

WYBRANE METODY IZOLACJI I DETEKCJI KRAŻĄCYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH W RÓŻNYCH TYPACH NOWOTWORÓW

SELECTED ISOLATION AND DETECTION METHODS
OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN VARIOUS TUMORS

Paula KAMIŃSKA¹, Karolina BUSZKA^{1,2}, Joanna BUDNA-TUKAN¹

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

²Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie: Na całym świecie obserwuje się wzrost zachorowań na nowotwory różnego typu. Nierzadko ich leczenie wiąże się z wieloma trudnościami, stąd duże nadzieje pokłada się w nowoczesnych metodach diagnostycznych, które pozwolą wykryć chorobę w jak najwcześniejszym stadium. Ważnym aspektem klinicznym jest także skuteczny monitoring choroby, który pozwala przewidywać jej przebieg i kontrolować efekty terapii. Duże nadzieje pokłada się w detekcji krążących komórek nowotworowych (ang. *Circulating Tumor Cells*, CTC), które mogą być wykorzystane zarówno w diagnostyce, jak i kontroli efektywności leczenia. Z uwagi na ich małą liczbę w układzie krążenia, ciągle poszukuje się nowych metod izolacji i charakterystyki CTC oraz udoskonala już znane rozwiązania, w celu osiągnięcia jak największych korzyści klinicznych. W artykule przedstawiono wybrane, szeroko stosowane techniki izolacji i detekcji CTC, jak również omówiono ich wykorzystanie w wybranych nowotworach, tj. czerniaku, raku prostaty, płuc i jelita grubego.

Słowa kluczowe: krążące komórki nowotworowe, detekcja CTC, czerniak, rak prostaty, rak płuc, rak jelita grubego

Summary: The increase in the incidence rate of various types of cancer is noticed around the world. Frequently, cancer treatment is associated with many difficulties, hence many hopes are related to modern diagnostic methods, able to detect the disease at the earliest possible stage. An important clinical aspect is also effective disease monitoring, which allows to predict its course and control the effects of therapy. Thus, there is a great interest in Circulating Tumor Cells (CTC), which might be used in both diagnostics and monitoring of cancer diseases. Due to their low concentration in the circulatory system, new methods of CTC isolation and detection are constantly being sought

and the already known solutions are being improved to achieve the greatest clinical benefits. This article presents selected, widely used CTC isolation and characterization techniques as well as their application in various cancers: melanoma, prostate, lung and colorectal cancer.

Keywords: circulating tumor cells, CTC detection, melanoma malignant, prostate cancer, lung cancer, colorectal cancer

WPROWADZENIE

W ostatnich latach, krążące komórki nowotworowe (ang. *Circulating Tumor Cells*, CTC) zyskały popularność wśród badaczy. Wiele publikacji naukowych sugeruje ich wysoką przydatność, jako markera w diagnostyce różnych typów nowotworów. Do najszerzej opisanych z nich należy: rak stercza, rak płuc, rak jelita grubego, a relatywnie nowe doniesienia wskazują także na użyteczność CTC w czerniaku złośliwym. Oprócz diagnostyki chorób nowotworowych, wskazuje się na ich znaczenie w predykcji przebiegu choroby oraz monitoringu efektywności nowoczesnych terapii leczniczych, takich jak immunoterapia. Pomimo niedogodności związanych z małą liczbą CTC we krwi, co utrudnia ich wprowadzenie do rutynowego postępowania, powstają coraz bardziej doskonałe metody izolacji i detekcji CTC, a FDA (ang. *Food And Drug Administration*) zaakceptowało jedną z nich – system CellSearch® w diagnostyce raka piersi, prostaty i jelita grubego. Obecnie stosowane metody są nadal poddawane analizom porównawczym, w celu odnalezienia najlepszej, pozwalającej na efektywną detekcję i charakterystykę krążących komórek nowotworowych, a co za tym idzie poprawę sytuacji klinicznej wielu pacjentów. W artykule przedstawiono przegląd wybranych metod izolacji i detekcji CTC oraz ukazano ich praktyczne wykorzystanie w czterech typach nowotworów: czerniaku złośliwym, raku prostaty, płuc i jelita grubego.

KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Pierwsze doniesienia na temat krążących komórek nowotworowych zostały zaprezentowane w 1869 roku [61]. Są to komórki nowotworowe, które trafiają do układu krążenia w wyniku oderwania od guza pierwotnego [2]. By mogło ono nastąpić, komórki nowotworowe muszą okresowo ulegać odwracalnym zmianom fenotypowym w wyniku przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT). Podczas EMT dochodzi do zmian w obrębie cytoszkieletu komórki oraz utraty białek adhezyjnych – komórki zyskują mobilność, co umożliwia transport z pierwotnego ogniska do innych, odległych i podatnych tkanek. W docelowym miejscu komórki osiedlają się w wyniku procesu odwrotnego do EMT – przejścia mezenchymalno–nabłonkowego (ang. *Mesenchy-*

mal-Epithelial Transition, MET). Mechanizm inwazji oparty na tych procesach jest jednym z popularniejszych wyjaśnień powstawania przerzutów, choć niektóre dane wskazują, że CTC o pośrednim fenotypie są najbardziej plastyczne, a zatem bardziej agresywne i odporne na klasycznie stosowane metody leczenia [66, 81].

Krażące komórki nowotworowe są klasyfikowane na podstawie najczęstszej lokalizacji w organizmie. Te znajdujące się w szpiku kostnym i węzłach chłonnych określane są mianem DTC (ang. *Disseminated Tumor Cells*) lub ITC (ang. *Isolated Tumor Cells*) i są przyczyną powstawania nawrotów choroby po długim czasie od resekcji [2]. Najczęstsze określenie – krażące komórki nowotworowe, w rzeczywistości odnosi się do komórek krażących w naczyniach krwionośnych lub limfatycznych, choć w literaturze funkcjonuje jako pojęcie szersze, obejmujące wszystkie typy [11]. W czerniaku CTC noszą miano CMC (ang. *Circulating Melanoma Cells*) [67].

CTC we krwi mogą występować także w postaci agregatów, które nazywa się CTM (ang. *Circulating Tumor Microembrioli*). Zawierają one od kilku do kilkudziesięciu komórek krażących w układzie naczyniowym i prezentują bardzo wysoką zdolność do tworzenia przerzutów. Odpowiedzialna za tworzenie agregatów jest glikoproteina CD44, która jednocześnie chroni je przed specyficznym rodzajem apoptozy – anoikis, do którego dochodzi w wyniku niewystarczającej interakcji między komórką a macierzą [81, 15].

Agregaty mogą odrywać się bezpośrednio z guza lub powstawać w wyniku akumulacji pojedynczych CTC. Pomimo połączonej formy, posiadają zdolność do skutecznej separacji i diapedezy [4]. W niektórych przypadkach agregaty komórek mogą tworzyć zatorowość mikrozrostową w naczyniach, a niedotlenienie spowodowane embolizacją i/lub uwalnianiem TGF- β przez płytki krwi może indukować EMT komórek nowotworowych, co sprzyja atakowaniu narządów [39].

Wiele doniesień naukowych pojawiających się na przestrzeni lat sugeruje, że na podstawie obserwacji krażących komórek nowotworowych można dokonać diagnozy choroby nowotworowej, predykcji jej przebiegu [61, 60, 49], a ponadto monitoringu leczenia, co jest szczególnie przydatne w testowaniu nowych terapii. Uwaga naukowców coraz bardziej skupia się na doskonaleniu metod detekcji CTC, ze szczególnym uwzględnieniem tych, które pozwalają rozróżnić żywe komórki nowotworowe od martwych. Jest to istotne, ponieważ obecność tych pierwszych wiąże się ze zdolnością do tworzenia przerzutów, gwałtownym przebiegiem choroby oraz gorszym rokowaniem [3].

METODY IZOLACJI I DETEKCJI KRAŻĄCYCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Krażące komórki nowotworowe są wykrywane najczęściej w niewielkich próbkach krwi obwodowej [92]. Większość analiz polega na ocenie liczebności komórek i ich charakterystyce. Niektóre z metod pozwalają również na izolację

CTC i przeprowadzenie oznaczeń molekularnych [60]. Liczba wykrytych komórek waha się od 0 do ponad 10 000 na 10 ml krwi [92]. Utrudnieniem w analizie jest wysoka heterogenność CTC, która obserwowana jest nawet w komórkach pochodzących z tego samego guza [64]. Ponadto, z uwagi na relatywnie niską częstotliwość występowania krążących komórek nowotworowych wśród dużej liczby komórek krwi [67], właściwą analizę należy poprzedzić etapem wzbogacenia, czyli zwiększenia koncentracji docelowych komórek w próbce [2].

W celu oceny CTC istotnym jest oddzielenie ich od otaczających komórek krwi [49]. Wśród wielu opracowanych metod izolacji istnieją dwa podstawowe podejścia: systemy zależne od znaczników, czyli metody izolacji oparte na wykrywaniu specyficznych powierzchniowych markerów CTC (i/lub leukocytów) oraz systemy niezależne od znaczników, którymi są metody niezależne od specyficznych markerów, oparte na właściwościach fizycznych lub biologicznych CTC [54, 2].

Antygenem powierzchniowym charakterystycznym dla leukocytów jest glikoproteina CD45, która służy do selekcji negatywnej w wielu technikach [13,11], a najczęściej wykorzystywanym antygenem, charakterystycznym dla wielu typów nowotworów jest EpCAM (ang. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) [13], specyficzny marker tkanki nabłonkowej. Najnowsze techniki zależne od znaczników projektowane są tak, by wykrywać CTC na podstawie innych, bardziej specyficznych dla danego nowotworu antygenów.

Większość proponowanych technik ogranicza się do analizy niewielkich próbek krwi w warunkach *in vitro*, choć nie jest to jedyne rozwiązanie. Możliwa jest także izolacja krążących komórek nowotworowych w warunkach *in vivo*, poprzez umieszczenie w żyłę przedramienia detektora pokrytego przeciwciałami np. anti-EpCAM. Zaletą tego rozwiązania jest znacznie większa objętość analizowanej krwi niż w przypadku pojedynczej próbki, a tym samym potencjalnie wyższa efektywność wykrycia krążących komórek nowotworowych [11].

CELLSEARCH®

Zaaprobowany przez FDA do diagnostyki i monitorowania przebiegu raka prostaty, przerzutującego raka piersi i raka płuc, system CellSearch® polega na wychwytywaniu immunomagnetycznym i oznaczaniu fluorescencyjnym komórek posiadających ekspresję poszukiwanych markerów. Próbkę stanowi krew pełna. Na rynku dostępne są różne zestawy pozwalające na identyfikację: komórek śródbłonna (ekspresja CD146), nabłonkowych (ekspresja EpCAM) oraz komórek czerniaka (ekspresja MCAM/CD146). We wszystkich zestawach, immunoselekcja negatywna opiera się zwykle na wykorzystaniu antygeny CD45, w celu usunięcia z próbki leukocytów. Odczynnik DAPI dołączony do zestawu, pozwala wybarwić jądra komórkowe [89].

Procedura obejmuje dwa główne etapy: przygotowanie próbki oraz właściwą analizę, która polega na zliczaniu i identyfikacji CTC. Wykorzystywane są dwa

rodzaje odczynników: odczynnik wychwytyjący, zawierający cząstki posiadające rdzeń magnetyczny, pokryte przeciwciałem i odczynniki stosowane w barwieniu immunofluorescencyjnym. Cząstki z rdzeniem magnetycznym wytwarzają pole magnetyczne pozwalające na separację komórek, a ostateczna klasyfikacja komórek opiera się na kompatybilności fenotypów lub w oparciu o metody detekcji mRNA [89, 13].

Dostępne zestawy kontrolne zawierają linie komórkowe wykazujące ekspresję pożądanego markerów, pozwalające na wiarygodny odczyt uzyskanych wyników.

Niedogodnością metody jest niezdolność do wykrywania komórek nowotworowych, które nie wykazują ekspresji antygenu EpCAM, którego zanik obserwowany jest w efekcie procesu EMT [17].

EPISPOT

EPISPOT (ang. *Epithelial ImmunoSPOT*), czyli modyfikacja techniki ELISPOT (ang. *Enzyme-Linked ImmunoSPOT*), opiera się na detekcji białek, wydzielanych przez żywe krążące komórki nowotworowe. Martwe komórki, w odróżnieniu od tych pierwszych, nie są zdolne do produkcji i sekrecji białek, a przede wszystkim do tworzenia przerzutów [11]. Duża liczba wykrytych żywych komórek świadczy o gwałtownym postępie choroby.

Pierwszym etapem jest wzbogacenie, które może być oparte na właściwościach fizycznych i biologicznych komórek. System RosetteSep™ pozwala na szybką, relatywnie prostą izolację komórek. Leukocyty i inne niepożądane komórki tworzą tetrameryczne kompleksy z przeciwciałami (ang. *Rosettes*). W wyniku wirowania na gradientie gęstości, kompleksy te opadają na dno próbki, pozostawiając oczyszczone krążące komórki nowotworowe, które można poddać dalszej analizie [11, 79].

Następnie, komórki przez krótki czas są hodowane na membranie pokrytej przeciwciałami, wychwytyjącej produkowane białka. Związane białka są następnie wybarwiane dzięki zastosowaniu drugiego, wyznakowanego fluorochromem przeciwciała. Analiza przeprowadzana jest z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Każdy pozytywny sygnał reakcji odpowiada obecności pojedynczej CTC. Technika może być wykorzystywana do detekcji właściwie każdego typu nowotworu przy zastosowaniu przeciwciał przeciwko charakterystycznym dla niego białkom [3].

ADNATEST®

AdnaTest® należy do metod immunomagnetycznej selekcji pozytywnej. Czułość i swoistość wykrywania są zapewnione przez zastosowanie kombinacji przeciwciał, które wiążą się z różnymi epitopami i antygenami, uwzględniając zmienność ekspresji antygenów CTC [90].

W pierwszym etapie – zwiększania koncentracji komórek, kulki pokryte przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym selektywnie je wychwytyją [57, 18]. Zazwyczaj wykorzystywane są 3 różne przeciwciała cha-

rakterystyczne dla antygeny danego nowotworu, co pozwala uniknąć fałszywie pozytywnych wyników [90, 18]. Wychwycone komórki są wykrywane za pomocą metod PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) poprzez analizę grupy transkryptów specyficznych dla danego typu nowotworu [18, 57].

MAGSWEEPER

Inną, niekomercyjną metodą detekcji CTC, opartą na immunomagnetycznej separacji jest MagSweeper [88].

Do uzyskanej próbki krwi dodawane są wyznakowane magnetycznie przeciwciała anti-EpCAM (przeciwciała monoklonalne BerEP4) w celu selektywnego wyznakowania komórek pochodzenia nabłonkowego. Następnie wyznakowane komórki są wychwytywane z mieszaniny komórek krwi dzięki zastosowaniu wirujących prętów magnetycznych. Technologia MagSweeper umożliwia izolację rzadkich krążących komórek nowotworowych z krwi obwodowej pacjenta, bez konieczności jej lizy [88, 6, 78, 80]. Przeprowadzane są 2 cykle, z których każdy składa się z 3 etapów: wychwytywania, płukania i uwalniania komórek. W etapie wychwytywania pręty magnetyczne „wyławiają” docelowe komórki z próbki krwi. Etap płukania służy eliminacji niezwiązanych komórek i otrzymaniu czystej populacji CTC. Ostatni etap służy uwolnieniu komórek, które mogą być następnie analizowane [78]. Do czynników, które decydują o skuteczności metody należą: specyficzność zastosowanych przeciwciał, ograniczone wiązania niespecyficzne (niezwiązane z interakcją antygen-przeciwciała) oraz siła magnetyczna, odpowiednia do przyciągnięcia komórki [80]. Możliwe jest także zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko innym markerom powierzchniowym, co daje możliwości rozszerzenia metody na nowotwory niewykazujące ekspresji antygeny EpCAM [78].

NANOVELCRO CHIP

NanoVelcro Chip zaliczana jest do metod wykorzystujących podłoże nanostrukturalne, na którym immobilizowane są biotynylowane przeciwciała anti-EpCAM. Przepływające przez chip krążące komórki nowotworowe są wyłapywane przez przeciwciała i unieruchamiane na nośniku. W kolejnym kroku związane komórki są barwione, np. na obecność cytokeratyn, a następnie zliczane. Przedstawiono jak dotąd cztery generacje NanoVelcro, a każda z nich służy innej analizie CTC. W pierwszej generacji zastosowano podłoże nanostrukturalne (SiNS), nad którym umieszczono microfluidyczny mikser, umożliwiające zliczanie związanych komórek [42, 52]. Druga generacja służy izolacji CTC. W tej technice wykorzystuje się podłoże polimerowe i laserową analizę mikroskopową (ang. *Laser Microdissection*, LMD). W trzeciej generacji termoreaktywne szczotki polimerowe, poruszające się na SiNS, wychwytyują i uwalniają CTC, przy jednoczesnym zachowaniu żywotności komórek i ich integralności molekularnej. W celu oczyszczenia CTC z dobrze zachowanymi transkryptami

RNA, stosuje się czwartą generację NanoVelcro, w której wykorzystano specyficzny nanomateriał przewodzący o charakterze polimeru [42].

Test NanoVelcro, zaaprobowany przez dwie instytucje, wykazuje stałą skuteczność w wychwytywaniu CTC z próbek pacjentów [52].

CELLCOLLECTOR®

CellCollector® (GILUPI GmbH) jest pierwszą na świecie metodą do izolacji CTC *in vivo* [74, 36]. Technika ta umożliwia wyłapanie CTC bezpośrednio z krwi obwodowej poprzez aplikację detektora w żyłę ramiennej pacjenta [30]. Detektor, będący drutem ze stali nierdzewnej, posiada tzw. funkcjonalizowaną końcówkę [84, 36]. Jest ona pokryta 2µm warstwą złota oraz hydrożelową warstwą, do której kowalencyjnie przyłączone są przeciwciała. Najszerzej przetestowaną wersją detektora jest ta, wykorzystująca humanizowane mysie przeciwciała anty-EpCAM (HEA125). Dzięki ich obecności z krwi pacjenta „wyławiane” są EpCAM-pozytywne komórki CTC [84, 30]. Drut wprowadzany jest do żyły pacjenta na 30 minut, podczas których ma on kontakt z około 1 litrem krwi, co znacznie zwiększa szansę na izolację rzadkich komórek, jakimi są CTC w stosunku do metod *ex vivo* [30, 74]. Ponadto, zaletą urządzenia jest jego wysoka swoistość – w testach kontrolnych, przeprowadzonych na krwi zdrowych ochotników nie stwierdzono sygnałów fałszywie pozytywnych [30, 74].

Metoda niesie ze sobą małe niedogodności w postaci dyskomfortu porównywalnego do tego, odczuwanego podczas pobierania krwi oraz ryzyka omdleń, niedociśnienia czy zasinień [25]. Nie odnotowano jednak poważnych skutków ubocznych stosowania detektora [74], a w 2012 roku został on zatwierdzony przez Conformance Europeenne (CE) [36]. Test ten dzięki temu, że jest bezpieczny, dość łatwy i szybki w użyciu, potencjalnie mógłby być stosowany w placówkach medycznych do szybkiego diagnozowania pacjentów, nawet we wczesnych stadiach choroby [21, 30].

METODY OPARTE NA ANALIZIE PCR

Metody PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), również prowadzone w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*), są popularnymi metodami oceny ekspresji genów w różnych komórkach i tkankach [5]. Krążące komórki nowotworowe, poruszając się w układzie krwionośnym, uwalniają do niego materiał genetyczny, egzosomy oraz białka. Niektóre z metod koncentrują się na detekcji CTC na podstawie obecności jego ctDNA (ang. *Circulating Tumor DNA*) lub RNA. Mogą one stanowić samodzielne metody detekcji CTC lub łączone są z innymi technikami.

RT-PCR (ang. *Reverse-Transcription PCR*) jest jedną z powszechniejszych metod wykrywania mRNA białek nowotworowych. Zaletą tej metody jest wysoka wykrywalność CTC mimo zmiennego profilu ekspresji charakterystycznych antygenów [38, 48].

RT-qPCR (ang. *Reverse transcription-quantitative PCR*) jest czułą metodą oceny ilościowej mRNA, pozwalającą na wykrycie rzadkich transkryptów i małych wariacji w ekspresji genów, co jest szczególnie istotne w analizie CTC. Ocena ilościowa może być absolutna lub relatywna – absolutna pozwala uzyskać precyzyjną liczbę kopii mRNA, ale wymaga skonstruowania krzywej kalibracyjnej przy użyciu standardów o znanym stężeniu. Natomiast w drugim przypadku określa się ilość materiału genetycznego w próbce eksperymentalnej, jako jej krotność w stosunku do kalibratora [40].

Nowszymi metodami detekcji są ddPCR (ang. *Droplet-Based Digital PCR*) i NGS (ang. *Optimized Next Generation Sequencing*). Wykazują one wysoką czułość, specyficzność i precyzję wykrywania rzadkich sekwencji, a także pozwalają uwzględnić heterogenność i zmienność nowotworu. Ponadto, inwazyjność tych metod jest minimalna, co czyni je przydatnymi w regularnym monitoringu chorych [63]. Szczególnie przydatna jest tu technika NGS, składająca się z 4 etapów: ekstrakcji DNA [94, 34], przygotowania DNA [94, 37], etapu wzbogacenia i właściwego sekwencjonowania [94].

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE METOD IZOLACJI I DETEKЦИИ CTC W RÓŻNYCH TYPAH NOWOTWORÓW

CZERNIAK

Czerniak skóry (ang. *Cutaneous Melanoma Malignant*) wywodzi się z nieprawidłowych melanocytów. Choć statystycznie występuje rzadko – stanowi około 1% wśród innych nowotworów skóry, z uwagi na szybki rozwój i związane z tym utrudnione leczenie, współczynnik śmiertelności w przypadku tej choroby jest wysoki. Skłania to do poszukiwania nowych metod diagnostycznych, pozwalających również na monitoring przebiegu choroby [1].

Według klasyfikacji czerniaka proponowanej przez Światową Organizację Zdrowia, wyróżnia się jego 4 podstawowe podtypy: czerniak szerzący się powierzchownie (ang. *Superficial Spreading Melanoma*, SSM), czerniak wywodzący się ze złośliwej plamy soczewicowatej (łac. *Lentigo Maligna Melanoma*, LMM), czerniak guzkowy (ang. *Nodular Melanoma*, NM) oraz czerniak akralny (ang. *Acrolentiginous Melanoma*, ALM) [9, 47].

Poszczególne podtypy różnią się między sobą lokalizacją, cechami histologicznymi, grubością zmian oraz wiekiem pacjentów [47]. Zachorowaniu sprzyja w większości przypadków nadmierna ekspozycja na promieniowanie UV i związane z nią poparzenia słoneczne oraz uwarunkowania genetyczne, przejawiające się w występowaniu dużej liczby znamion czy charakterystycznych cech wyglądu określanych, jako fototyp pierwszy w skali Fitzpatricka (jasny kolor skóry, oczu, włosów) [68]. Najczęstsze mutacje w czerniaku związane są z genami *NF1*,

NRAS, *KIT* oraz *BRAF*. Te ostatnie dominują typie non-CSD (ang. *Non-Cumulative Skin Damage*), który nie jest związany z uszkodzeniem posłonecznym [76].

Klasyczna diagnostyka czerniaka opiera się na wycięciu podejrzanej zmiany skórnej i poddaniu tkanki ocenie histopatologicznej. Wykrycie nieprawidłowych komórek sugeruje powtórny zabieg chirurgiczny z poszerzeniem marginesu pierwotnego wycięcia [56] i biopsję węzła wartowiczego, w celu opanowania procesu przerzutowania. Proponowanym leczeniem w przypadku wystąpienia przerzutów jest terapia systemowa [86]. Wykorzystanie radioterapii w leczeniu czerniaka zostało zakwestionowane z uwagi na fakt, że jego komórki wykazują w stosunku do niej oporność [28]. Istnieje hipoteza, że radioterapia wzmacnia efekty immunoterapii, która jest nowym i obiecującym podejściem w walce z czerniakiem [23].

Alternatywą dla klasycznej diagnostyki czerniaka jest detekcja CMC. Ich izolacja i charakterystyka oparta jest głównie na wykazaniu obecności antygenów powierzchniowych, tj. MCAM (ang. *Melanoma Cell Adhesion Molecule*, MCAM/MUC18/CD146), MART-1 (ang. *Melanoma Antigen Recognized by T cells 1/Melan-A*) [53], opisywany, jako sprzyjający progresji czerniaka [67, 95, 46], a ponadto przydatny w oznaczeniach immunocytochemicznych [43] oraz MAGE-A3 (ang. *Melanoma Antigen A3*), obiecujący, jako cel immunoterapii w czerniaku [70].

Obecność MART-1, MAGE-A3 jak również antygenów PAX3 (ang. *Paired Box 3*) i GM2/GD2 (ang. *Ganglioside GM2/ Ganglioside GD2*) została skorelowana ze stopniem zaawansowania choroby i skróconym przeżyciem [29]. W celu wykrycia ekspresji genu *MAGE-A3* zastosować można RT-qPCR, który wykazuje swoistość i czułość w zakresie analitycznym [33]. CMC wykrywać można tą metodą również na podstawie obecności mRNA tyrozynazy, która ulega ekspresji na melanocytach i komórkach czerniaka [72].

Z kolei metoda ddPCR pozwala wykryć charakterystyczne dla choroby mutacje *BRAF* (BRAFV600E), *NRAS* oraz *TERT* i może być wykorzystana w monitorowaniu efektów leczenia po zastosowaniu immunoterapii i ewentualnych nawrotów choroby [20, 73].

Antygen EpCAM nie ma praktycznego zastosowania w izolacji i detekcji CMC ze względu na brak jego ekspresji na komórkach pochodzenia melanocytarnego [67, 93]. Większość metod, jako docelowy wykorzystuje antygen MCAM, np. CellSearch® CMC kit, lub bazuje na właściwościach fizycznych i/lub biologicznych tych komórek.

Metodą konkurencyjną do CellSearch® pod względem efektywności jest S100-EPISPOT. W analizie EPISPOT kluczowe jest wykrycie produkowanych przez CMC białek z rodziny s100, szczególnie: s100A1, s100A13 oraz s100B [91]. CellSearch® nie pozwala rozróżnić komórek żywych od martwych, stąd EPISPOT może okazać się lepszą metodą do oceny prawdopodobieństwa wystąpienia przerzutów. Analiza porównawcza obu metod wykazała, że CellSearch®

charakteryzował się większą wartością prognostyczną (istotny związek z całkowitym przeżyciem), jednak S100-EPISPOT okazał się znacznie czulszą techniką, wykazując wyższy odsetek pacjentów, z co najmniej dwiema CMC [16].

RAK PROSTATY

W 2018 roku odnotowano 1,28 miliona nowych przypadków zachorowań na raka prostaty i około 360 tysięcy zgonów nim wywołanych [22]. Postęp medycyny przyczynił się do udoskonalenia metod rezonansu magnetycznego, obrazowania funkcjonalnego i poprawy stratyfikacji ryzyka [50]. Pomimo to, nowotwór ten nadal stanowi poważny problem medyczny, z uwagi na trudności z właściwym doбором terapii, odpowiedniej dla łagodnej bądź złośliwej formy [87, 32]. Komórki nowotworowe przedostają się drogą węzłów chłonnych najczęściej do wątroby i płuc. Częste są również przerzuty kostne, które objawiają się silnym bólem kości, hiperkalcemią i częstymi złamaniami [87]. Wystąpienie przerzutów wiąże się z wysokim ryzykiem zgonu.

Ścisły monitoring choroby i leczenie miejscowe są rozwiązaniem preferowanym u pacjentów, u których stężenie białka PSA (ang. *Prostate Specific Antigen*) nie przekracza 10 ng/ml, a co za tym idzie nowotwór ma wolniejszy przebieg. W leczeniu miejscowym stosuje się radioterapię i zabiegi chirurgiczne, jednak często wiążą się one z obniżającymi jakość życia objawami, tj. zaburzeniami seksualnymi, czy nietrzymaniem moczu [7, 50]. W przypadku wystąpienia przerzutów, leczeniem z wyboru jest chemioterapia. Ponadto w chorobie stosuje się leczenie przeciwan-drogenowe (ang. *Androgen Deprivation Therapy*, ADT) [50, 82].

Rutynowe badania przesiewowe w kierunku raka prostaty mają na celu wczesne wykrycie choroby i określenie jej stadium. Do tej pory za najbardziej użyteczne uważa się określenie stężenia białka PSA w surowicy pacjentów [59, 7], przyczyniające się do znacznego obniżenia śmiertelność z powodu tego nowotworu [59]. Niestety, pomimo powszechnego zastosowania, marker ten nie jest specyficzny dla raka prostaty, a jego obecność wykazano również w przypadku zmian o charakterze łagodnym, co może prowadzić do zbędnych biopsji narządu. Stąd, potrzeba znalezienia bardziej specyficznego markera w rutynowej diagnostyce raka prostaty [24]. Za takie biomarkery uważa się obecnie krążące komórki nowotworowe, ich materiał genetyczny, czy egzosomalny, wraz z zawartymi w nich białkami i RNA, określane wspólnym mianem płynnej biopsji.

Metody wykrywania CTC mogą przyczynić się do poprawy diagnostyki nowotworu prostaty i monitoringu efektów leczenia, a ponadto uzupełnić powszechnie stosowane testy diagnostyczne. Nadrzędnym celem tych działań jest skuteczna identyfikacja pacjentów z rakiem wysokiego ryzyka [10].

Jedną ze stosowanych w tym celu technik jest AdnaTest[®]. W przypadku raka prostaty bazuje ona na detekcji antygenów KLK3 (ang. *Kallikrein Related Peptidase 3*), KLK2 (ang. *Kallikrein Related Peptidase 2*), PSMA (ang. *Prostate-*

-*Specific Membrane Antygen*), HOXB13 (ang. *Homeobox Protein 13*), GRHL2 (ang. *Grainyhead Like Transcription Factor 2*), FOXA1 (ang. *Forkhead Box A1*), a także obecności krótkich form receptora androgenowego (ang. *Androgen Receptor*, AR). W analizie genów wyżej wymienionych białek znajduje zastosowanie technika molekularna ddPCR.

Bazująca na ekspresji antygeny EpCAM, technologia CellSearch[®], charakteryzowała się porównywalną czułością i niższą skutecznością w zestawieniu z opisywanymi AdnaTest[®] i ddPCR [18]. Ponadto, technika AdnaTest[®], zależnie od zastosowanego wariantu, wykazała obecność CTC u pacjentów w różnych stadiach raka stercza, również tych z przerzutami, obecność nowotworowych komórek macierzystych, a nawet komórek ulegających EMT. Bezdyskusyjną zaletą omawianej technologii okazała się szeroka gama stosowanych markerów, tj. PSA, PSMA, AR, C-MET (ang. *Tyrosine-Protein Kinase Met*), C-KIT (ang. *Tyrosine-Protein Kinase Kit*) oraz syntetazy tymidylanowej (ang. *Thymidylate Synthetase*, TYMS), pozwalających na stratyfikację pacjentów według stadium zaawansowania nowotworu [71].

Z kolei MagSweeper wykazuje podobną efektywność wychwytu CTC do metody CellSearch[®], jednak w przeciwieństwie do niej, pozwala na izolację czystej subpopulacji żywych krążących komórek nowotworowych, z dobrze zachowanym transkryptomem. Pozwala to na dalsze przeprowadzenie analiz molekularnych, dostarczających cennych informacji klinicznych [14].

Użyteczny klinicznie okazał się również system NanoVelcro. Jak dotąd zastosowano go do monitorowania przebiegu terapii systemowej w raku prostaty. Analizy dotyczyły korelacji liczby CTC ze stanem klinicznym pacjentów przed i po 4-10 tygodniach terapii [52].

Technologia EPISPOT, wykrywająca wyłącznie produkty żywych komórek, w przypadku raka prostaty jest ukierunkowana na białko PSA oraz FGF2 (ang. *Fibroblast Growth Factor*). Badania, w których zastosowano ten test, u pacjentów ze zlokalizowanym nowotworem prostaty, wykazywały wykrywalność CTC w zakresie 58,7%-71% [45, 75].

Z kolei CellCollector[®], dający możliwość analizy większych objętości krwi poprzez bezpośrednie wychwytywanie CTC z krwi pacjenta, cechował się wyższą czułością i efektywnością w stosunku do metody CellSearch[®] [30].

Porównanie trzech metod identyfikacji krążących komórek nowotworowych – CellSearch[®], EPISPOT i CellCollector[®], w badaniu pacjentów z miejscowym nowotworem prostaty pokazało, że system CellSearch[®] charakteryzował się najniższym wskaźnikiem wykrywalności CTC, wynoszącym zaledwie 14%, w stosunku do CellCollector[®] i EPISPOT, których wykrywalność stanowiła odpowiednio 48% i 42% [12]. Wy tłumaczeniem tak zaskakującego wyniku w przypadku metody CellSearch[®] mógł być fakt, że u pacjentów bez przerzutów ilość krążących we krwi CTC jest znacznie mniejsza [65].

RAK PŁUC

Rak płuc w skali globalnej jest najbardziej śmiertelną chorobą nowotworową. Mimo znacznych postępów w diagnostyce i leczeniu, raporty WHO podsumowujące skalę zachorowań i zgonów na nowotwory wykazały, że nowe przypadki raka płuc zdiagnozowano u 2 milionów przedstawicieli obu płci. W tym samym roku z powodu tej choroby zmarło ponad 1,5 miliona pacjentów [22].

Wyróżnia się cztery typy histologiczne raka płuc: gruczolakoraki, raki płaskonabłonkowe, niedrobnokomórkowe oraz drobnokomórkowe [85, 55]. Choć w większości przypadków rak płuc jest wywołany paleniem tytoniu, siła tej zależności jest determinowana typem histologicznym raka. Raki drobnokomórkowe i płaskonabłonkowe uważa się za wywołane wyłącznie paleniem, zaś gruczolakoraki nie są w tak dużym stopniu z nim powiązane [55].

Pięcioletnie przeżycie pacjenta ze zlokalizowanym rakiem płuc jest 13 razy wyższe od pacjentów z rakiem płuc z odległymi przerzutami [77, 96, 27]. Niestety przy obecnych metodach diagnostycznych, takich jak tomografia komputerowa (CT) lub pozytronowa tomografia emisyjna (PET) około 40% pacjentów z rakiem płuc w momencie diagnozy prezentuje obecność przerzutów. Dlatego też, istotnym jest opracowywanie specyficznych metod diagnostycznych do wczesnego wykrycia i leczenia pacjentów.

Jako złoty standard w diagnostyce raka płuca uznaje się badanie histopatologiczne. Jest ono jednak metodą inwazyjną, nie zawsze jednoznaczną, która obciążona jest ryzykiem odmy opłucnowej lub krwotoku. Najczęściej wybieranymi markerami nowotworowymi w diagnozowaniu raka płuc są: CEA (ang. *Carcino Embryonic Antigen*), CYFRA 21-1 (ang. *Cytokeratin Fragment Antigen 21-1*), SCCA (ang. *Squamous Cell Carcinoma Antigen*), NSE (ang. *Neuron Specific Enolase*) i CA 242 (ang. *Carbohydrate Antigen 242*). Niestety ich czułość i swoistość nie są w pełni satysfakcjonujące [41].

Większość metod detekcji CTC, wykorzystywanych w diagnostyce raka płuc opiera się na ekspresji antygenu powierzchniowego EpCAM. Inne, stosowane markery to HER2 (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), MUC1 (ang. *Mucin 1*) oraz cytokeratyny 8, 18 i 19 [51, 8, 62].

Dobrze rokującą metodą detekcji CTC w raku płuc jest AdnaTest®. Uważa się, że test ten charakteryzuje się większą czułością wykrywania CTC w niedrobnokomórkowym raku płuc w stosunku do referencyjnej metody CellSearch®. Za pomocą AdnaTest® CTC wykazano u 29% badanych, podczas gdy CellSearch® umożliwił ich wykrycie tylko u 15% pacjentów. Korzystne wydaje się być połączenie obu metod – wykrywalność CTC wzrosła wówczas do 40% [35].

Inną, stosunkowo nową techniką detekcji CTC u pacjentów z rakiem płuc jest metoda CellCollector®. Można ją uznać za wysoce skuteczną, gdyż CellCollector® umożliwił detekcję CTC (≥ 1 CTC) u 58% badanych pacjentów, podczas gdy detekcja CTC za pomocą “złotego standardu” CellSearch® okazała się pozytywna

u 27% pacjentów [30]. W innym badaniu CellCollector® został zastosowany do detekcji CTC u pacjentów we wczesnym stadium niedrobnokomórkowego raka płuc, gdzie CTC wykryto aż u 94,1% pacjentów [26].

Metody detekcji CTC niezależne od konkretnego markera, wykorzystują określone fizyczne lub biologiczne właściwości tych komórek do ich izolacji. Obejmują one separację na podstawie gęstości, wielkości (Screencell®), określonych właściwości elektrycznych (dielektroforeza) oraz zdolności inwazyjnej CTC (VitaAssay™) [54].

RAK JELITA GRUBEGO

Według raportu WHO, w 2018 roku na świecie nowotwór jelita grubego został wykryty u ponad miliona pacjentów i spowodował śmierć 500 tysięcy osób [22].

Rozwój raka jelita grubego jest procesem długotrwałym. W procesie transformacji nabłonka, prowadzącym do powstania raka jelita grubego, dochodzi do co najmniej 5 zmian na poziomie molekularnym, głównie na drodze dwóch szlaków. W 85% raków jelita grubego dochodzi do niestabilności chromosomalnej (CIN), zaś 15% przypadków jest spowodowane zdarzeniami powodującymi niestabilność mikrosatelitarną (MSI), znaną również, jako błąd replikacji (RER) [44].

Do czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka jelita grubego należy palenie tytoniu, spożywanie czerwonego i/lub przetworzonego mięsa, alkoholu, niewielkie spożycie warzyw i owoców, otyłość czy cukrzyca typu II [19].

Rutynowa kolonoskopia jest stosowana w diagnostyce wczesnych stadiów nowotworu, jednak jej inwazyjność zniechęca pacjentów do regularnych badań. Wśród osób, u których zdiagnozowano raka jelita grubego, około 20% będzie przechodzić chorobę z przerzutami. Regionalne węzły chłonne, wątroba, płuca i otrzewna to w przypadku raka jelita grubego najczęstsze miejsca przerzutów. Perforacja i/lub niedrożność jelit wiąże się ze złym rokowaniem, bez względu na stadium nowotworu [83].

Stosując różne metody detekcji CTC u pacjentów z rakiem jelita grubego (np. CellSearch®) stwierdzono niższe stężenie CTC w porównaniu z rakiem prostaty czy piersi. Może to być spowodowane wiązaniem EpCAM-pozytywnych CTC w wątrobie, obserwowane w raku jelita grubego [69]. Niedogodności te spowodowały konieczność zastosowania innych rozwiązań u pacjentów z tym typem raka. Dobre rezultaty przyniosło połączenie dwóch metod – CellSearch® i AdnaTest®, w celu zwiększenia skuteczności detekcji CTC [69, 58, 31]. Połączenie to spowodowało wzrost wskaźnika wykrywania z 30% do 50% (wskaźnik dla testów wykonanych osobno wynosił 30% dla AdnaTest® i 33% dla CellSearch®) [31].

Do detekcji CTC u pacjentów z rakiem jelita grubego zastosowano również CellCollector®. Badania porównawcze objęły CellCollector® i metodę referencyjną CellSearch®. Wyniki pokazały, że za pomocą pierwszej z nich wykryto 135 komórek, zaś przy użyciu CellSearch® 161. Podkreślono jednak, że za pomocą

CellCollector® wykryto ≥ 1 CTC u 41,3% pacjentów, a za pomocą CellSearch u 31,3%. Wyniki sugerują zatem, że detekcja CTC u pacjentów z rakiem jelita grubego za pomocą CellCollector® nie charakteryzuje się lepszą wydajnością w porównaniu do technologii CellSearch® [21].

PODSUMOWANIE

Wczesne wykrycie choroby nowotworowej u pacjentów daje większe możliwości leczenia i zwiększa szanse na przeżycie. Tradycyjne metody diagnostyczne nie zawsze pozwalają na wykrycie choroby w jej początkowym stadium, a część z nich nie należy do bezpiecznych czy komfortowych dla pacjenta. Dobrym wyborem wydaje się być detekcja i charakterystyka krążących komórek nowotworowych, jako markerów choroby oraz w celu oceny przebiegu jej leczenia. Istnieje wiele metod izolacji i detekcji CTC, które mogą opierać się zarówno na obecności specyficznych markerów na powierzchni komórek jak i ich fizycznych właściwościach. Warto podkreślić, że metody detekcji CTC cechują się zróżnicowaną skutecznością w różnych typach raków. Niemniej jednak, wykazano, że ich łączenie znacząco poprawia wydajność detekcji. Pewnym jest, że metody te będą ulegać ciągłemu ulepszaniu, już teraz stanowiąc dobre narzędzie diagnostyczne w wielu typach nowotworów.

LITERATURA

- [1] ALI Z, YOUSAF N, LARKIN J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl* 2013; **11(2)**: 81-91.
- [2] ALIX-PANABIÈRES C, SCHWARZENBACH H, PANTEL K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012; **63**: 199-215.
- [3] ALIX-PANABIÈRES C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012; **195**: 69-76.
- [4] ALLEN TA, ASAD D, AMU E, HENSLEY MT, CORES J, VANDERGRIF A, TANG J, DINH P-U, SHEN D, QIAO L, SU T, HU S, LIANG H, SHIVE H, HARRELL E, CAMPBELL C, PENG X, YODER JA, CHENG K. Circulating tumor cells exit circulation while maintaining multicellularity, augmenting metastatic potential. *J Cell Sci* 2019; **132(17)**: jcs231563.
- [5] BACHMAN J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol* 2013; **530**: 67-74.
- [6] BANKÓ P, LEE SY, NAGYGYÖRGY V, ZRÍNYI M, CHAE CH, CHO DH, TELEKES A. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol* 2019; **12(1)**: 48.
- [7] BARRY MJ, SIMMONS LH. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am* 2017; **101(4)**: 787-806.
- [8] BOUILLEZ A, ADEEGBE D, JIN C, HU X, TAGDE A, ALAM M, RAJABI H, WONG K-K, KUFU D. MUC1-C promotes the suppressive immune microenvironment in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2017; **6(9)**: e1338998.
- [9] BROEKAERT SM, ROY R, OKAMOTO I, VAN DEN OORD J, BAUER J, GARBE C, BARNHILL RL, BUSAM KJ, COCHRAN AJ, COOK MG, ELDER DE, MCCARTHY SW, MIHM MC, SCHADENDORF D, SCOLYER RA, SPATZ A, BASTIAN BC. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; **23(6)**: 763-770.

- [10] BRONCY L, PATERLINI-BRÉCHOT P. Clinical Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Localized Prostate Cancer. *Cells* 2019; **8(7)**: 676.
- [11] BUDNA J, ŚWIERCZEWSKA M, JANKOWIAK A, ZABEL M. Detekcja krążących komórek nowotworowych przy zastosowaniu techniki EpiSPOT. *Post Biol Komórki* 2015; **42(3)**: 401-416.
- [12] BUDNA-TUKAN J, ŚWIERCZEWSKA M, MAZEL M, CIEŚLIKOWSKI WA, IDA A, JANKOWIAK A, ANTCZAK A, NOWICKI M, PANTEL K, AZRIA D, ZABEL M, ALIX-PANABIÈRES C. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-Metastatic High-Risk Prostate Cancer before and after Radiotherapy Using Three Different Enumeration Assays. *Cancers (Basel)* 2019; **11(6)**: 802.
- [13] CABEL L, PROUDHON C, GORTAIS H, LOIRAT D, COUSSY F, PIERGA J-Y, BIDARD F-C. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol* 2017; **22(3)**: 421-430.
- [14] CANN GM, GULZAR ZG, COOPER S, LI R, LUO S, TAT M, STUART S, SCHROTH G, SRINIVAS S, RONAGHI M, BROOKS JD, TALASAZ AH. mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS One* 2012; **7(11)**: e49144.
- [15] CAO Z, LIVAS T, KYPRIANOU N. Anoikis and EMT: Lethal „Liaisons” during Cancer Progression. *Crit Rev Oncog* 2016; **21(3-4)**: 155-168.
- [16] CAYREFOURCQ L, DE ROECK A, GARCIA C, STOEBCNER P-E, FICHEL F, GARIMA F, PERRIARD F, DAURES J-P, MEUNIER L, ALIX-PANABIÈRES C. S100-EPISPOT: A New Tool to Detect Viable Circulating Melanoma Cells. *Cells* 2019; **8(7)**: 755.
- [17] CHIKAISHI Y, YONEDA K, OHNAGA T, TANAKA F. EpCAM-independent capture of circulating tumor cells with a „universal CTC-chip”. *Oncol Rep* 2017; **37(1)**: 77-82.
- [18] DANILA DC, SAMOILA A, PATEL C, SCHREIBER N, HERKAL A, ANAND A, BASTOS D, HELLER G, FLEISHER M, SCHER HI. Clinical Validity of Detecting Circulating Tumor Cells by AdnaTest Assay Compared With Direct Detection of Tumor mRNA in Stabilized Whole Blood, as a Biomarker Predicting Overall Survival for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. *Cancer J* 2016; **22(5)**: 315-320.
- [19] DEKKER E, TANIS PJ, VLEUGELS JLA, KASI PM, WALLACE MB. Colorectal cancer. *Lancet* 2019; **394(10207)**: 1467-1480.
- [20] DIEFENBACH RJ, LEE JH, RIZOS H. Monitoring Melanoma Using Circulating Free DNA. *Am J Clin Dermatol* 2019; **20(1)**: 1-12.
- [21] DIZDAR L, FLUEGEN G, VAN DALUM G, HONISCH E, NEVES RP, NIEDERACHER D, NEUBAUER H, FEHM T, REHDERS A, KRIEG A, KNOEFEL WT, STOECKLEIN NH. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using the GILUPI CellCollector: results from a prospective, single-center study. *Mol Oncol* 2019; **13(7)**: 1548-1558.
- [22] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, MATHERS C, PARKIN DM, PIÑEROS M, ZNAOR A, BRAY F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; **144(8)**: 1941-1953.
- [23] FRANCESCHINI D, FRANZESE C, NAVARRIA P, ASCOLESE AM, DE ROSE F, DEL VECCHIO M, SANTORO A, SCORSETTI M. Radiotherapy and immunotherapy: Can this combination change the prognosis of patients with melanoma brain metastases?. *Cancer Treat Rev* 2016; **50**: 1-8.
- [24] FUJITA K, NONOMURA N. Urinary biomarkers of prostate cancer. *Int J Urol* 2018; **25(9)**: 770-779.
- [25] GALENA HJ. Complications occurring from diagnostic venipuncture. *J Fam Pract* 1992; **34(5)**: 582-584.
- [26] GASIOROWSKI L, DYSZKIEWICZ W, ZIELINSKI P. In-vivo isolation of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients by CellCollector. *Neoplasma* 2017; **64(6)**: 938-944.
- [27] GELVAN A, RISUM S, LANGER SW. Incidence and survival from lung cancer in Greenland is comparable to survival in the Nordic countries. *Dan Med J* 2015; **62(4)**: A5033.
- [28] GORAYSKI P, BURMEISTER B, FOOTE M. Radiotherapy for cutaneous melanoma: current and future applications. *Future Oncol* 2015; **11(3)**: 525-534.
- [29] GORGES K, WILTFANG L, GORGES TM, SARTORI A, HILDEBRANDT L, KELLER L, VOLKMER B, PEINE S, BABAYAN A, MOLL I, SCHNEIDER SW, TWAROCK S, MOHR P,

- FISCHER JW, PANTEL K. Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. *Cancers (Basel)* 2019; 11(11): 1685.
- [30] GORGES TM, PENKALLA N, SCHALK T, JOOSSE SA, RIETHDORF S, TUCHOLSKI J, LÜCKE K, WIKMAN H, JACKSON S, BRYCHTA N, VON AHSEN O, SCHUMANN C, KRAHN T, PANTEL K. Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 2016; **22(9)**: 2197-2206.
- [31] GORGES TM, STEIN A, QUIDDE J, HAUCH S, RÖCK K, RIETHDORF S, JOOSSE SA, PANTEL K. Improved Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic Colorectal Cancer by the Combination of the CellSearch® System and the AdnaTest®. *PLoS One* 2016; **11(5)**: e0155126.
- [32] GROZESCU T, POPA F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life* 2017; **10(1)**: 5-12.
- [33] GRUELLE O, COCHE T, LOUAHED J. Development of a Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of MAGE-A3-Positive Tumors. *J Mol Diagn* 2015; **17(4)**: 382-391.
- [34] GUHA P, DAS A, DUTTA S, CHAUDHURI TK. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *J Clin Lab Anal* 2018; **32(1)**: e22181.
- [35] HANSEN A, WAGNER J, GORGES TM, TAENZER A, UZUNOGLU FG, DRIEMEL C, STOECKLEIN NH, KNOEFEL WT, ANGENENDT S, HAUCH S, ATANACKOVIC D, LOGES S, RIETHDORF S, PANTEL K, WIKMAN H. Characterization of different CTC subpopulations in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2016; **6**: 28010.
- [36] HE Y, SHI J, SHI G, XU X, LIU Q, LIU C, GAO Z, BAI J, SHAN B. Using the New CellCollector to Capture Circulating Tumor Cells from Blood in Different Groups of Pulmonary Disease: A Cohort Study. *Sci Rep* 2017; **7(1)**: 9542.
- [37] HEAD SR, KOMORI HK, LAMERE SA, WHISENANT T, VAN NIEUWERBURGH F, SALOMON DR, ORDOUKHANIAN P. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques* 2014; **56(2)**: 61-77.
- [38] HINZ S, HENDRICKS A, WITTIG A, SCHAFMAYER C, TEPEL J, KALTHOFF H, BECKER T, RÖDER C. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients – a prospective study. *BMC Cancer* 2017; **17(1)**: 53.
- [39] HONG Y, LI Z, ZHANG Q. A circulating tumor cell cluster-based model for tumor metastasis (Hypothesis). *Oncol Lett* 2016; **12(6)**: 4891-4895.
- [40] HO-PUN-CHEUNG A, BASCOUL-MOLLEVI C, ASSENAT E, BOISSIÈRE-MICHOT F, BIBEAU F, CELLIER D, YCHOU M, LOPEZ-CRAPEZ E. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization. *BMC Mol Biol* 2009; **10**: 31.
- [41] HUANG H, SHI Y, HUANG J, WANG X, ZHANG R, CHEN H. Circulating tumor cells as a potential biomarker in diagnosis of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Respir J* 2018; **12(2)**: 639-645.
- [42] JAN YJ, CHEN JF, ZHU Y, LU Y-T, CHEN SH, CHUNG H, SMALLEY M, HUANG Y-W, DONG J, CHEN L-C, YU H-H, TOMLINSON JS, HOU S, AGOPIAN VG, POSADAS EM, TSENG H-R. NanoVelcro rare-cell assays for detection and characterization of circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; **125**: 78-93.
- [43] JOSHI P, JACOBS B, DERAKHSHAN A, MOORE LR, ELSON P, TRIOZZI PL, BORDEN E, ZBOROWSKI M. Enrichment of circulating melanoma cells (CMCs) using negative selection from patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* 2014; **5(9)**: 2450-2461.
- [44] KAUH J, BRAWLEY OW, BERGER M. Racial disparities in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 2007; **31(3)**: 123-133.
- [45] KUSKE A, GORGES TM, TENNSTEDT P, TIEBEL A-K, POMPE R, PREIBER F, PRUES S, MAZEL M, MARKOU A, LIANIDOU E, PEINE S, ALIX-PANABIÈRES C, RIETHDORF S, BEYER B, SCHLOMM T, PANTEL K. Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients. *Sci Rep* 2016; **6**: 39736.

- [46] LEI X, GUAN CW, SONG Y, WANG H. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell Int* 2015; **15(1)**: 3.
- [47] LEITER U, EIGENTLER T, GARBE C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2014; **810**: 120-140.
- [48] LI K, BROWNLEY A. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol* 2010; **630**: 271-299.
- [49] LIANIDOU ES, MARKOU A, STRATI A. The Role of CTCs as Tumor Biomarkers. *Adv Exp Med Biol* 2015; **867**: 341-367.
- [50] LITWIN MS, TAN HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* 2017; **317(24)**: 2532-2542.
- [51] LIU S, LI S, HAI J, WANG X, CHEN T, QUINN MM, GAO P, ZHANG Y, JI H, CROSS DAE, WONG K-K. Targeting *HER2* Aberrations in Non-Small Cell Lung Cancer with Osimertinib. *Clin Cancer Res* 2018; **24(11)**: 2594-2604.
- [52] LU YT, ZHAO L, SHEN Q, GARCIA MA, WU D, HOU S, SONG M, XU X, OUYANG W-H, OUYANG WW-L, LICHTERMAN J, LUO Z, XUAN X, HUANG J, CHUNG LWK, RETTIG M, TSENG H-R, SHAO C, POSADAS EM. NanoVelcro Chip for CTC enumeration in prostate cancer patients. *Methods* 2013; **64(2)**: 144-152.
- [53] MA J, FRANK MH. Isolation of Circulating Melanoma Cells. *Methods Mol Biol* 2015; 10.1007/7651_2015_300.
- [54] MALY V, MALY O, KOLOSTOVA K, BOBEK V. Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *In Vivo* 2019; **33(4)**: 1027-1037.
- [55] MEZA R, MEERNIK C, JEON J, COTE ML. Lung cancer incidence trends by gender, race and histology in the United States, 1973-2010. *PLoS One* 2015; **10(3)**: e0121323.
- [56] MISHRA H, MISHRA PK, EKIELSKI A, JAGGI M, IQBAL Z, TALEGAONKAR S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; **144(12)**: 2283-2302.
- [57] MÜLLER V, RIETHDORF S, RACK B, JANNI W, FASCHING PA, SOLOMAYER E, AKTAS B, KASIMIR-BAUER S, PANTEL K, FEHM T, DETECT STUDY GROUP. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res* 2012; **14(4)**: R118.
- [58] NORMANNO N, CERVANTES A, CIARDIELLO F, DE LUCA A, PINTO C. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treat Rev* 2018; **70**: 1-8.
- [59] ORNSTEIN DK, PRUTHI RS. Prostate-specific antigen. *Expert Opin Pharmacother* 2000; **1(7)**: 1399-1411.
- [60] PANTEL K, HILLE C, SCHER HI. Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: From Discovery to Clinical Utility. *Clin Chem* 2019; **65(1)**: 87-99.
- [61] PAOLETTI C, HAYES DF. Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol* 2016; **882**: 235-258.
- [62] PERZANOWSKA A, FATALSKAA A, WOJTAS G, LEWANDOWICZ A, MICHALAK A, KRASOWSKI G, BORCHERS CH, DADLEZ M, DOMANSKI D. An MRM-Based Cytokeratin Marker Assay as a Tool for Cancer Studies: Application to Lung Cancer Pleural Effusions. *Proteomics Clin Appl* 2018; **12(2)**: 10.1002/prca.201700084.
- [63] POSTEL M, ROOSEN A, LAURENT-PUIG P, TALY V, WANG-RENAULT SF. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; **18(1)**: 7-17.
- [64] POWELL AA, TALASAZ AH, ZHANG H, CORAM MA, REDDY A, DENG G, TELLI ML, ADVANI RH, CARLSON RW, MOLLICK JA, SHETH S, KURIAN AW, FORD JM, STOCKDALE FE, QUAKE SR, PEASE RF, MINDRINOS MN, BHANOT G, DAIRKEE SH, DAVIS RW, JEFFREY SS. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One* 2012; **7(5)**: e33788.
- [65] RACK B, SCHINDLBECK C, JÜCKSTOCK J, ANDERGASSEN U, HEPP P, ZWINGERS T, FRIEDL TWP, LORENZ R, TESCH H, FASCHING PA, FEHM T, SCHNEEWEISS A, LICHTENEGGER W, BECKMANN MW, FRIESE K, PANTEL K, JANNI W, SUCCESS STU-

- DY GROUP. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; **106**(5): dju066.
- [66] RAJA R, PANDEY A, KUMAR P. Epithelial to mesenchymal plasticity: role in cancer progression. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2020; **25**: 838-873.
- [67] RAPANOTTI MC, CAMPIONE E, SPALLONE G, ORLANDI A, BERNARDINI S, BIANCHI L. Minimal residual disease in melanoma: circulating melanoma cells and predictive role of MCAM/MUC18/MelCAM/CD146. *Cell Death Discov* 2017; **3**: 17005.
- [68] RASTRELLI M, TROPEA S, ROSSI CR, ALAIBAC M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014; **28**(6): 1005-1011.
- [69] RIETHDORF S, O'FLAHERTY L, HILLE C, PANTEL K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; **125**: 102-121.
- [70] ROEDER C, SCHULER-THURNER B, BERCHTOLD S, VIETH G, VON DEN DRIESCH P, SCHULER G, LÜFTL M. MAGE-A3 is a frequent tumor antigen of metastasized melanoma. *Arch Dermatol Res* 2005; **296**(7): 314-319.
- [71] RUSSO GI, BIER S, HENNENLOTTER J, BEGER G, PAVLENCO L, VAN DE FLIERDT J, HAUCH S, MAAS M, WALZ S, RAUSCH S, BEDKE J, MORGIA G, STENZL A, TODENHÖFER T. Expression of tumour progression-associated genes in circulating tumour cells of patients at different stages of prostate cancer. *BJU Int* 2018; **122**(1): 152-159.
- [72] SALVIANTI F, COSTANZA F, SONNATI G, PINZANI P. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells by Quantitative Real-Time PCR. *Methods Mol Biol* 2020; **2065**: 139-151.
- [73] SALVIANTI F, MASSI D, DE GIORGI V, GORI A, PAZZAGLI M, PINZANI P. Evaluation of the liquid biopsy for the detection of BRAFV600E mutation in metastatic melanoma patients. *Cancer Biomark* 2019; **26**(3): 271-279.
- [74] SAUCEDO-ZENI N, MEWES S, NIESTROJ R, GASIOROWSKI L, MURAWA D, NOWACZYK P, TOMASI T, WEBER E, DWORACKI G, MORGENTHALER NG, JANSEN H, PROPPING C, STERZYŃSKA K, DYSZKIEWICZ W, ZABEL M, KIECHLE M, REUNING U, SCHMITT M, LÜCKE K. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol* 2012; **41**(4): 1241-1250.
- [75] SCHWARZENBACH H, ALIX-PANABIÈRES C, MÜLLER I, LETANG N, VENDRELL J-P, REBILLARD X, PANTEL K. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15**(3): 1032-1038.
- [76] SHAIN AH, BASTIAN BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**(6): 345-358.
- [77] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**(1): 5-29.
- [78] SIEUWERTS AM, JEFFREY SS. Multiplex molecular analysis of CTCs. *Recent Results Cancer Res* 2012; **195**: 125-140.
- [79] SOLER A, CAYREFOURCQ L, MAZEL M, ALIX-PANABIÈRES C. EpCAM-Independent Enrichment and Detection of Viable Circulating Tumor Cells Using the EPISPOT Assay. *Methods Mol Biol* 2017; **1634**: 263-276.
- [80] TALASAZ AH, POWELL AA, HUBER DE, BERBEE JG, ROH K-H, YU W, XIAO W, DAVIS MM, PEASE RF, MINDRINOS MN, JEFFREY SS, DAVIS RW. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(10): 3970-3975.
- [81] TAYOUN T, FAUGEROUX V, OULHEN M, ABERLENC A, PAWLIKOWSKA P, FARACE F. CTC-Derived Models: A Window into the Seeding Capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs). *Cells* 2019; **8**(10): 1145.
- [82] TEO MY, RATHKOPF DE, KANTOFF P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med* 2019; **70**: 479-499.
- [83] THANIKACHALAM K, KHAN G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* 2019; **11**(1): 164.

- [84] THEIL G, FISCHER K, WEBER E, MEDEK R, HODA R, LÜCKE K, FORNARA P. The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes – A Proof-of-Concept Study. *PLoS One* 2016; **11(8)**: e0158354.
- [85] TRAVIS WD, LUBIN J, RIES L, DEVESA S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer* 1996; **77(12)**: 2464-2470.
- [86] VAN ZEIJL MC, VAN DEN EERTWEGH AJ, HAANEN JB, WOUTERS MW. (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma. *Eur J Surg Oncol* 2017; **43(3)**: 534-543.
- [87] WANG G, ZHAO D, SPRING DJ, DEPINHO RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev* 2018; **32(17-18)**: 1105-1140.
- [88] WANG Y, NAVIN NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell* 2015; **58(4)**: 598-609.
- [89] www.cellsearchruo.com/ruo-products/kits [dostęp: 01.06.2020]
- [90] www.qiagen.com/us/applications/liquid-biopsy/ctc [dostęp: 02.06.2020]
- [91] XIONG TF, PAN FQ, LI D. Expression and clinical significance of S100 family genes in patients with melanoma. *Melanoma Res* 2019; **29(1)**: 23-29.
- [92] XU MJ, DORSEY JF, AMARAVADI R, KARAKOUSIS G, SIMONE CB, XU X, XU W, CARPENTER EL, SCHUCHTER L, KAO GD. Circulating Tumor Cells, DNA, and mRNA: Potential for Clinical Utility in Patients With Melanoma. *Oncologist* 2016; **21(1)**: 84-94.
- [93] YANAGITA M, LUKE JJ, HODI FS, JÄNNE PA, PAWELETZ CP. Isolation and characterization of circulating melanoma cells by size filtration and fluorescent in-situ hybridization. *Melanoma Res* 2018; **28(2)**: 89-95.
- [94] YOHE S, THYAGARAJAN B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2017; **141(11)**: 1544-1557.
- [95] YOSHIOKA S, FUJIWARA H, HIGUCHI T, YAMADA S, MAEDA M, FUJII S. Melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) is expressed on human luteinizing granulosa cells: enhancement of its expression by hCG, interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Mol Hum Reprod* 2003; **9(6)**: 311-319.
- [96] YU JB, SOULOS PR, CRAMER LD, DECKER RH, KIM AW, GROSS CP. Comparative effectiveness of surgery and radiosurgery for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer* 2015; **121(14)**: 2341-2349.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 01.07.2020

Przyjęto: 22.07.2020

Paula Kamińska

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Świecickiego 6, 60-781 Poznań

tel.: 61 854 64 55

e-mail: kaminska.p19@gmail.com

