to local platelet aggregation. The platelets then form a kind of shield around the CTCs, which protects them from contact with NK cells (Natural Killer cells), whose lytic effect is mainly based on direct contact with CTCs. Activated platelets also produce transforming growth factor β , which inhibits NK cell activity, and vascular endothelial growth factor, which inhibits dendritic

cell maturation. Therefore, the increased risk of thrombosis in cancer patients indicates a faster progression of the disease^{17,18}.

There are other defence mechanisms that are specific to certain types of CTCs. For example, circulating breast cancer cells produce nuclear factor kappa B, which influences the activity of tumor necrosis factor α , which in turn protects CTCs from NK cell attack. Colorectal cancer cells produce CD47 protein at higher levels on their surface, which could possibly protect them from phagocytosis by macrophages¹¹.

2.1.3. Extravasation and resettlement

Receptors on the surface of CTCs and subsequent chemotaxis to the ligands of these receptors are important for targeting CTCs to a particular tissue^{11,14}. Breast cancer CTCs carry chemokine receptors whose ligands are found in increased amounts in lymph nodes, lung, liver and bone marrow, tissues in which metastases derived from this type of tumor are usually found¹¹. Another interesting example is the neurotropic spread of pancreatic adenocarcinoma¹⁴. However, in some tumors, the vascular arrangement wins out over tropism: CTCs of colorectal cancer often form metastases in the liver, although they are not adapted to this environment. The large number of CTCs brought to the liver by the portal circulation greatly increases the likelihood of their settlement in the liver parenchyma. Thus, in this case, it is more of a passive process⁷.

Extravasation usually occurs in smaller capillaries where CTCs become trapped due to narrowing of the capillary permeability. Arrest may also be aided by the presence of a cluster of platelets surrounding the CTCs, thereby increasing their effective diameter. This is followed by adhesion to the vessel wall, which involves a variety of molecules including selectins, integrins, cadherins or immunoglobulin receptors¹⁹. Adhesion is also promoted by platelets, which increase vascular permeability and promote CTC growth, viability and motility by producing a number of factors¹⁸. Further progression through the extracellular matrix again involves integrins, which allow adhesion to fibronectin and laminin and thus further tissue penetration and colonization¹².

In general, colonization is a very inefficient process and most CTCs that reach the secondary site undergo apoptosis within 24 hours of extravasation. However, not all surviving cells divide rapidly enough to give rise to actively growing macrometastases. Some cells form only small micrometastases but do not continue to grow, probably due to a balance between proliferation and apoptosis⁷. Other cells, after successful dissemination, enter a dormancy phase that can last for several years¹⁵. This is often caused by EMT that the cells have undergone early in their migration, as the mesenchymal phenotype, while facilitating migration, reduces the ability to proliferate¹⁶. Therefore, cells usually go through a mesenchymal-epithelial transition (MET), which returns them to higher aggressiveness and the ability to form metastases¹¹. Another important factor that promotes the proliferation and formation of macrometastases is vascularisation, which is

usually triggered by the production of angiogenic growth factors¹⁴.

It is estimated that the success rate of CTCs in the metastatic process is below 0.1%. However, even unsuccessful cells can help to establish metastasis from other CTCs by affecting the microenvironment in the host tissue¹⁵.

2.2. Detection of circulating tumor cells

A number of methods have been developed for the detection of CTCs, but due to the low concentration of CTCs, these must be preceded by their separation from the sample.

Separation methods can be divided into two main groups according to whether they exploit different physical properties, e.g. size, deformability, density and charge, or biological features, meaning primarily the formation of specific surface proteins. Some methods combine both approaches²⁰. Both groups of methods can be further subdivided into conventional macroscopic analytical systems and microfluidic devices. The advantages of microfluidic devices over conventional methods are lower sample consumption and shorter analysis time, so they can be used for point-of-care testing²¹.

Polymerase chain reaction, immunohistology and microscopy are most commonly used to detect successfully isolated CTCs (ref.²⁰).

2.2.1. Separation methods based on physical properties

The advantage of methods using physical properties is that they allow separation without the need for labeling by means of antibodies and therefore do not activate surface antigens. Among the macro techniques, filtration is mainly used, which allows separation based on differences in cell size. The applicability of the method to cells derived from all types of solid tumors and the preservation of cell viability and morphological characteristics with the possibility of further culture and analysis are major advantages²².

An alternative is isopycnic density gradient centrifugation, in which particles migrate through a density gradient medium until they reach a point where their density matches the surrounding medium. The high molecular weight synthetic sucrose polymer allows separation of particles with a density greater than 1.077 g mL^{-1} , i.e. CTCs, plasma and mononuclear cells. However, it is preferably used for the separation of human mesenchymal stem cells. Its major drawback is low efficiency and cytotoxicity^{21,23}. A colloidal suspension of silica particles can also be used. This has the advantage of higher efficiency, but still results in cell loss due to mixing of the medium with blood before centrifugation begins. This disadvantage can be partially overcome by the use of a porous membrane placed over the separation medium, which also simplifies the collection of cells after separation²¹.

A completely different method of isolation is the use of acoustophoresis, or the separation of particles using piezoelectric transducers that create standing waves. When

a cell suspension is exposed to an acoustic field, the cells migrate into antinodes (the point that oscillates with the largest amplitude) or standing wave nodes (the point whose amplitude is zero) depending on the density and compressibility of the cells. CTCs have a higher density and are more compressible compared to other cells, so they cluster in the centre of the microchannel where the nodes are located, unlike other cells that migrate towards the walls²¹.

Isolation of high-purity viable CTCs is enabled by flow fractionation, which separates cells based on differences in size and deformability.

2.2.2. Separation methods using biological properties

Two strategies can be used to isolate CTCs using methods based on the presence of specific surface markers. Either so-called positive selection, in which antibodies are targeted to surface proteins typical of CTCs, or so-called negative selection, in which antibodies against CD45 and CD61, which are characteristic of leukocytes and megakaryocytes, are used instead. In positive selection, the target structures are either epithelial markers such as EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) and cytokeratins, or tumor-specific antigens. However, the problem arises with CTCs that have undergone EMT and thus are not captured due to their mesenchymal phenotype. In both methods, the antibodies are bound to magnetic beads so that they can be separated from the rest of the blood by magnetic fields after interaction with the cells²³.

An example of negative selection is the RosetteSep™ technology, which uses tetrameric antibody complexes that bind to specific antigens on the surface of the cells to be removed, forming immunorosets with red blood cells that can be separated from other cells by centrifugation^{20,23}.

One of the microchips that enables the capture and quantification of CTCs with high specificity and sensitivity is the CytoTrapNano™ CTC Enumeration System, which includes the CytoTrapNano™ Chip, also known as NanoVelcro, which consists of two functional units. One is silicon nanopillars coated with avidin so that they can bind biotinylated anti-EpCAM antibodies. The second part is a special microfluidic device that promotes vertical blood flow through the chip, which significantly increases the frequency of antibody-cell interactions compared to a static arrangement. A fluorescence microscope is used to visualize the cells trapped in the chip²⁴.

The officially approved device for CTC separation is the CellSearch® CTC Test, which was developed for the quantification of CTCs in whole blood. The first step is to isolate the epithelial fraction of cells using ferrofluid particles with antibodies against EpCAM. This is followed by immunofluorescent labeling with antibodies against CD8, CD18, CD19 and CD45 to distinguish between CTCs and leukocytes. At the same time, the fluorescent dye DAPI is used to highlight the nuclei. The cassette with the stained sample is then loaded into the CellTrack Analyzer II® to confirm or refute the presence of CTCs based on image analysis²⁵.

3. Conclusion

Specific and sensitive biomarkers are needed at all stages of cancer diagnosis, whether for screening, estimating prognosis, selecting appropriate therapy, or predicting or evaluating its efficacy. The greatest advantages of CTC testing are less invasiveness and simplicity of sampling compared to conventional biopsy, the detection of intra-individual heterogeneity of cancer cells that may cause ineffectiveness of therapy, and the possibility of serial sampling that allows long-term monitoring of treatment.

The authors would like to thank doc. MUDr. Vladimír Bobek Ph.D. and Mgr. Katarína Kološťová from the University Hospital Královské Vinohrady and the Third Faculty of Medicine, Charles University.

List of abbreviations used

CSC	Tumor Stem Cells
CTC	Circulating Tumor Cells
DTC	Disseminated Tumor Cells
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
MET	mesenchymal-epithelial transition
NK cells	type of lymphocytes called "Natural Killer cells"
TEM	transendothelial migration

REFERENCES

- Hwang W. L., Pleskow H. M., Miyamoto D. T.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 125, 122 (2018).
- Lianidou E. S., Strati A., Markou A.: *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 51, 160 (2014).
- Klein C. A.: *Science* 321, 1785 (2008).
- Dasgupta A., Lim A. R., Ghajar C. M.: *Mol. Oncol.* 11, 40 (2017).
- Alix-Panabières C., Pantel K.: *Clin. Chem.* 59, 110 (2013).
- Ashworth T. R.: *Med. J. Aust.* 14, 146 (1869).
- Chaffer C. L., Weinberg R. A.: *Science* 331, 1559 (2011).
- Paget S.: *Lancet* 133, 571 (1889).
- Fidler I. J.: *Nat. Rev. Cancer* 3, 453 (2003).
- Jordan C. T., Guzman M. L., Noble M.: *N. Engl. J. Med.* 355, 1253 (2006).
- Caixeiro N. J., Kienzle N., Lim S. H., Spring K. J., Tognola A., Scott K. F., de Souza P., Becker T. M.: *Cancer Metastasis Rev.* 33, 747 (2014).
- Yilmaz M., Christofori G.: *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15 (2009).
- Micalizzi D. S., Farabaugh S. M., Ford H. L.: *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 117 (2010).
- Joyce J. A., Pollard J. W.: *Nat. Rev. Cancer* 9, 239 (2009).
- Bidard F. C., Pierga J. Y., Vincent-Salomon A., Poupon M. F.: *Cancer Metastasis Rev.* 27, 5 (2008).
- Joose S. A., Gorges T. M., Pantel K.: *EMBO Mol.*

- Med. 7, 1 (2015).
17. Reymond N., d'Água B. B., Ridley A. J.: *Nat. Rev. Cancer* 13, 858 (2013).
 18. Chang M. C., Jeng J. H. , in the book: *Encyclopedia of Cancer* (Schwab M., ed.), p. 3793, Springer, Berlin 2011.
 19. Ferreira M. M., Ramani V. C., Jeffrey S. S.: *Mol. Oncol.* 10, 374 (2016).
 20. Yap T. A., Lorente D., Omlin A., Olmos D., de Bono J. S.: *Clin. Cancer Res.* 20, 2553 (2014).
 21. Low W. S., Wan Abas W. A. B.: *BioMed Res. Int.* 2015, 239362.
 22. Bobek V., Kolostova K., in the book: *Urothelial Carcinoma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 1655* (Schulz W. A., Hoffmann M. J., Niegisch G., eds.), chap. 20. Springer Science + Business Media LLC, New York 2018.
 23. Alunni-Fabbroni M., Sandri M. T.: *Methods* 50, 289 (2010).
 24. CytoLumina: <https://cytolumina.com/technology/cytrap-nano-ctc-enumeration-system/>, downloaded April 10, 2018.
 25. Menarini Silicon Biosystems. <http://cellsearchctc.cllstg.net/>, accessed April 10, 2018.

Abstract

Circulating tumor cells are most often released into the blood or lymph from the primary tumor. They are distributed by circulation to other tissues, where they can form metastases. In clinical practice, these cells have a high potential because their collection is non-invasive and, in addition, their early detection and molecular characterization allow the choice of appropriate therapy and continuous monitoring of the effectiveness of anticancer treatment. This paper describes the mechanisms of penetration of tumor cells into the circulation, the possibilities of their survival in the bloodstream and ways of settling in the new organ microenvironment. It also focuses on various ways of separating these cells from the sample and the possibility of their subsequent detection.