

Krażące komórki nowotworowe

KKN (CTC) - Źródło materiału dla nowoczesnej diagnostyki i monitorowania leczenia chorób nowotworowych

Artur Kowalik
Zakład Diagnostyki Molekularnej
Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach



Wprowadzenie

- * Choroby nowotworowe to obecnie jedna z głównych przyczyn zgonów na świecie.
- * Każdego roku z powodu choroby nowotworowej **umiera 8 mln.** Prognozuje się, że w 2030 roku umrze 13,2 miliona chorych.
- * 90% zgonów spowodowanych jest przerzutami (chorobą uogólnioną)
- * Główną rolę w powstawaniu przerzutów odgrywają krążące komórki nowotworowe KKN (ang. *circulating tumor cells* - CTC)



Powstawanie przerzutu

- * Lokalna inwazja
- * Intrawazacja
- * CTC
- * Extrawazacja
- * Namanżanie w miejscu przerzutu



* Historia badań CTC

Australijski lekarz Ashworth w 1869 roku po raz pierwszy opisał komórki nowotworowe we krwi pacjenta, które były identyczne z komórkami tworzącymi guz nowotworowy i zapisał „*such cells may tend to throw some light upon the mode of origin of multiple tumours existing in the same person*”



*Badanie CTC

Ze względu na niską częstość występowania etap badania CTC poprzedza etap wzbogacania.

Wzbogacanie można realizować w oparciu o:

- *Właściwości fizyczne (wielkość, zdolność do odkształceń, gęstość, ładunek elektryczny)
- *Właściwości biologiczne (ekspresja markerów powierzchniowych, żywotność, inwazyjność)



Metody wzbogacania CTC

*

Wzbogacanie:

- filtracja w oparciu o wielkość CTC na sitach molekularnych
- separacja CTC w gradiencie gęstości
- właściwości elektryczne
- w oparciu o powierzchniowe białka markerowe:
 1. Immunomagentyczne
 2. Chipy CTC
 3. FACS (sortowanie)

Jednakże pomimo tego ogólnoświatowego wysiłku brak jest urządzenia wzbogacającego całą heterogenną populację KKN



Dzięki wykorzystaniu próbki krwi do analizy CTC staje się możliwe regularne monitorowanie diagnostyki i leczenia pacjentów onkologicznych.

**CTC jako łatwo dostępny
materiał diagnostyczny**



*Zastosowanie CTC

*Lepsze niż metody radiologiczne ponieważ ich wykrycie poprzedza radiologicznie obecny nowotwór o kilka tygodniu do kilku miesięcy

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

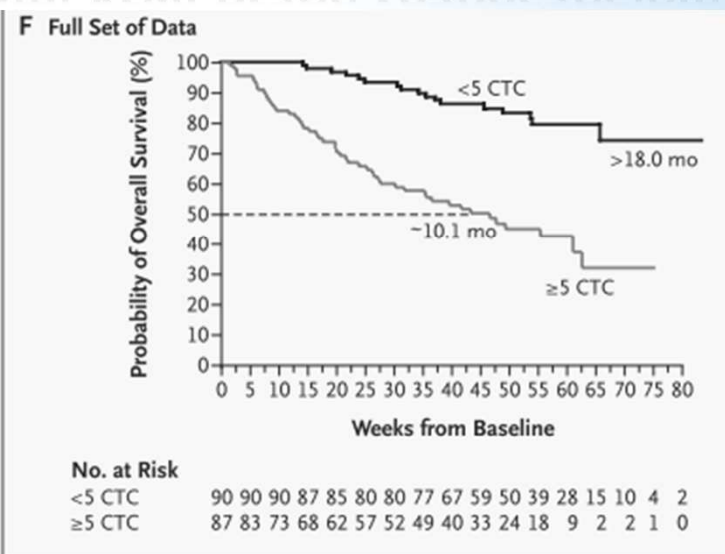
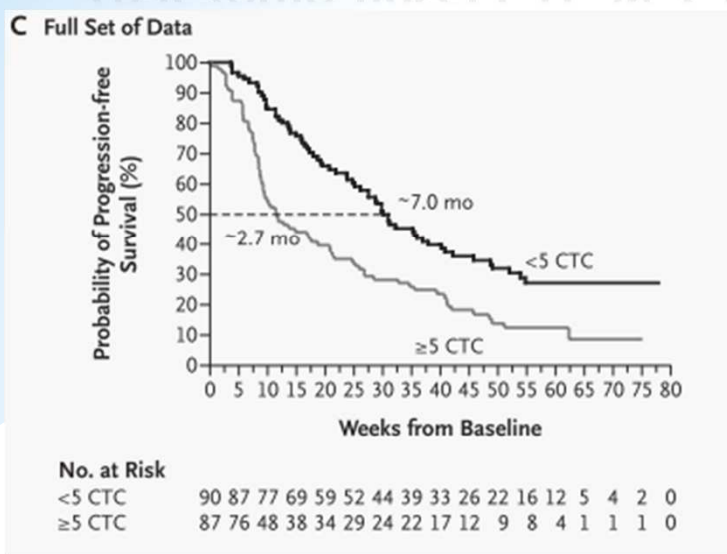
ORIGINAL ARTICLE

Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer

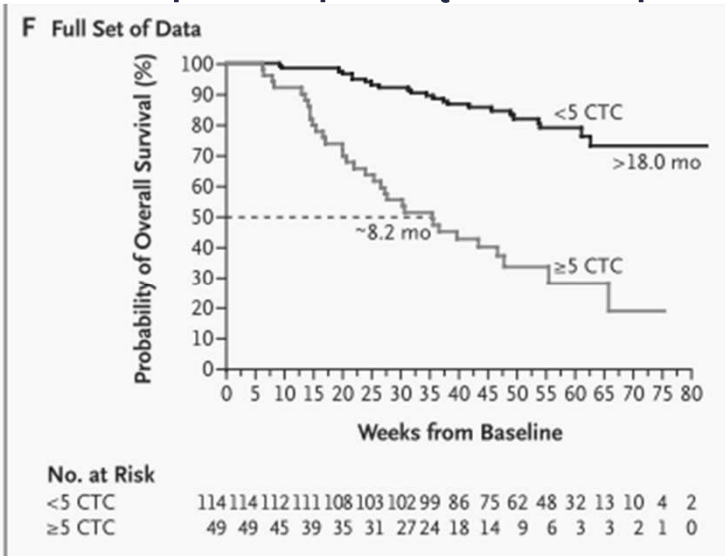
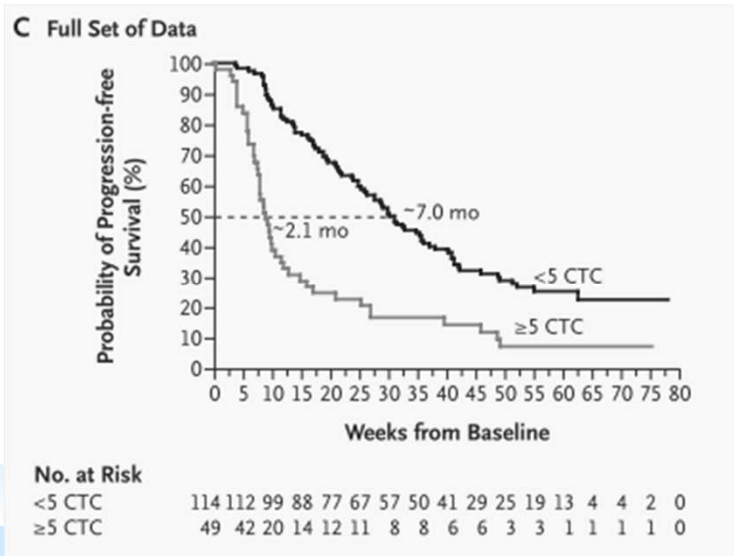
Massimo Cristofanilli, M.D., G. Thomas Budd, M.D., Matthew J. Ellis, M.B., Ph.D.,
Alison Stopeck, M.D., Jeri Matera, B.S., R.Ph., M. Craig Miller, B.S.,
James M. Reuben, Ph.D., Gerald V. Doyle, D.D.S., W. Jeffrey Allard, Ph.D.,
Leon W.M.M. Terstappen, M.D., Ph.D., and Daniel F. Hayes, M.D.

Pierwszy artykuł opublikowany w 2004 opisujący znaczenie kliniczne
znaczenie CTC dla prognozy

Znaczenie ilości CTC w 7,5ml krwi przed rozpoczęciem terapii



Znaczenie ilości CTC w 7,5ml krwi po rozpoczęciu terapii



Cristofanilli M. i in. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med. 2004 Aug 19;351(8):781-91.

Wykrywanie mutacji w CTC mających znaczenie dla personalizacji terapii



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

N ENGL J MED 359;4 WWW.NEJM.ORG JULY 24, 2008

Detection of Mutations in *EGFR* in Circulating Lung-Cancer Cells

Shyamala Maheswaran, Ph.D., Lecia V. Sequist, M.D., M.P.H.,
Sunitha Nagrath, Ph.D., Lindsey Ulkus, B.S., Brian Brannigan, B.A.,
Chey V. Collura, M.S., Elizabeth Inserra, B.S., Sven Diederichs, Ph.D.,
A. John Iafrate, M.D., Ph.D., Daphne W. Bell, Ph.D., Subba Digumarthy, M.D.,
Alona Muzikansky, M.S., Daniel Irimia, Ph.D., Jeffrey Settleman, Ph.D.,
Ronald G. Tompkins, M.D., Thomas J. Lynch, M.D., Mehmet Toner, Ph.D.,
and Daniel A. Haber, M.D., Ph.D.



*Dziękuję za uwagę

Planowane analizy dla sprawdzenia wydajności i jakości wzbogacanych KKN.

W celu określenia wydajności projektowanych sit oraz żywotności wzbogacanych CTC będą wykonane następujące badania:

próbki do badania wydajności sita:

- a) Linie komórkowe nowotworowe z określonymi mutacjami np. *EGFR*
- b) Izolowane komórki z guzów miareczkowane do krwi pochodzącej od zdrowych ochotników
- c) Próbki kliniczne

Dla zbadania przydatności klinicznej tak wzbogaconych komórek będą wykonane następujące analizy dla fenotypowania i genotypowania:

- Ekspresja markerów powierzchniowych - fotocytometria przepływowa,
- Analiza mutacji np., *KRAS*, *NRAS* czy *EGFR*, (NGS, qPCR, ddPCR sekwencjonowanie)
- Badanie poziomu ekspresji genów markerowych (qPCR, NGS)
- Analiza potencjału inwazyjności poprzez hodowle komórkowe