



Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Rozprawa doktorska

Identyfikacja i znaczenie kliniczne komórek nowotworowych krążących we krwi analizowanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej z funkcją obrazowania u chorych na raka gruczołu krokowego

mgr Julia Richert

Praca przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
celem uzyskania stopnia doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. Anna Żaczek

Promotor pomocniczy: dr Natalia Bednarz-Knoll

Zakład Onkologii Translacyjnej
Instytut Biotechnologii Medycznej i Onkologii Doświadczalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2025

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować

*prof. dr hab. Annie Żaczek
za wsparcie i pomoc merytoryczną,
wrozumiałość, poświęcony czas
i zawsze cenne uwagi.*

*dr Natalii Bednarz-Knoll za bycie
niesamowitą naukową inspiracją,
za wiarę we mnie, wsparcie w każdej
sytuacji i motywację do robienia
rzeczy prawie niemożliwych.*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu
za tworzenie wspaniałej atmosfery,
wiele cennych rozmów, podnoszenie
na duchu i pokazanie, że każdy może
kroczyć tą ścieżką na swój sposób.*

*Z całego serca dziękuje moim
Rodzicom i Mężowi, którzy nigdy
we mnie nie zawątpili ♥*

Wyniki przedstawione i dotyczące niniejszej pracy zostały użyte i opisane w następujących artykułach naukowych:

- Muchlińska A#, **Smentoch J#***, Żaczek AJ, Bednarz-Knoll N. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells Using Imaging Flow Cytometry-A Perspective Study. *Cancers (Basel)*. 2022 Aug 29;14(17):4178.
- Nastaly P, Stoupiec S, Popęda M, **Smentoch J***, Schlomm T, Morrissey C, Żaczek AJ, Beyer B, Tennstedt P, Graefen M, Eltze E, Maiuri P, Semjonow A, Pantel K, Brandt B, Bednarz-Knoll N. EGFR as a stable marker of prostate cancer dissemination to bones. *Br J Cancer*. 2020 Dec;123(12):1767-1774.
- Wenta R, **Richert J**, Muchlińska A, Senkus E, Suchodolska G, Łapińska-Szumczyk S, Domżański P, Miszewski K, Matuszewski M, Dziadziuszko R, Supernat A, Żaczek A, Bednarz-Knoll N. Measurable morphological features of single circulating tumor cells in selected solid tumors-A pilot study. *Cytometry A*. 2024 Dec;105(12):883-892.
- **Smentoch J***, Szade J, Żaczek AJ, Eltze E, Semjonow A, Brandt B, Bednarz-Knoll N. Low Numbers of Vascular Vessels Correlate to Progression in Hormone-Naïve Prostate Carcinomas Undergoing Radical Prostatectomy. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 12;11(9):1356.
- Popęda M, Kowalski K, Wenta T, Bezoussenko GV, Rychłowski M, Mironov A, Lavagnino Z, Barozzi S, **Richert J**, Bertolio R, Myszczyński K, Szade J, Bieńkowski M, Miszewski K, Matuszewski M, Żaczek AJ, Braga L, Del Sal G, Bednarz-Knoll N, Maiuri P, Nastaly P. Emerin mislocalization during chromatin bridge resolution can drive prostate cancer cell invasiveness in a collagen-rich microenvironment. *Exp Mol Med*. 2024 Sep;56(9):2016-2032.

*Manuskrypty opublikowane do 2022 roku zostały wydane pod nazwiskiem panińskim (Smentoch) autorki niniejszej pracy doktorskiej.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy złożone są do submisji w postaci manuskryptu:

- **Richert J#**, Wenta R, Popęda M, Pastuszak K, Bieńkowski M, Szade J, Morrissey C, Żaczek A, Sowa M, Miszewski K, Matuszewski M, Bednarz-Knoll N. Heterogenous prostate cancer dissemination might be guided by platelets to reach metastatic efficiency - w (re)submisji – J Exp Clin Caner Res

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są także podstawą tworzonego CTC Atlas:

www.CTCatlas.org

Badania przedstawione w niniejszej pracy były częścią projektów:

- SONATA 13 „Molekularna i kliniczna charakterystyka fenotypów keratynowych w raku gruczołu krokowego” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2017/26/D/NZ5/01088, kierownik projektu: dr Natalia Bednarz-Knoll).
- OPUS 20 „Identyfikacja potencjalnych markerów wczesnego wykrywania progresji i umożliwiających wybór terapii celowanej w przerzuty w raku gruczołu krokowego” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2020/39/B/NZ5/01258, kierownik projektu: dr Natalia Bednarz-Knoll).
- Nauka dla Społeczeństwa II „Płynne biopsje w służbie chorym, lekarzom i nauce” finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (NdS-II/SP/0398/2023/01, kierownik projektu: dr Natalia Bednarz-Knoll).

Współprace dotyczące wybranych aspektów niniejszej pracy:

- mikromacierze tkankowe zostały przygotowane przy pomocy patomorfologa z Zakładu Patomorfologii Klinicznej GUMed dr Jolanty Szade (Metody 7.3),
- rutynowe barwienia immunohistochemiczne (Ki-67, CD34) zostały wykonane w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej GUMed (Metody 7.9),
- barwienie immunohistochemiczne guzów pierwotnych na obecność keratyny i wimentyny wykonano we współpracy z mgr Robertem Wentą (Metody 7.10).

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	1
2. ABSTRACT	3
3. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
4. WSTĘP	8
4.1 Epidemiologia i etiologia raka gruczołu krokowego	8
4.2 Znaczenie krążących komórek nowotworowych w raku gruczołu krokowego	10
4.3 Zastosowanie cytometrii przepływowej w identyfikacji CTCs	15
5. CEL PRACY	18
6. MATERIAŁY	19
6.1 Grupa badana	19
6.2 Hodowla komórkowa	23
6.3 Przeciwciała	24
6.4 Bufory i roztwory	26
6.5 Inne odczynniki	27
6.6 Sprzęt laboratoryjny	28
6.7 Oprogramowanie	29
7. METODY	30
7.1 Pobieranie, procesowanie i bankowanie próbek klinicznych	30
7.2 Konstrukcja mikromacierzy tkankowych	31
7.3 Hodowle komórkowe	32
7.4 Optymalizacja protokołu barwienia na obecność K/V i AR/EGFR	33
7.5 Barwienie immunofluorescencyjne w celu wykrycia CTCs przy imFC – protokół K/V	35
7.6 Barwienie immunofluorescencyjne w celu wykrycia CTCs przy użyciu imFC – protokół AR/EGFR	36
7.7 Analiza próbek klinicznych przy użyciu imFC – protokół K/V i AR/EGFR	37
7.8 Analiza immunohistochemiczna	43
7.9 Analiza immunofluorescencyjna	44
7.10 Pomiar stężenia cytokin w osoczu	45
7.11 Analiza statystyczna	46
8. WYNIKI	47
8.1 Zbieranie i analiza próbek klinicznych	47
8.2 CTCs, ich klastry i cCAFs wykrywane w TDVB i/lub PB u chorych na RGK	48
8.2.1 Pojedyncze CTCs w TDVB od chorych mZRGK	49
8.2.2 Pojedyncze CTCs w PB od chorych mZRGK	50
8.2.3 Porównanie TDVB i PB u chorych z mZRGK	51
8.2.4 Klastry CTCs w TDVB i PB u chorych mZRGK	55
8.2.5 Pojedyncze CTCs w PB od chorych z pRGK	57
8.2.6 Klastry CTCs w PB u chorych z pRGK	59
8.2.7 Pojedyncze i klastry cCAFs	60
8.3 Potencjalne interakcje CTCs z komórkami krwi w PB i TDVB	62

8.4 Znaczenie kliniczne CTCs w PB i TDVB	69
8.5 Korelacje fenotypów CTCs z białkami obecnymi w guzach pierwotnych	82
8.6 Korelacje poziomów cytokin TGF- β i PDGF-BB z fenotypami CTCs w TDVB i PB	86
8.7 Protokół AR/EGFR - charakterystyka grupy chorych	89
8.8 Wykrywanie komórek CTCs na podstawie barwienia AR/EGFR	90
8.9 Znaczenie kliniczne CTCs w protokole AR/EGFR.....	96
8.10 Porównanie protokołów K/V i AR/EGFR w kontekście detekcji CTCs	106
9. DYSKUSJA.....	112
9.1 Nowatorskie rozwiązania wykorzystane w przeprowadzonych badaniach	112
9.2 Biologiczne i kliniczne znaczenie CTCs uzyskanych protokołem K/V	115
9.2.1 Wykrywalność CTCs w TDVB i PB	116
9.2.2 Fenotypy potencjalnych CTCs w RGK.....	118
9.2.3 Heterogenność RGK na poziomie CTCs	120
9.2.4 Klastry CTCs w mzRGK.....	121
9.2.5 Potencjalne interakcje CTCs z elementami morfotycznymi krwi	122
9.2.6 Fenotyp guzów pierwotnych a CTCs	125
9.2.7 Identyfikacja cCAFs	126
9.3 Biologiczne i kliniczne znaczenie CTCs uzyskanych protokołem AR/EGFR.....	127
9.3.1 Fenotypy pojedynczych CTCs i klastrów	127
9.3.2 Potencjalne interakcje CTCs z elementami morfotycznymi krwi	129
9.3.3 Porównanie identyfikacji CTCs z użyciem protokołu K/V i AR/EGFR.....	130
10. PODSUMOWANIE	132
11. TABELE UZUPEŁNIAJĄCE	135
12. PIŚMIENNICTWO	140

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Rak gruczołu krokowego (RGK) jest drugim najczęściej diagnozowanym nowotworem dotyczącym mężczyzn, stanowiący istotny problem zdrowotny na całym świecie, szczególnie w krajach uprzemysłowionych. Pomimo że RGK diagnozowany na wczesnym etapie (choroba zlokalizowana) wiąże się z dobrym rokowaniem, to przeżywalność chorych drastycznie spada w przypadku choroby przerzutowej.

Za powstanie przerzutów odpowiedzialne są krążące komórki nowotworowe (ang. *circulating tumor cells*, CTCs), które cechuje wysoka plastyczność i różnorodność zarówno geno- jak i fenotypowa. Mogą one także wchodzić w interakcje z elementami morfotycznymi krwi. W niniejszej pracy doktorskiej podjęto się po raz pierwszy przeanalizowania procesu rozsiewu i określenia różnych cech CTCs w krwi drenującej guz pozyskanej śródoperacyjnie przed usunięciem guza (ang. *tumor draining vein blood*, TDVB) i sparowanej przedoperacyjnie pobranej krwi obwodowej (ang. *peripheral blood*, PB) od chorych na RGK ze średnim i wysokim ryzykiem progresji choroby w skali d'Amico. Próbkę kliniczne analizowano z wykorzystaniem nowoczesnej technologii, jaką jest cytometria przepływowa z funkcją obrazowania (ang. *imaging flow cytometry*, imFC), nowozaimplementowana w płynnych biopsjach przez nasz Zespół.

Liczbę, fenotypy i interakcje CTCs, związane z przemianą epitelialno-mezenchymalną (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), oceniano przy użyciu barwienia immunofluorescencyjnego skierowanego przeciwko pan-keratynie i wimentynie (protokół K/V), a następnie pod kątem obecności receptorów AR i EGFR (protokół AR/EGFR) z wykorzystaniem technologii imFC w TDVB i/lub PB od 119 chorych z miejscowo zaawansowanym rakiem gruczołu krokowego (mzRGK) i 16 chorych z rakiem gruczołu krokowego z przerzutami (pRGK), a także 20 zdrowych mężczyzn. Guzy pierwotne pobrane podczas radykalnej prostatektomii, od tych samych chorych, analizowano w formie mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarrays*, TMAs) i fenotypowano w kierunku statusu EMT na podstawie barwienia K/V, a także obecności innych białek (m.in. markera proliferacji i markera naczyń krwionośnych).

CTCs wykryto w 52% TDVB i 19% PB pochodzących od chorych z mzRGK. Dominującym fenotypem w TDVB okazał się być epitelialny (tj. K+V-), natomiast w PB

u chorych z mZRGK i pRGK był to fenotyp związany z EMT (tj. K+V+ i/lub K-V+ i/lub K-V-). Zaobserwowano interakcję CTCs z leukocytami (CTCs^{LEUKO}), erytrocytami (CTCs^{ERYTRO}) i płytkami krwi (CTCs^{PLT}) w części CTCs chorych. Analizy wieloczynnikowe wykazały, że obecność mezenchymalnych CTCs ($p < 0,001$) i pojedynczych CTCs^{PLT} ($p = 0,003$) w TDVB i/lub PB była negatywnym czynnikiem rokowniczym w kontekście wystąpienia wznowy biochemicznej. Analizy z wykorzystaniem TMA wykazały, że CTCs rozsiewały się głównie z guzów pierwotnych, które były epitelialne, dobrze unaczynione i o niskiej aktywności proliferacyjnej.

W protokole AR/EGFR CTCs wykryto w 30% PB. Podobnie jak w protokole K/V CTCs miały różnorodne fenotypy i częściowo wchodziły w potencjalne interakcję z komórkami krwi. Analizy wieloczynnikowe wykazały, że obecność CTCs K-pozytywnych ($p = 0,024$) i CTCs o fenotypie K-/AR+/EGFR- ($p < 0,001$) była negatywnym czynnikiem prognostycznym, natomiast obecność CTCs o fenotypie K-/AR-/EGFR- ($p = 0,040$) była pozytywnym czynnikiem rokowniczym w kontekście wystąpienia wznowy biochemicznej. Dodatkowo porównano wykrywalność CTCs z użyciem dwóch protokołów: K/V i AR/EGFR, a ich zgodność w identyfikowaniu CTCs u tych samych chorych wyniosła 67%.

Uzyskane wyniki wskazują, że TDVB jako krew bezpośrednio pochodząca z guza jest bardziej obfita w CTCs w porównaniu do PB. Wykrywane CTCs charakteryzują się wysokim zróżnicowaniem zarówno fenotypowym, jak i zdolnością wchodzenia w interakcje z normalnymi komórkami krwi. Niemniej obserwuje się przewagę fenotypu epitelialnego w TDVB, a fenotypów w spektrum EMT w PB. Prezentowane wyniki dostarczają nowych informacji na temat złożoności procesu przerzutowania, sugerując, że CTCs^{PLT} oraz CTCs o fenotypie K-/AR+/EGFR- mogą stanowić obiecujące markery prognostyczne, a nawet cele terapeutyczne w kontekście RGK. W niniejszej pracy doktorskiej wprowadzono również dwa udoskonalenia płynnych biopsji: po raz pierwszy wykorzystano TDVB w RGK oraz wdrożono technologię imFC do detekcji CTCs.

2. ABSTRACT

Prostate cancer (PCA) is the second most commonly diagnosed cancer affecting men, becoming a significant health problem worldwide, especially in industrialized countries. Although PCA diagnosed at an early stage (localized disease) is associated with a good prognosis, survival rates for patients drastically decrease in the case of metastatic disease.

Circulating tumor cells (CTCs) are responsible for developing metastases, characterized by high plasticity and both genotypic and phenotypic diversity. They can also interact with morphological elements of the blood. In this doctoral thesis, we attempted for the first time to analyze the dissemination process and determine different features of CTCs in tumor-draining vein blood (TDVB) obtained intraoperatively before tumor removal and paired with preoperatively collected peripheral blood (PB) from d'Amico intermediate-to-high risk PCA patients. Clinical samples were analyzed using novel technology, imaging flow cytometry (imFC), which our Team had newly implemented in liquid biopsies.

The numbers, phenotypes, and interactions of CTCs of different epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related phenotypes were assessed using immunofluorescence staining against pan-keratin and vimentin (K/V protocol) and also for AR and EGFR (AR/EGFR protocol), and imFC technology in TDVB and/or PB from 119 patients with locally advanced prostate cancer (locPCA) and 16 patients with metastatic prostate cancer (mPCA), as well as 20 healthy men. Primary tumors collected during radical prostatectomy from the same patients were analyzed in tissue microarrays (TMAs) and phenotyped for EMT status based on K/V staining and the presence of other proteins (including proliferation marker, Ki-67 and blood vessel marker, CD34).

CTCs were detected in 52% of TDVB and 19% of PB from patients with locPCA. The dominant detected phenotype was epithelial (i.e. K+V-) in TDVB, whereas EMT-related (i.e. K+V+ and/or K-V+ and/or K-V-) in PB from patients with locPCA and mPCA. Interactions of CTCs with leukocytes (CTCs^{LEUKO}) were observed in 11% (TDVB) and 5% (PB), erythrocytes (CTCs^{ERYTRO}) in 23% (TDVB) and 15% (PB), and platelets (CTCs^{PLT}) in 79% (TDVB) and 45% in (PB) of locPCA cases, respectively. Multivariate analyses showed that the presence of mesenchymal CTCs ($p<0.001$) and single CTCs interacting with platelets detected in TDVB and/or PB was associated with shorter time to biochemical relapse ($p=0.003$). Analyses using TMAs showed that CTCs disseminated mainly from primary tumors, which were

epithelial, well vascularized, and characterized by low proliferative activity of tumor cells.

In the AR/EGFR protocol, CTCs were detected in 30% of PB of locPCA. Analogous to the K/V protocol, CTCs exhibited diverse phenotypes and partially interacted with blood cells. Multivariate analyses showed that the presence of K-positive CTCs ($p=0.024$) and CTCs with the K-/AR+/EGFR- phenotype ($p<0.001$) was a negative prognostic factor, while the presence of CTCs with the K-/AR-/EGFR- phenotype ($p=0.040$) was a positive prognostic factor in the context of biochemical relapse. Additionally, the detection of CTCs using both protocols: K/V and AR/EGFR was compared, and their consistency in identifying CTCs in the same patients reached 67%.

The presented outcomes indicate that TDVB, as blood directly derived from the tumor is more abundant in CTCs than PB. The detected CTCs are characterized by high phenotypic diversity and the ability to interact with normal blood cells. Nevertheless, the numerical predominance of the epithelial phenotype is observed in TDVB, and phenotypes in the EMT spectrum in PB. The presented results provide new information on the complexity of the metastasis process, suggesting that CTCs interacting with platelets and CTCs with the K-/AR+/EGFR- phenotype may be considered as promising prognostic markers or even therapeutic targets in the context of PCA. Two improvements of liquid biopsies are suggested based on our results: the usage of TDVB and the implementation of the imFC technology for CTCs detection.

3. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADT	terapia deprivacji androgenów (ang. <i>androgen deprivation therapy</i>)
AMACR	racemaza alfa-metyloacylo-koenzymu A (ang. <i>alpha methylacyl coenzyme A racemase</i>)
AR	receptor androgenowy (ang. <i>androgen receptor</i>)
Alfa-SMA/αSMA	alfa aktyna mięśni gładkich (ang. <i>alpha-smooth muscle actin</i>)
BF	jasne pole (ang. <i>brightfield</i>)
BMCs	jednojądrzaste komórki krwi (ang. <i>blood mononuclear cells</i>)
CAFs	fibroblasty związane z nowotworem (ang. <i>cancer-associated fibroblasts</i>)
cCAFs	krążące fibroblasty związane z nowotworem (ang. <i>circulating cancer-associated fibroblasts</i>)
CTCs	krążące komórki nowotworowe (ang. <i>circulating tumor cells</i>)
CRPC	rak gruczołu krokowego oporny na kastrację (ang. <i>castration-resistant prostate cancer</i>)
DAPI	barwnik fluorescencyjny 4',6-diamidyno-2-fenylindol (ang. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
EGFR	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	przemiana epithelialno-mezenchymalna (ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
EpCAM	cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych (ang. <i>epithelial cell adhesion molecule</i>)

FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FFPE	materiał utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie (ang. <i>Formalin-Fixed Paraffin Embedded</i>)
FSC	rozproszenie czotowe (ang. <i>forward scatter</i>)
imFC	cytometria przepływowa z funkcją obrazowania (ang. <i>imaging flow cytometry</i>)
OS	przeżycie całkowite (ang. <i>overall survival</i>)
MET	przemiana mezenchymalno-epitelialna (ang. <i>mesenchymal-epithelial transition</i>)
NETs	zewnętrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (ang. <i>neutrophil extracellular traps</i>)
Pan-K/K	białko cytoszkieletu komórki, pan-keratyna (ang. <i>pan-keratin/keratin</i>)
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDGF-BB	płytkopochodny czynnik wzrostu, izoforma BB (ang. <i>platelet-derived growth factor – BB isoform</i>)
PFS	przeżycie wolne od progresji (ang. <i>progression-free survival</i>)
PSA	swoisty antygen sterczowy (ang. <i>prostate-specific antigen</i>)
RGK	rak gruczołu krokowego
mzRGK	miejscowo zaawansowany rak gruczołu krokowego
pRGK	rak gruczołu krokowego z przerzutami
SSC	rozproszenie boczne (ang. <i>side scatter</i>)
TMA	mikromacierze tkankowe (ang. <i>tissue microarrays</i>)
TGF-beta	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor β</i>)

VIM/V	wimentyna (ang. <i>vimentin</i>)
VV	naczynia krwionośne (ang. <i>vascular vessels</i>)

4. WSTĘP

4.1 Epidemiologia i etiologia raka gruczołu krokowego

Rak gruczołu krokowego (RGK) plasuje się na drugim miejscu pod względem częstości występowania nowotworów wśród mężczyzn, stanowiąc istotny problem zdrowotny na całym świecie. W 2020 roku liczbę nowych przypadków RGK szacowano na 1,4 miliona, a liczbę zgonów na 375 tysięcy¹. W Polsce RGK jest najczęściej występującym typem nowotworu u mężczyzn, jednocześnie znajdując się na trzecim miejscu pod względem umieralności z powodu nowotworu (tuż za rakiem płuca i jelita grubego)².

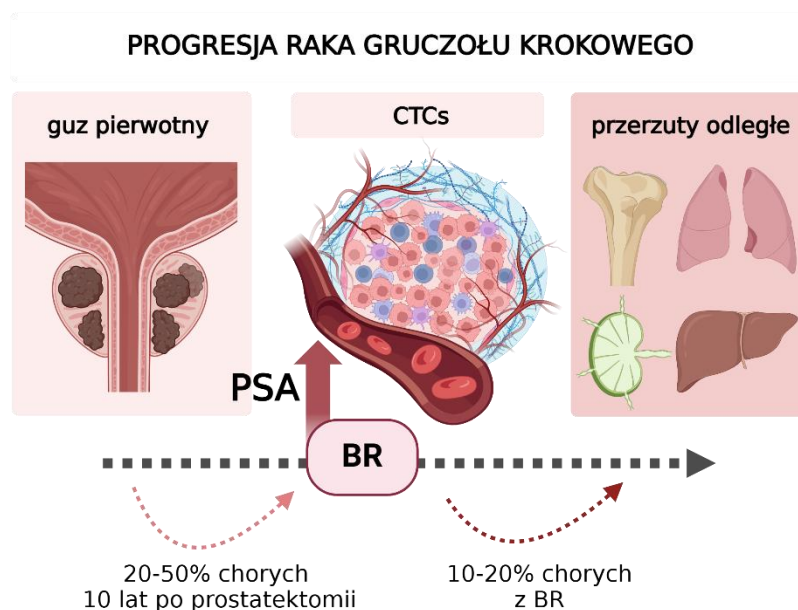
Dzięki programom przesiewowym u większości chorych RGK diagnozuje się na wczesnym etapie choroby (choroba zlokalizowana), co gwarantuje blisko 100% prawdopodobieństwo przeżycia w ciągu 5 lat od diagnozy. W przypadku wystąpienia przerzutów odległych przeżywalność chorych spada drastycznie do 30%³, co podkreśla potrzebę monitorowania przebiegu choroby, a także wczesnej identyfikacji chorych o wyższym ryzyku progresji choroby.

Czynnikami ryzyka zachorowania na RGK są przede wszystkim podeszły wiek, grupa etniczna (choroba częściej występuje i ma bardziej agresywny charakter w grupie Afroamerykańskiej) i mutacje genetyczne, np. receptora androgenowego (ang. *androgen receptor*, AR), genów supresorowych (p53, PTEN, BRCA1, BRCA2), czy genu kodującego kinazę białkową Akt^{1, 4-5}.

Do zwiększenia wykrywalności RGK, a także wykrywania RGK we wcześniejszych stadiach rozwoju choroby przyczyniło się rutynowe testowanie stężenia swoistego antygenu sterczowego (ang. *prostate-specific antigen*, PSA) we krwi⁶, który wraz z palpacyjnym badaniem przezodbytniczym stanowi pierwszy krok w obecnie stosowanej diagnostyce klinicznej RGK. W przypadku nieprawidłowych wyników wyżej wymienionych badań, rutynowo wykonuje się biopsję pod kontrolą USG, pozwalającą na wstępną diagnostykę histologiczną i ocenę zaawansowania nowotworu w skali Gleasona. Mimo wielu zalet, biopsja wiąże się z dyskomfortem chorego; jest bolesna i może prowadzić do krwawienia i powikłań⁷.

Na uwagę zasługuje także zmniejszona miarodajność tej strategii diagnozy, spowodowana między innymi dokładnością samych nakłuć, ograniczoną ilością materiału pobranego do badań histologicznych, a jednocześnie dużą heterogennością histologiczną i/lub molekularną guza pierwotnego⁸. W kontekście RGK, który często ma charakter wieloogniskowy, niemiernie pobranie materiału może nie wychwycić ognisk nowotworowych o najwyższym stopniu zaawansowania, a co za tym idzie prowadzić do błędnych decyzji terapeutycznych, dając wynik nawet fałszywie negatywny⁹.

U części chorych na RGK po przeprowadzonym zabiegu radykalnej prostatektomii obserwuje się wznowę biochemiczną (ang. *biochemical recurrence*, BR), tj. ponowny wzrost stężenia PSA we krwi. Według danych literaturowych, 20-50% chorych doświadczy BR w ciągu 10 lat od chirurgicznego usunięcia gruczołu krokowego¹⁰⁻¹¹. BR może zwiastować jedynie wznowę miejscową (w obrębie tzw. łoża chirurgicznej). Jednak około 10% chorych po wystąpieniu BR rozwija przerzuty¹² do węzłów chłonnych⁶, narządów odległych (kości, wątroba, płuca)¹³⁻¹⁴, co komplikuje proces leczenia i podwyższa ryzyko zgonu z powodu choroby (**Ryc. 1**). RGK wciąż pozostaje wyzwaniem dla lekarzy i chorych z powodu złożonej etiologii, zróżnicowanego przebiegu choroby wynikającego z heterogennością tego nowotworu zarówno na poziomie histologicznym, jak i molekularnym. Pomimo postępów w rozumieniu mechanizmów przerzutowania nowotworów, w tym RGK, wciąż istnieją niedostatecznie zbadane aspekty tego procesu, szczególnie w odniesieniu do jego początkowego etapu¹⁵, a choroba nowotworowa na tym poziomie pozostaje w większości przypadków niewyleczalna.



Rycina 1. Schemat przedstawiający proces progresji RGK. W uproszczeniu, po zabiegu radykalnej prostatektomii, u wielu chorych po pewnym czasie dochodzi do ponownego wzrostu PSA. To zjawisko określane jest jako wznowa biochemiczna (BR), która u części chorych zwiastuje wystąpienie przerzutów do organów odległych. PSA (ang. *prostate specific antigen*) - swoisty antygen sterczowy, BR (ang. *biochemical recurrence*) – wznowa biochemiczna. Schemat wykonano w aplikacji BioRender.

4.2 Znaczenie krążących komórek nowotworowych w raku gruczołu krokowego

Małoinwazyjną alternatywę oraz uzupełnienie diagnostyki i monitorowania RGK w czasie rzeczywistym może stanowić tzw. płynna biopsja. Ta strategia polega na izolacji i analizie komórek i cząsteczek wywodzących się z nowotworu, m.in. krążących komórek nowotworowych (ang. *circulating tumor cells*, CTCs), krążącego DNA i RNA, pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obecnych w płynach ustrojowych, takich jak krew, mocz czy płyn mózgowo-rdzeniowy⁸. W szczególności analiza rozsiewających się komórek pozwala na analizę CTCs, w tym tych o podwyższonym potencjale utworzenia aktywnych przerzutów, ich potencjalnych interakcji z komórkami krwi czy identyfikację komórek pochodzących z mikrośrodowiska guza, związanych z procesem progresji choroby, np. fibroblastów związanych z nowotworem (ang. *cancer-*

associated fibroblasts, CAFs). Komórki nowotworowe nie występują w guzie samodzielnie; towarzyszą im komórki endotelialne, komórki układu immunologicznego, fibroblasty, makrofagi oraz komórki macierzy zewnątrzkomórkowej, a także rozpuszczalne mediatory (cytokiny, czynniki wzrostu) wydzielane przez wspomniane komórki, stanowiąc mikrośrodowisko nowotworu, aktywnie modulujące jego rozwój¹⁶ i częściowo uwalniane do krwi, podobnie do komórek nowotworowych.

CTCs to komórki nowotworowe uwalniane z guza pierwotnego i/lub już wtórnego, nawet na wczesnym etapie rozwoju nowotworu, których obecność może służyć do oceny ryzyka progresji, a nawet monitorowania tzw. choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease*), progresji choroby czy odpowiedzi chorego na leczenie podczas stosowanej terapii systemowej. Ich prognostyczne znaczenie zostało potwierdzone w wielu badaniach¹⁷⁻¹⁹. Dowiedziono, że wykrycie liczby CTCs ≥ 5 w 7,5 ml krwi chorych na RGK było związane z obecnością guza o znacznych rozmiarach i gorszym przebiegiem choroby¹⁷⁻¹⁹. Choć w przypadku chorych we wczesnym stadium, CTCs występują rzadko (8-33% chorych)²⁰, ich obecność może potencjalnie pełnić rolę w identyfikowaniu chorych z gorszym rokowaniem. Natomiast sama liczba CTCs we krwi chorych wciąż nie jest uwzględniana w rutynowej praktyce klinicznej¹⁷. Niemniej w przypadku RGK wyższa liczba CTCs korelowała z wyższym poziomem PSA¹⁷. Z biologicznego punktu widzenia, dogłębna analiza CTCs mogłaby wskazać, które z nich są odpowiedzialne za skuteczny rozsiew i tworzenie przerzutów, a zatem które powinny być celem spersonalizowanego leczenia²¹. Obecnie badania skupiają się na identyfikowaniu kluczowych cząsteczek na/w CTCs, które mogłyby powiązać daną frakcję CTCs z przerzutami do konkretnego organu (np. CD133, CD44)²², a także pomagać w wyborze terapii kierując się liczbą CTCs (np. terapia hormonalna czy chemioterapia u pacjentek z HR+/HER2-rakiem piersi)²³⁻²⁴.

Obecność CTCs pochodzących z guza pierwotnego lub z przerzutów w krwi obwodowej (ang. *peripheral blood*, PB) opisano po raz pierwszy w 1869 roku²⁵. Rozkwit badań nad CTC przypada jednak dopiero na początek XXI w. Pomimo, że PB nadal pozostaje podstawowym materiałem do badań nad CTCs, sporadycznie analizuje się również krew z żyły drenującej guz (ang.

tumor draining vein blood, TDVB), która z założenia powinna obfitować w CTCs²⁶⁻²⁹ czy inne komórki i cząsteczki uwalnianie z guza pierwotnego. Choć TDVB jest zazwyczaj technicznie trudna do pozyskania, to może stanowić cenne źródło CTCs do badania biologii tych komórek w pierwszych sekundach rozsiewu do naczyń krwionośnych, gdy jeszcze nie zostały poddane stresowi wynikającym z siły przepływu krwi czy interakcji z komórkami układu odpornościowego. Dotychczas nie opublikowano danych opisujących CTCs pozyskanych z TDVB w przypadku RGK, natomiast w innych typach nowotworów opublikowano pojedyncze doniesienia²⁶⁻²⁹.

Wraz z zainteresowaniem CTCs w badaniach podstawowych i translacyjnych, obserwuje się ogromny rozkwit metod izolacji tych komórek i ich wykrywania. Niemniej niezmiennie jedyną certyfikowaną przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) metodą pozwalającą na jednoczesną izolację i detekcję CTCs pozostaje CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Włochy)³⁰. Platforma ta została zatwierdzona jako narzędzie wspomagające decyzje kliniczne w przerzutowym raku piersi, jelita grubego i gruczołu krokowego³¹. Wykrywanie i analiza liczby CTCs metodą CellSearch® pozwala na ocenę wskaźników przeżycia, m.in. przeżycia całkowitego (ang. *overall survival*, OS) i przeżycia wolnego od progresji (ang. *progression-free survival*, PFS) u chorych na wyżej wymienione nowotwory w zaawansowanym stadium³². Niestety, CellSearch® bazuje na detekcji CTCs w oparciu o białka charakterystyczne dla komórek epitelialnych (tj. EpCAM, keratyny), co znacznie ogranicza możliwości detekcji CTCs, w których markery te nie są wysoko ekspresjonowane, np. CTCs o fenotypie mezenchymalnym³³. Z tego względu istnieje potrzeba opracowania nowych metod, testów oraz schematów diagnostycznych, które umożliwiają identyfikację heterogennych populacji CTCs. Kluczowym atutem takich analiz byłaby wysokorozdzielcza wizualizacja szczegółowej morfologii CTCs oraz interakcji z innymi elementami morfotycznymi krwi, które potencjalnie mogą m.in. ułatwiać CTCs przetrwanie w krwioobiegu³⁴. Przyczyniłoby się to nie tylko do możliwości stratyfikacji chorych ze względu na ryzyko progresji, ale także do identyfikacji procesów biologicznych zaangażowanych w kaskadę metastatyczną.

Rzeczywiście jednym z procesów, który odpowiada za nabycie przez komórki nowotworowe cech umożliwiających im przedostanie się do krwiobiegu jest przemiana epitelialno-mezenchymalna (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT). Podczas EMT zmienia się morfologia komórki, co spowodowane jest zaburzeniami ekspresji białek adhezyjnych oraz przebudową cytoszkieletu. Komórki tracą polarność, zdolność przylegania do podłoża i innych komórek, nabywając jednocześnie zdolność do migracji i inwazji, które są charakterystyczne dla komórek o cechach mezenchymalnych, a jednocześnie mogą usprawniać proces przerzutowania. Proces EMT może generować również powstawanie komórek nowotworowych o przejściowym (hybrydowym) fenotypie, które posiadają cechy zarówno komórek epitelialnych, jak i mezenchymalnych³⁵. CTCs o fenotypie EMT (epitelialno-mezenchymalnym i mezenchymalnym) są uważane za bardziej agresywne niż CTCs o epitelialnym fenotypie, co może być spowodowane między innymi przez nabycie cech indukowanych lub współwystępujących z EMT, a mianowicie migracji, inwazyjności, macierzystości i zdolności do ucieczki spod kontroli układu immunologicznego³⁶⁻³⁷.

CTCs mogą pokonywać znaczne odległości w krwiobiegu, a przy sprzyjających warunkach mogą opuszczać naczynia krwionośne i tworzyć (mikro)przerzuty w odległych narządach. Mimo, że liczba komórek uwalnianych z guza do krwiobiegu może być znaczna, to ciągle proces ten wydaje się być bardzo niewydajny, szczególnie w przypadku RGK³⁸. Tworzenie przerzutów wymaga zajścia serii zdarzeń na poziomie molekularnym, których zrozumienie pozwoliłoby lepiej przeciwdziałać lub blokować ten proces. Kluczowe jest jednak uzupełnienie wiedzy w tym aspekcie i dogłębne zrozumienie oddziaływań na CTCs w krwiobiegu.

CTCs charakteryzują się znaczną heterogennością geno- i fenotypową, czego powodem jest między innymi heterogenność komórek nowotworowych w guzie pierwotnym, modulujący wpływ mikrośrodowiska guza, a także czynniki fizyczne i biologiczne oddziałujące na CTCs w krwiobiegu³⁹. Jednocześnie, analiza CTCs umożliwia wgląd w molekularną charakterystykę komórek guza pierwotnego specyficznie odpowiedzialnych za proces progresji choroby nowotworowej. W przyszłości

dane te mogłyby być użyteczne w doborze leczenia, monitorowania, czy projektowania spersonalizowanych terapii. Z tego względu, CTCs są doskonałym celem badań rozwijających naszą wiedzę na temat procesu rozsiewu nowotworów, ale mają też potencjał stać się istotnym narzędziem prognostycznym, jak i diagnostycznym.

Fenotypy CTCs w RGK, analogicznie jak w innych nowotworach nabłonkowych, mogą obejmować fenotyp epitelialny, mezenchymalny, jak i fenotypy przejściowe³⁶. W CTCs pochodzących z RGK zaobserwowano także mutacje genetyczne typowe dla tego typu nowotworu, m.in. wariant V7 receptora androgenowego (AR-V7), który może być potencjalnym biomarkerem oporności na terapię u chorych z RGK opornym na kastrację (ang. *castration-resistant prostate cancer, CRPC*)⁴⁰⁻⁴¹. Z kolei analizy liczby kopii genów wykazały, że CTCs częściej wykazywały zwiększoną liczbę kopii genu AR, oraz genów związanych z przemianą mezenchymalno-epitelialną (ang. *mesenchymal-epithelial transition, MET*) czy kinazy 12 zależnej od cyklin, traciły natomiast kopie genów kodujących PTEN, RAF1, RB1, TP53, związanych z niestabilnością genomu⁴²⁻⁴³, a charakterystycznych dla RGK. W CTCs wykrytych u chorych z RGK obserwowano także obecność markera macierzystości, CD133, który był obecny w ponad 80% CTCs chorych z przerzutowym CRPC⁴²⁻⁴⁴.

Nieliczne dane literaturowe wskazują na obecność CTCs z ekspresją receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor, EGFR*) u chorych na RGK, raka piersi, jelita grubego i płuc⁴⁵⁻⁴⁶. Dotychczas opublikowane wyniki badań naszego Zespołu z wykorzystaniem guzów pierwotnych (n=1039) wskazują na potencjalny udział wysokiej ekspresji EGFR na progresję RGK, tj. krótszy czas wolny do wystąpienia przerzutów. Jednocześnie zaprezentowano na niewielkiej grupie chorych (n=39), że EGFR może posłużyć jako dodatkowy marker identyfikujący CTCs i być związany z gorszym przeżyciem chorych⁴⁷. Podobnie w niedrobnokomórkowym raku płuca zastosowanie dodatkowych markerów – EGFR i HER3, pozwoliło na bardziej wydajną detekcję CTCs, szczególnie u chorych z przerzutami do mózgu⁴⁸. Stąd można wnioskować, że ocena ekspresji EGFR w CTCs może w przyszłości udoskonalić identyfikację chorych z najwyższym ryzykiem progresji i późniejszych

przerzutów w różnych typach nowotworów, w tym RGK, a także hipotetycznie identyfikować chorych potencjalnie wrażliwych na leczenie inhibitorami EGFR.

Z kolei, AR odgrywa kluczową rolę w fizjologicznym rozwoju gruczołu krokowego. Nieaktywny jest zlokalizowany w cytoplazmie, natomiast po aktywacji przez męskie hormony płciowe, przemieszcza się do jądra i tam aktywuje ekspresję genów odpowiedzialnych za wzrost i różnicowanie komórek tego narządu⁴⁹. Receptor pełni też ważną rolę w rozwoju samego RGK, napędzając wzrost nowotworu przez zmienioną sygnalizację zależną od AR⁵⁰⁻⁵¹. Dlatego ocena obecności AR i jego lokalizacja w CTCs może pomóc oszacować zasadność stosowania terapii deprivacji androgenów (ang. *antiandrogen deprivation therapy*, ADT), która jest najczęściej wykorzystywaną metodą leczenia RGK, w przypadku wystąpienia przerzutów⁵².

4.3 Metody izolacji i identyfikacji CTCs: zastosowanie cytometrii przepływowej w wykrywaniu CTCs

Strategie izolacji CTCs opierają się na właściwościach komórek, uwzględniających ich parametry fizyczne (np. morfologia, rozmiar, gęstość) jak i cechy molekularne poprzez wykrywanie markerów powierzchniowych w ramach pozytywnej lub negatywnej selekcji. Izolacja CTCs wykorzystuje metody filtracyjne, w tym systemy przepływowe lub techniki immunomagnetyczne, pozwalających na ich skuteczny wychwyt. Z kolei, najczęściej stosowane metody identyfikacji CTCs bazują na oznaczaniu białek powierzchniowych lub cytoplazmatycznych (np. pan-keratyn czy EpCAM), przy pomocy barwień immunofluorescencyjnych i mikroskopii fluorescencyjnej, a także na badaniu ekspresji genów zwyczajowo ekspresjonowanych przez komórki nowotworowe, analizowanych z użyciem techniki PCR czy sekwencjonowania nowej generacji. Izolacja CTCs jest obecnie możliwa dzięki zastosowaniu systemu mikropłynowego Parsortix™, który jest zatwierdzany przez FDA do użytku u pacjentek

z przerzutowym rakiem piersi, natomiast technologia CellSearch® stanowi jedyny klinicznie zwalidowany i zatwierdzony przez FDA test do identyfikacji i izolacji CTCs u chorych z przerzutowym rakiem piersi, prostaty i jelita grubego.

Połączeniem dwóch stosowanych metod do identyfikacji CTCs – mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej, jest nowoczesna i opisywana w niniejszej pracy doktorskiej cytometria przepływowa z funkcją obrazowania (ang. *imaging flow cytometry*, imFC), od niedawna implementowana do wykrywania CTCs przez nasz Zespół⁵³. To technika umożliwiająca ilościową i wysoce wystandaryzowaną analizę obecności jednocześnie kilku (do 9) antygenów na powierzchni komórki, a także szczegółową charakterystykę morfologiczną. Pozwala ocenić wielkość komórki, stopień jej okrągłości czy wydłużenia oraz obecność np. wypustek⁵³⁻⁵⁴.

Metoda ta cechuje się wysoką przepustowością i czułością (min. zakres detekcji to obiekty o wielkości 20 nm – 1 µm)⁵⁵⁻⁵⁶, a także możliwością wieloczynnikowej oraz wieloparametrycznej analizy⁵⁷. Czułość i specyficzność detekcji CTCs w nowotworach litych (tj. rak jelita grubego i rak jajnika) za pomocą imFC jest podobna do tej uzyskanej przy pomocy CellSearch®, tj. 51%–90% (czułość) i 77%–97% (specyficzność)⁵⁸⁻⁵⁹. Standardowe cytometry są wyposażone w detektory, które mierzą fluorescencję emitowaną przez wzbudzone fluorochromy, z którymi skoniugowane są stosowane przeciwciała skierowane przeciwko wybranym antygenom. Umożliwiają również pomiar rozproszenia światła czołowego (ang. *forward scatter*, FSC) i bocznego (ang. *side scatter*, SSC), informujących o morfologii komórek. Jednak ich wadą jest brak wizualnej weryfikacji komórek, co jest kluczowe w analizach CTCs. Szczegóły morfologiczne są jednym z najistotniejszych i niezbędnych kryteriów w tym procesie, co podkreśla znaczenie precyzyjnych metod analizy⁵⁴.

imFC jest stosunkowo nową technologią, używaną dużo rzadziej niż standardowa cytometria przepływowa (ang. *flow cytometry*, FC) czy mikroskopia fluorescencyjna. Ze względu na pionierski charakter badań wdrażających to narzędzie do analizy CTCs, dostępność opublikowanych

danych literaturowych jest bardzo ograniczona. imFC została do tej pory zastosowana do detekcji CTCs w niewielkich grupach chorych na raka jajnika (n=6), tarczycy (n=6), przełyku (n=6)⁶⁰, wątroby (n=69)⁶¹ i jelita grubego (n=16)⁶². W dotychczasowych badaniach naszego Zespołu zastosowano tą technologię do analizy najliczniejszej jak dotąd grupy chorych na raka piersi (n=210), płuca (n=29), jajnika (n=24) i RGK (n=33), tworząc podwaliny pod zastosowanie tej metody w płynnych biopsjach^{53,63}.

Największymi atutami imFC jest wizualizacja identyfikowanych komórek, możliwość analizy fluorescencji z zastosowaniem wybranych przeciwciał w kilku kanałach fluorescencyjnych jednocześnie, a także normalizacja, standaryzacja i archiwizacja wszystkich wyników analiz. Większość badań nad CTCs bazuje na protokołach izolacji i detekcji CTCs opartych jedynie o markery komórek epitelialnych, np. antygen adhezyjny komórek nabłonkowych (ang. *epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) i pan-keratynę (ang. *pan-keratins*, K), co dyskwalifikuje możliwość wykrycia CTCs z niską ekspresją lub brakiem ekspresji tych białek^{60,62}. Wykrywanie CTCs o fenotypie mezenchymalnym wiąże się z dużym ryzykiem uzyskania wyników fałszywie pozytywnych, ze względu na ekspresję markerów mezenchymalnych (np. wimentyny) przez niektóre komórki krwi. W związku z tym w analizach CTCs powinno się uwzględniać zastosowanie rozszerzonego panelu markerów wykluczających. Standardowo stosuje się marker CD45, wykluczający leukocyty. Natomiast w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej zdecydowano się na analizę obecności markerów pozwalających na detekcję i analizę CTCs w całym spektrum fenotypów EMT oraz odróżnienie ich od fibroblastów (α SMA), leukocytów (CD45), komórek śródbłonna (CD31). Mimo postępów w dziedzinie płynnych biopsji, biologia i molekularne mechanizmy rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych w początkowych stadiach kaskady metastatycznej, nie są wciąż dostatecznie zbadane.

5. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy doktorskiej była detekcja CTCs o różnych fenotypach z zastosowaniem nowatorskiej metody jaką jest imFC, w kontekście lepszego poznania ich biologii w RGK i oceny znaczenia klinicznego wykrytych populacji komórek pochodzących z krwi drenującej guz i krwi obwodowej.

Cele szczegółowe:

1. Implementowanie cytometrii przepływowej z funkcją obrazowania w płynnych biopsjach.
2. Identyfikacja i oznaczenie klinicznego znaczenia CTCs uzyskanych protokołem K/V, stosowanego do wykrycia CTCs o szerokim spektrum fenotypów związanych z EMT.
3. Porównanie wykrywania i fenotypów CTCs oraz ich interakcji z komórkami krwi między TDVB i PB.
4. Identyfikacja i oznaczenie klinicznego znaczenia CTCs uzyskanych protokołem AR/EGFR, wykrywającego CTCs związane z przerzutowaniem do kości i ewentualną odpowiedzią na terapią antyandrogenową.
5. Porównanie wykrywalności CTCs z zastosowaniem protokołu K/V i AR/EGFR.

Przedstawione cele pozwalają na pogłębienie wiedzy o CTCs u chorych na mRGK i pRGK. Umożliwiają także walidację markerów molekularnych, które w przyszłości mogłyby zostać wykorzystane do stratyfikacji chorych, bądź zaprojektowania terapii.

6. MATERIAŁY

6.1 Grupa badana

Do pracy doktorskiej włączono grupę 119 chorych z miejscowo zaawansowanym rakiem gruczołu krokowego (mzRGK) z podejrzeniem wysokiego stopnia zaawansowania w skali d'Amico (tj. stopień zaawansowania pT $\geq$ 2c i/lub stopień w skali Gleasona $\geq$ 8 i/lub PSA przedoperacyjne $\geq$ 20) w chwili diagnozy, weryfikowanego pooperacyjnie (**Ryc. 2**), leczonych poprzez radykalną prostatektomię oraz 16 chorych z rakiem gruczołu krokowego z przerzutami (pRGK) rekrutowanych przed podjęciem leczenia systemowego, wszystkich leczonych w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku w latach 2018-2024.

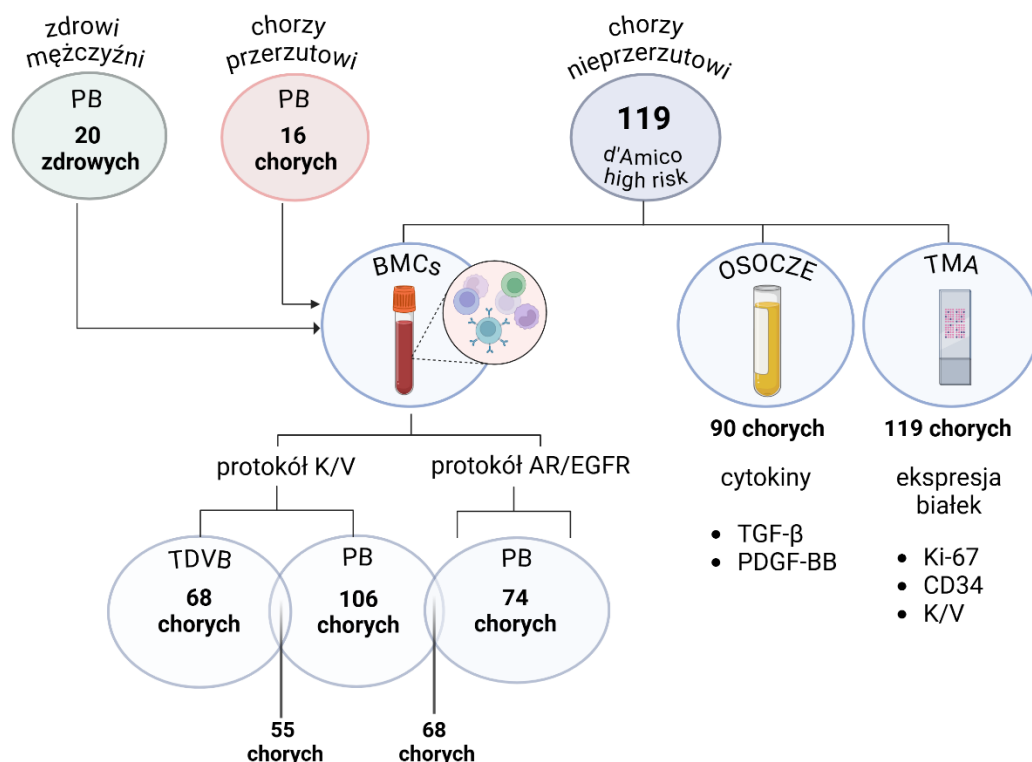
Udokumentowano parametry kliniczno-patologiczne takie jak wiek, stopień zaawansowania nowotworu w skali TNM, skali Gleasona i skali d'Amico (**Tabela 1**), a także wyniki podstawowej morfologii krwi chorych przed operacją oraz poziom przedoperacyjnego stężenia PSA u każdego chorego. Próbkę kliniczną od chorych posłużyły do analizy CTCs z użyciem dwóch protokołów – badającego całkowity rozsiew (protokół K/V) i potencjalnie związanego z przerzutowaniem do kości i ewentualną terapią (protokół AR/EGFR). Chorem z mzRGK pobierano przed operacją PB i/lub w trakcie operacji przed usunięciem guza TDVB, a także selekcjonowano do późniejszego tworzenia macierzy tkankowych fragment materiału histopatologicznego (gruczoł krokowy) pobranego podczas zabiegu prostatektomii, rutynowo utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie (ang. *Formalin-Fixed Paraffin Embedded*, FFPE). Próbkę krwi PB i/lub TDVB wirowano w gradiencie gęstości i frakcję BMC (potencjalnie zawierającą CTCs) utrwalano w formaldehydzie, a osocza zebrane podczas procesowania próbek krwi, zamrożono. Posłużyły one do analizy stężenia cytokin (**Ryc. 2**).

Chorem, w zależności od grupy ryzyka w skali d'Amico badano w różnych odcinkach czasowych stężenie PSA po operacji w celu określenia wystąpienia potencjalnej wznowy biochemicznej (ang. *biochemical recurrence*, BR). Chorem wysokiego ryzyka w skali d'Amico badano stężenie

PSA co 3 miesiące (przez 2 lata, a potem co 6 miesięcy przez 2 lata, a po upływie tego czasu co rok), chorym średniozaawansowanym badano stężenie PSA co 6 miesięcy (przez 2 lata, po upływie tego czasu co rok). Jeśli pooperacyjne stężenie PSA w osoczu krwi przekraczało stężenie 0,2 ng/ml, identyfikowano wznowę biochemiczną i włączano hormono- lub radioterapię. U gorzej rokujących chorych określano, czy wystąpiły przerzuty z wykorzystaniem badania Pozytonowej Emisyjnej Tomografii (PET-PSMA). Ostatnia aktualizacja bazy danych przeżyciowych została wykonana w lipcu 2023.

Tabela 1. Charakterystyka grupy chorych mZRGK analizowanych z użyciem protokołu K/V (n=119) i AR/EGFR (n=74). Różnice w liczbie chorych w poszczególnych kategoriach wynikają z niedostępności niektórych danych klinicznych.

	CHORZY – PROTOKÓŁ K/V	CHORZY - PROTOKÓŁ AR/EGFR
Wiek [lata]		
<65	46 (39,7%)	29 (39,7%)
≥65	70 (60,3%)	44 (60,3%)
Przedoperacyjny poziom PSA [ng/ml]		
<10 ng/ml	74 (63,2%)	51 (69,9%)
≥10 ng/ml	43 (36,8%)	22 (30,1%)
Skala ryzyka d'Amico		
średnie	16 (13,6%)	8 (11,0%)
wysokie	102 (86,4%)	65 (89,0%)
Skala Gleasona		
3+4	34 (28,8%)	20 (28,2%)
4+3	49 (41,5%)	30 (42,3%)
>7	30 (25,3%)	21 (29,5%)
Stopień pT		
pT2	59 (52,2%)	34 (47,9%)
pT3	54 (48,8%)	37 (52,1%)
Stopień N		
N0	105 (92,1%)	64 (88,9%)
N1	9 (7,9%)	8 (11,1%)
Wznowa biochemiczna		
nie	77 (73,3%)	45 (62,5%)
tak	28 (26,7%)	27 (37,5%)
Przerzuty po radykalnej prostatektomii		
nie	106 (94,6%)	66 (90,4%)
tak	6 (5,4%)	7 (9,6%)



Rycina 2. Schemat przedstawiający materiał kliniczny wykorzystany w pracy doktorskiej, tj. komórki BMCs, osocza i TMA, pozyskany od chorych mzRGK i/lub pRGK oraz zdrowych mężczyzn, a przeznaczonych do różnych analiz. Najniższy poziom wykresu wskazuje chorych wspólnych dla obu grup. BMCs – jednojądrzaste komórki krwi, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa, TMA – mikromacieże tkankowe, K- keratyna, V – wimentyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta, PDGF-BB - płytkopochodny czynnik wzrostu, izoforma BB, Ki-67 – marker proliferacji, CD34 – marker naczyń krwionośnych.

Wszyscy chorzy udzielili świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu, które otrzymało zgodę Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/286-421/2018-2022; NKBBN/286-630/2022-2023). Kryteria warunkujące włączenie chorego z mzRGK do badania to wiek (>18), uzyskanie pisemnej zgody, brak innych aktywnych chorób nowotworowych, wysoki stopień ryzyka w skali d'Amico oceniony w trakcie biopsji. Do wykluczenia danej próbki z analiz dochodziło w przypadku zbyt długiego czasu od pobrania do jej procesowania lub nieprawidłowego rozdziału po wirowaniu w gradiencie gęstości (np. spowodowanego obecnością skrzepów). Kontrole negatywne stanowiła PB pochodząca z Regionalnego

Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku pobrana od 20 zdrowych mężczyzn, zaś jako kontrole pozytywne wykorzystano PB pochodzącą od 16 chorych z pRGK z Kliniki Urologii UCK przed podjęciem leczenia systemowego.

6.2 Hodowla komórkowa

Pożywki i dodatki do pożywek:

- RPMI – 1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute*; HyClone, Cytiva, nr kat. HYCLSH30027.FS)
- DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; HyClone, Cytiva, nr kat. SH30022.01)
- Płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*, FBS; HyClone, Cytiva, nr kat. HYCLSV30160.03)
- 100x Penicylina /Streptomycyna (HyClone, VWR, nr kat. SV30010)
- Dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) (Sigma Aldrich, Merck, nr kat. D8418-500ML)
- Trypsyna (Sigma-Aldrich, nr kat. 59418C-100ml)
- Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. *phosphate-buffered saline*, PBS; Sigma-Aldrich, nr kat. P4417-100TAB)
- Insulina, ludzka (Sigma, nr kat. 19278-5ml)

Linie komórkowe:

Tabela 2. Wykaz stosowanych linii komórkowych.

Linia komórkowa	Pochodzenie linii	Nr linii w ATCC	Medium hodowlane
MDA-MB-231	Rak piersi	HTB-26	DMEM (10% FBS, 2mM L- glutamina, 1% penicylina/streptomycyna)
MCF-7	Rak piersi	HTB-22	
A549	Rak płuca	CCL-185	
HCC1806	Rak piersi	CRL-2335	
HMEC-1	Śródbłonek naczyniowy	CRL-3243	
LNCaP	Rak gruczołu krokowego	CRL-1740	RPMI 1640 (10% FBS, 2mM L- glutamina, 1% penicylina/streptomycyna)
Hs 578T	Rak piersi	HTB-126	DMEM (10% FBS, 2mM L- glutamina, 1% penicylina/streptomycyna), z dodatkiem 10 µg/ml insuliny

6.3 Przeciwciała

Przeciwciała pierwszorzędowe do immunohistochemii:

- anty-CD34 (mysie przeciwciało monoklonalne, klon QBEnd10, nr kat. IR632, Dako, Agilent), roztwór gotowy do użycia.
- anty-Ki67 (mysie przeciwciało monoklonalne, klon MIB-1, nr kat. GA626, Dako, Perlan), roztwór gotowy do użycia.

Przeciwciała pierwszorzędowe do immunofluorescencji:

- anty-V (wimentyna, ang. *vimentin*, V); królicze przeciwciało monoklonalne, klon D21H3, nr kat. 46173, Cell Signaling Technology), stosowane rozcieńczenie - 1:100,

- anty-K (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z Alexa Fluor® 488, klon AE1/AE3, nr kat. 53-9003-82, Thermo Scientific), stosowane rozcieńczenie – 1:100,
- anty-K (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z Alexa Fluor® 488 klon C11, nr kat. MA5-18156, Thermo Scientific), stosowane rozcieńczenie – 1:100.

Przeciwciała drugorzędowe do immunofluorescencji:

- anty-królicze kozie przeciwciało poliklonalne skoniugowane z Alexa Fluor® 546, nr kat. A11010, Invitrogen), stosowane rozcieńczenie – 1:200.

Przeciwciała pierwszorzędowe skoniugowane do imFC:

- anty-AR (królicze przeciwciało rekombinowane skoniugowane z Alexa Fluor® 488, klon D6F11, nr kat. 7395, Cell Signaling Technology), stosowane rozcieńczenie – 1:50.
- anty-K (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z PE, klon AE1/AE3, nr kat. NBP2-33200PE, Novus Bio), stosowane rozcieńczenie – 1:250.
- anty-K (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z PE, klon C11, nr kat. MA5-28574, Invitrogen), stosowane rozcieńczenie – 1:1500.
- anty-EGFR (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z Brilliant Violet 605™, klon AY13, nr kat. 352928, BioLegend), stosowane rozcieńczenie – 1:200.
- anty-K (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z Alexa Fluor® 488, klon AE1/AE3, nr kat. 53-9003-82, Thermo Scientific), stosowane rozcieńczenie – 1:2500.
- anty-K (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z Alexa Fluor® 488, klon C11, nr kat. MA5-18156, Thermo Scientific), stosowane rozcieńczenie – 1:2500.

- anty-V (królicze przeciwciało rekombinowane skoniugowane z Alexa Fluor® 647, klon D21H3, nr kat. 9856, Cell Signalling Technology), stosowane rozcieńczenie – 1:100.
- anty-αSMA (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z PE, klon 1A4, nr kat. IC1420P, R&D Systems), stosowane rozcieńczenie – 1:50.
- anty-CD29 (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z SuperBright™600, klon TS2/16, nr kat. 63-0299-42, Thermo Scientific), stosowane rozcieńczenie – 1:1000.
- anty-CD45 (ludzkie przeciwciało rekombinowane skoniugowane z APC-Vio® 770, klon REA747, nr kat. 130-110-635, Miltenyi Biotec), stosowane rozcieńczenie – 1:50.
- anty-CD31 (mysie przeciwciało monoklonalne skoniugowane z APC-Cy7, klon WM59, nr kat. 303120, BioLegend), stosowane rozcieńczenie – 1:10.

6.4 Bufory i roztwory

EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (Dako, nr kat. K8004)

EnVision FLEX, Target Retrieval Solution Low pH (Dako, nr kat. K8005)

PBS, 7,4 pH (tabletki rozpuszczane w wodzie redestylowanej, Sigma Aldrich, nr kat. P4417-100TAB)

TrueBlack® Lipofuscin Autofluorescence Quencher (Biotum, nr kat. 23007),
roztwór roboczy: 50 µl TrueBlack® + 950 µl 70% etanolu

Target Retrieval Solution, pH 6.1, Concentrated x 10 (Dako, nr kat. S169984-2),
roztwór roboczy: 100 ml Target Retrieval Solution + 900 ml wody destylowanej

Bufor Tris-HCl (10x stężony w wodzie destylowanej, 1000 ml): 60,3 g Tris-HCl,
87,6 g NaCl, roztwór roboczy: 100 ml 10x TBS + 900 ml wody destylowanej

TBS-T: TBS + 0.2% Tween20

8% paraformaldehyd w 1x PBS: 19,5 ml 36-38% formaldehydu + 70,5 ml 1x PBS, doprowadzone do pH 7,4 przy użyciu 10M NaOH

6.5 Inne odczynniki

Amnis® SpeedBead® Kit (Cytex, nr kat. 400041)

Perm-Wash Buffer (BD Biosciences, nr kat. 51-2091KZ)

barwnik fluorescencyjny DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol; BD Biosciences, nr kat. 564907)

Ficoll-Paque™ PLUS (Cytiva, nr kat. GE17-1440-02)

99,8% alkohol etylowy bezwodny (POCH, nr kat. 396480111)

96% alkohol etylowy (POCH, nr kat. 396420420)

Izopropanol (VWR, nr kat. 20842.298)

Formaldehyd 36-38% (POCH, nr kat. 432173111)

Zestaw komercyjny do immunodetekcji białek – human PDGF-BB Quantikine ELISA (R&D Systems, nr kat. SBB00)

Zestaw komercyjny do immunodetekcji białek – human TGF-beta Quantikine ELISA (R&D Systems, nr kat. SB100C)

1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich, nr kat. T8787-100ML)

REAL™ Antibody Diluent (Dako, Denmark, nr kat. S202230-2)

EnVision Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Agilent, Dako, nr kat. K500711-2)

EverBrite Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, nr kat. 23002)

6.6 Sprzęt laboratoryjny

cytometr przepływowy z funkcją obrazowania - Amnis® ImageStream®X Mk II (Cytex)

skaner histologiczny (światłny i fluorescencyjny) - Panoramic 250 Flash III (3DHISTECH)

mikroskop fluorescencyjny – Olympus IX83 (Olympus)

mikroskop światłny – PrimoVert 200 (ZEISS)

mikroskop światłny – Olympus BX 43 (Olympus)

urządzenie do tworzenia macierzy tkankowych - Manual Tissue Arrayer MTA-1 (AlphaMetrix Biotech)

czytnik płytek - Synergy H1 (BioTek)

wirówka – Eppendorf Centrifuge 5410 (Eppendorf)

mikser do próbek - HulaMixer (Invitrogen)

komora laminarna – Heraeus HESRAsafe Safety Cabinets HS18 (Thermo Fisher Scientific)

inkubatory – Heraeus HERAcell 150, Jouan IGO150 CELLlife CO2 (Thermo Fisher Scientific)

urządzenie do zautomatyzowanego barwienia preparatów tkankowych - BenchMark ULTRA IHC/ISH System (Roche Diagnostics)

urządzenie do zautomatyzowanego barwienia preparatów tkankowych - Autostainer Link48 (Dako)

moduł do wstępnego przygotowania preparatów tkankowych do barwień
– PT Link (Agilent Dako)

6.7 Oprogramowanie

INSPIRE™ software (wersja 200.1.681.0; Cyttek)

IDEAS (wersja 6.2; Cyttek)

CellSens Imaging software (Olympus Life Science)

GraphPad Prism (wersja 9.5.1; LLC)

SPSS Statistics (wersja 27; IBM), licencja dla Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed

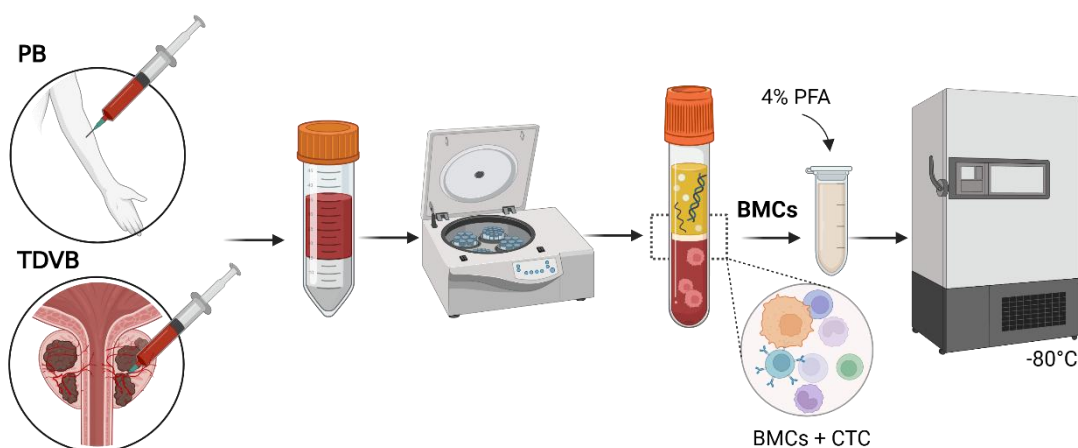
BioRender, licencja dla Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

QuPath (wersja 0.2.3.)

7. METODY

7.1 Pobieranie, procesowanie i bankowanie próbek klinicznych

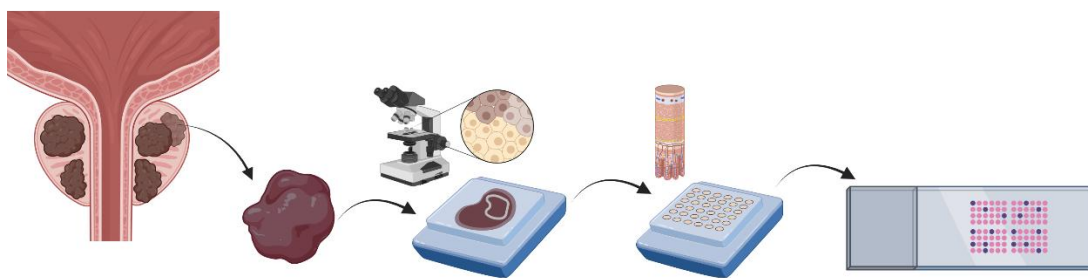
Próbki krwi od chorych mżRGK były pobierane z żyły łokciowej lub udowej (PB: optymalnie 7,5 ml, mediana 6,75 ml) oraz żyły drenującej guz (TDVB: maksymalnie 7 ml, mediana 2,1 ml) pobieranej podczas zabiegu radykalnej prostatektomii przed usunięciem guza (**Materiały 6.1**). Krew była pobierana do jałowych probówek opłaszczonych EDTA. W przypadku PB pierwsza probówka była odrzucana ze względu na potencjalną kontaminację keratynocytami i fibroblastami uwolnionymi w wyniku przerywania ciągłości naskórka podczas wkłucia. Krew rozcieńczoną 1x PBS do objętości 6 lub 12 ml wirowano w gradiencie gęstości (Ficoll® Paque Plus, Cytiva, **Materiały 6.5**) przy 400×g przez 30 minut, w celu izolacji frakcji jednojądrzastych komórek krwi (ang. *blood mononuclear cells*, BMCs), potencjalnie zawierającej CTCs. Osocze przechowywano na lodzie, a następnie mrożono w temp. -80 °C, zaś frakcję BMCs utrwalało w 4% paraformaldehydzie (ang. *paraformaldehyde*, PFA, **Materiały 6.4**) i przechowywano w temp. -80 °C do dalszych analiz (**Ryc. 3**).



Rycina 3. Schemat pobierania, procesowania i bankowania próbek klinicznych. Od chorych mżRGK pobierano PB i/lub TDVB, od chorych z pRGK pobierano jedynie PB. Rycina wykonana w aplikacji Biorender. PB – krew obwodowa, TDVB – krew drenująca guz, BMCs – frakcja jednojądrzastych komórek krwi, PFA – paraformaldehyd, CTC – krążąca komórka nowotworowa.

7.2 Konstrukcja mikromacierzy tkankowych

Mikromacierze tkankowe (ang. *tissue microarrays*, TMA) były przygotowane w latach 2020-2023 w Zakładzie Patomorfologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Materiał histopatologiczny wyselekcjonowano i pobrano od chorych badanych w niniejszej pracy doktorskiej pod kątem obecności CTCs (**Materiały 6.1**). Tzw. makrobloki zawierające całe usunięte gruczoły krokowe pozyskane w latach 2018-2023 podczas zabiegów radykalnej prostatektomii przeprowadzonych w Klinice Urologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, zostały przygotowane w Zakładzie Patomorfologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Obszary nowotworu o najwyższym i dominującym stopniu w skali Gleasona oraz peryferyjny fragment nowotworu zostały wyselekcjonowane i zaznaczone przez patomorfologa na wybarwionych hematoksyliną i eozyną preparatach z fragmentów guzów każdego chorego na mżRGK. Następnie, z odpowiadających im bloków parafinowych, za pomocą igły o średnicy 1,5 mm pobrano odpowiednie fragmenty tkanek i przeniesiono je do nowego bloku parafinowego przy użyciu urządzenia Manual Tissue Arrayer MTA-1 (AlphaMetrix Biotech) (**Ryc. 4**). Jako znaczniki TMA, pozwalające zidentyfikować kierunek oglądania macierzy, zastosowano tkanki pochodzące ze zdrowej nerki (2 fragmenty) i migdałków (3 fragmenty) w każdej konstruowanej macierzy. Gotowe macierze zostały zgrzane w cieplarni w temp. 64 °C przez 10 min, pokrojone na mikrotomie na skrawki o grubości 4 µm i umieszczone na silanowych szkiełkach mikroskopowych (Superfrost™Plus) przez pracownika Zakładu Patomorfologii. Sporządzono mapy wszystkich przygotowanych TMA, w których zawarto numer patologiczny chorego oraz informacje o obszarze reprezentującym dany fragment guza (tj. najwyższy stopień w skali Gleasona w mżRGK, dominujący stopień w skali Gleasona w mżRGK, peryferyjny obszar mżRGK).



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie konstrukcji mikromacierzy tkankowych. Rycina wykonana w aplikacji Biorender.

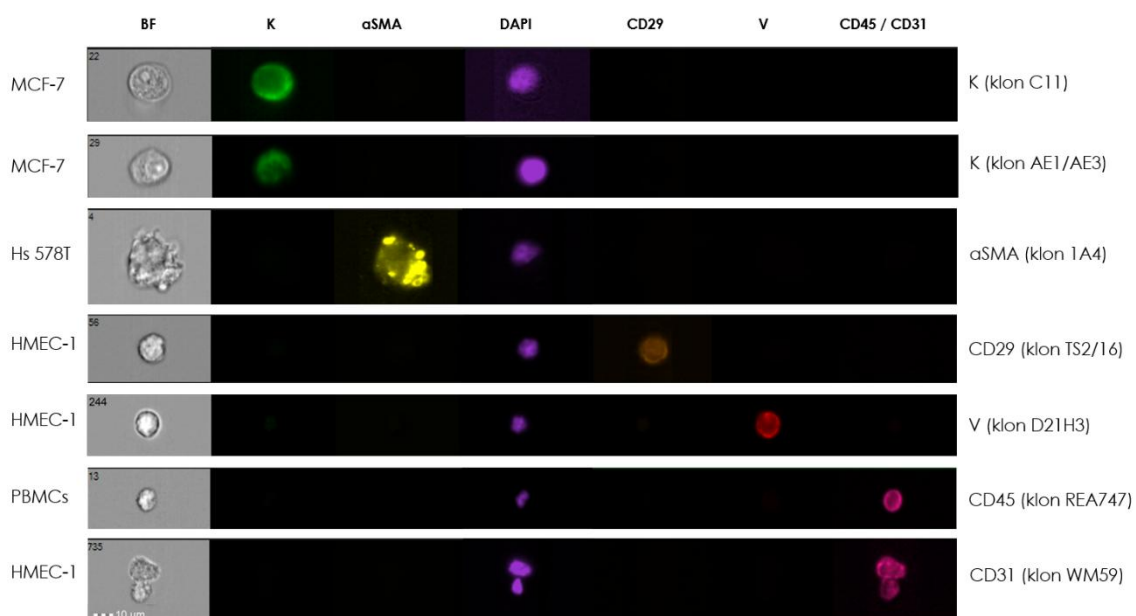
Wszystkie TMA wykorzystano do barwień immunohistochemicznych, m.in. na obecność CD34 (marker komórek endotelialnych), racemazy alfa-metyloacylo-koenzymu A (ang. *alpha methylacyl coenzyme A racemase*, AMACR) i Ki-67 (wskaźnik proliferacji) i immunofluorescencyjnych na obecność K i V.

7.3 Hodowle komórkowe

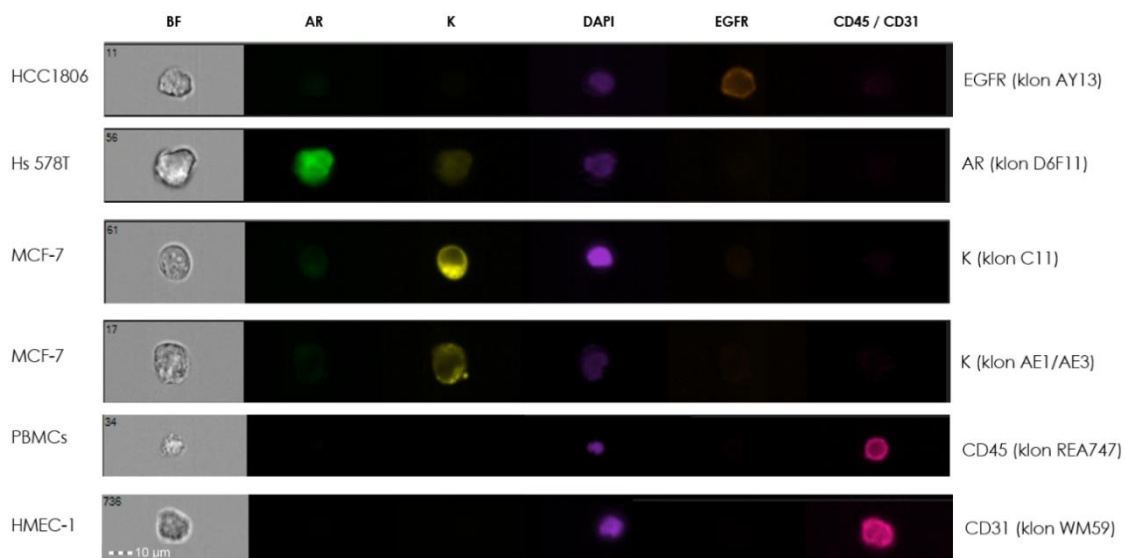
Komórki z wybranych linii komórkowych (**Materiały 6.2**) były hodowane w odpowiednim medium (**Materiały 6.2**) w temp. 37 °C i w atmosferze 5% CO₂. Komórki pasażowano co 2-3 dni przy konfluencji 70-80%. Do mrożenia linii wykorzystywano 10% DMSO w 1xFBS. Komórki w optymalnej konfluencji trypsynizowano, zawieszano w 4% PFA i mrożono w temp. -80 °C. Komórki z linii komórkowych (MDA-MB-231, MCF-7, A549, LNCaP, Hs 578T, HCC1806, HMEC-1) wykorzystano do optymalizacji barwień z użyciem przeciwciał do wykorzystania w imFC.

7.4 Optymalizacja protokołu barwienia na obecność K/V i AR/EGFR

Optymalizacja obu protokołów barwienia immunofluorescencyjnego do cytometrii polegała na testowaniu różnych rozcieńczeń przeciwciał (w tym 1:50; 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2500) pojedynczo, a następnie w kombinacji, stosując różne czasy inkubacji (od 30 min do 16 h) i warunki temperaturowe (temp. pokojowa – ang. *room temperature*, RT lub temp. 4 °C) i różne moce laserów (od 50 do 150 mW). Każde przeciwciało optymalizowano na kilku liniach komórkowych o znanym statusie wybranego białka (tj. przewidywanej obecności lub nieobecności danego białka na podstawie literatury i Human Protein Atlas). W protokole K/V były to: pan-K (linia komórkowa MCF-7), V (linia komórkowa HMEC-1), alfa aktyna mięśni gładkich (ang. *smooth muscle alpha-actin*, αSMA; linia komórkowa Hs 578t), integryna beta-1 (ang. *integrin beta-1*, CD29; linia komórkowa HMEC-1), CD45 (komórki PBMCs) i CD31 (linia komórkowa HMEC-1) (opublikowano⁵³; **Materiały 6.3, Ryc. 5**), a w protokole AR/EGFR optymalizowano przeciwciała skierowane przeciwko AR (linia komórkowa Hs 578t), pan-K (linia komórkowa MCF-7), EGFR (linia komórkowa HCC 1806), CD45 (komórki PBMCs) i CD31 (linia komórkowa HMEC-1) (**Materiały 6.3, Ryc. 6**). W celu wykrycia potencjalnych CTCs i/lub CAFs (protokół K/V) barwiono zawiesinę komórek z linii komórkowych (tzw. kontrola pozytywna) i mieszano ją z BMCs wyizolowanymi od zdrowych ochotników (tzw. kontrola negatywna), tak by imitowały próbki kliniczne pozyskane od chorych. Podczas optymalizacji protokołów sprawdzano intensywność oraz wzór barwienia w komórkach o różnej, znanej ekspresji danego białka. Intensywność fluorescencji oceniano na podstawie parametru *raw max pixel*, informującego o wartości odpowiadającej najjaśniejszemu pikselowi, oraz sprawdzano, czy nie dochodzi do przenikania sygnału na sąsiadujące kanały (tzw. *spill-over*). Ostateczne rozcieńczenia przeciwciał wybrano tak, by w danych komórkach można było uwidocznić szczegóły barwienia przy intensywnej fluorescencji, ale nie kolidującej z fluorescencją pozostałych przeciwciał.



Rycina 5. Wynik barwienia poszczególnych linii komórkowych i BMCs od zdrowych dawców na obecność markerów: K, αSMA, CD29, V i CD45&CD31 w celu optymalizacji stosowanych przeciwciał w protokole K/V. BF - jasne pole, K – keratyna, αSMA – alfa aktyna mięśni gładkich, DAPI – jądro komórkowe, CD29 – integryna beta-1, V – wimentyna, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłonna. Fotografie wykonano w powiększeniu 40x, skala wskazuje 10 μm, Amnis® ImageStream®X Mk II (Cytex).



Rycina 6. Wynik barwienia poszczególnych linii komórkowych i BMCs od zdrowych dawców na obecność markerów: AR, K, EGFR, CD45&CD31 w celu optymalizacji stosowanych przeciwciał w protokole AR/EGFR. BF - jasne pole, AR – receptor androgenowy, K – keratyna, DAPI – jądro komórkowe, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłonna. Fotografie wykonano w powiększeniu 40x, skala wskazuje 10 μm, Amnis® ImageStream®X Mk II (Cytex).

7.5 Barwienie immunofluorescencyjne w celu wykrycia CTCs przy użyciu imFC – protokół K/V

Uprzednio pobrane i zamrożone frakcje BMCs w 4% PFA (**Materiały 6.4**) od poszczególnych chorych rozmrażano i wirowano w wirówce uchylnej przy 750×g przez 3 min w RT. Po usunięciu supernatantu, osad komórkowy zawieszano w 1 ml 1x PBS, rozpipetowywano i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Ponownie usuwano supernatant, a osad komórkowy zawieszono w buforze do permabilizacji 1x Perm/Wash (BD, nr kat. 554723, **Materiały 6.5**) z dodatkiem odpowiednich przeciwciał w odpowiednim rozcieńczeniu (**Tabela 3**) i inkubowano 30 min w temp. 4 °C w mieszadle HulaMixer (Invitrogen, nr kat. 159-20D, **Materiały 6.6**). Po inkubacji próbki wirowano w tych samych warunkach i po usunięciu supernatantu zawieszano osad komórkowy w 1 ml 1x PBS, rozpipetowywano i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Po usunięciu supernatantu osad komórkowy zawieszano w 30 µl 1x PBS. 10 min przed analizą z użyciem cytometru do każdej próbki dodawano roztwór DAPI (0,04 µg/ml, BD, nr kat. 564907, **Materiały 6.5**).

Tabela 3. Lista przeciwciał stosowanych do analiz w panelu K/V z wykorzystaniem cytometru przepływowego Amnis® ImageStream® X Mk II, ich rozcieńczeń i parametrów wykrywania.

Przeciwciało	Fluorofor	Rozcieńczenie	Laser	Moc lasera	Kanał
pan-keratyna (AE1/AE3)	Alexa 488	1:2500	488	100mW	2
pan-keratyna (C11)	Alexa 488	1:2500	488	100mW	2
αSMA (1A4)	PE	1:50	488	100 mW	3
DAPI	DAPI	0,04ug/ml	405	100 mW	7
CD29 (TS2/16)	SuperBright600	1:1000	405	100mW	10
wimentyna (D21H3)	Alexa 647	1:100	647	150mW	11
CD45 (REA747)	APC-Vio770	1:50	647	150mW	12
CD31 (WM59)	APC-Cy7	1:10	647	150mW	12

7.6 Barwienie immunofluorescencyjne w celu wykrycia CTCs przy użyciu imFC – protokół AR/EGFR

BMCs zawieszone w 4% PFA (**Materiały 6.4**) od poszczególnych chorych rozmrażano i wirowano przy 750×g, przez 3 min w wirówce uchylnej. Supernatant usuwano, osad komórkowy zawieszano w 1 ml 1x PBS, rozpipetowywano i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Supernatant usuwano, osad zawieszano w 50 µl buforu do permabilizacji 1x Perm/Wash (BD, nr kat. 554723, **Materiały 6.5**), inkubowano 1 h w temp. 4 °C z użyciem wytrząsarki HulaMixer (Invitrogen, nr kat. 159-20D, **Materiały 6.6**). Następnie, próbki wirowano, usuwano supernatant, a osad zawieszano w 1 ml 1x PBS, rozpipetowywano i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 50 µl koktajlu przeciwciał (**Tabela 4**) zawieszonych w 1x PBS i inkubowano przez noc w temp. 4 °C z użyciem mieszadła HulaMixer. Kolejnego dnia próbki wirowano w tych samych warunkach, usuwano supernatant, zawieszano w 1 ml 1x PBS, rozpipetowywano i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 30 µl 1x PBS. Do każdej próbki 10 min przed analizą z użyciem cytometru dodawano roztwór DAPI (0,04 µg/ml, BD, nr kat. 564907, **Materiały 6.5**).

Tabela 4. Zestawienie stosowanych przeciwciał w protokole AR/EGFR z wykorzystaniem cytometru przepływowego Amnis® ImageStream® X Mk II, ich rozcieńczeń i parametrów wykrywania.

Przeciwciało	Fluorofor	Rozcieńczenie	Laser	Moc lasera	Kanał
AR (D6F11)	Alexa 488	1:50	488	50 mW	2
pan-keratyna (C11)	PE	1:1500	488	50 mW	3
pan-keratyna (AE1/AE3)	PE	1:250	488	50 mW	3
DAPI	DAPI	0,04 µg/ml	405	50 mW	7
EGFR (AY13)	Brilliant Violet-605	1:200	405	50 mW	10
CD45 (REA747)	APC-Vio770	1:100	647	50mW	12
CD31 (WM59)	APC-Cy7	1:20	647	50mW	12

7.7 Analiza próbek klinicznych przy użyciu imFC – protokół K/V i AR/EGFR

Do analizy próbek klinicznych posłużył cytometr przepływowy z funkcją obrazowania - Amnis® ImageStream® X Mk II (Cytek, **Materiały 6.6**) wyposażony w lasery o długości fali 405, 488 i 642 nm oraz oprogramowanie INSPIRE™ (wersja 6.2, Cytek, **Materiały 6.7**). Analiza każdej próbki była przeprowadzana w takich samych zoptymalizowanych warunkach (**Metody 7.4**) zarówno w przypadku protokołu K/V (**Tabela 3, Ryc. 8**), jak i AR/EGFR (**Tabela 4, Ryc. 9**), tj. przy zastosowaniu obiektywu o powiększeniu 40x oraz wolnym przepływie, co pozwoliło na uwidocznienie szczegółów morfologicznych w analizowanych obiektach i uzyskanie zdjęć o wysokiej jakości obrazu / rozdzielczości (**Ryc. 7**).



Rycina 7. Schematyczne przedstawienie sposobu wykonania barwień immunofluorescencyjnych i ich analizy z wykorzystaniem imFC w próbkach klinicznych. Pokrótce, BMCs od chorych barwiono immunofluorescencyjnie, analizowano z użyciem imFC, selekcjonowano, a następnie weryfikowano, zliczano i fenotypowano uzyskane CTCs w programie IDEAS. Rycinę wykonano w aplikacji Biorender.

Przed przystąpieniem do analizy materiału klinicznego pochodzącego od osób zdrowych i poszczególnych chorych stworzono optymalną macierz kompensacyjną z użyciem programu IDEAS. Do jej stworzenia posłużyły linie komórkowe (**Tabela 5, Materiały 6.2**), które wybarwiono odpowiednimi przeciwciałami (**Metody 7.4**). Następnie, z użyciem dedykowanego narzędzia do tworzenia plików kompensacyjnych programie IDEAS zebrano po 5000 komórek z każdej linii komórkowej, na podstawie których zostały utworzone oddzielne pliki dla każdego przeciwciała, które posłużyły do stworzenia macierzy kompensacyjnej w programie IDEAS. Kompensację w protokole K/V wykonano dla trzech najbardziej problematycznych kanałów pod względem lokalizacji sygnału i przenikania fluorescencji na inne kanały – kanał 7 (DAPI), 11 (V) i 12 (CD45 i CD31), aby uniknąć nakładania się fluorescencji V i CD45/CD31 o tym samym wzorze lokalizacji, co mogłoby zafałszować wynik analizy. Tak skompensowana macierz została nałożona na wszystkie uzyskane pliki podczas analizy próbek klinicznych.

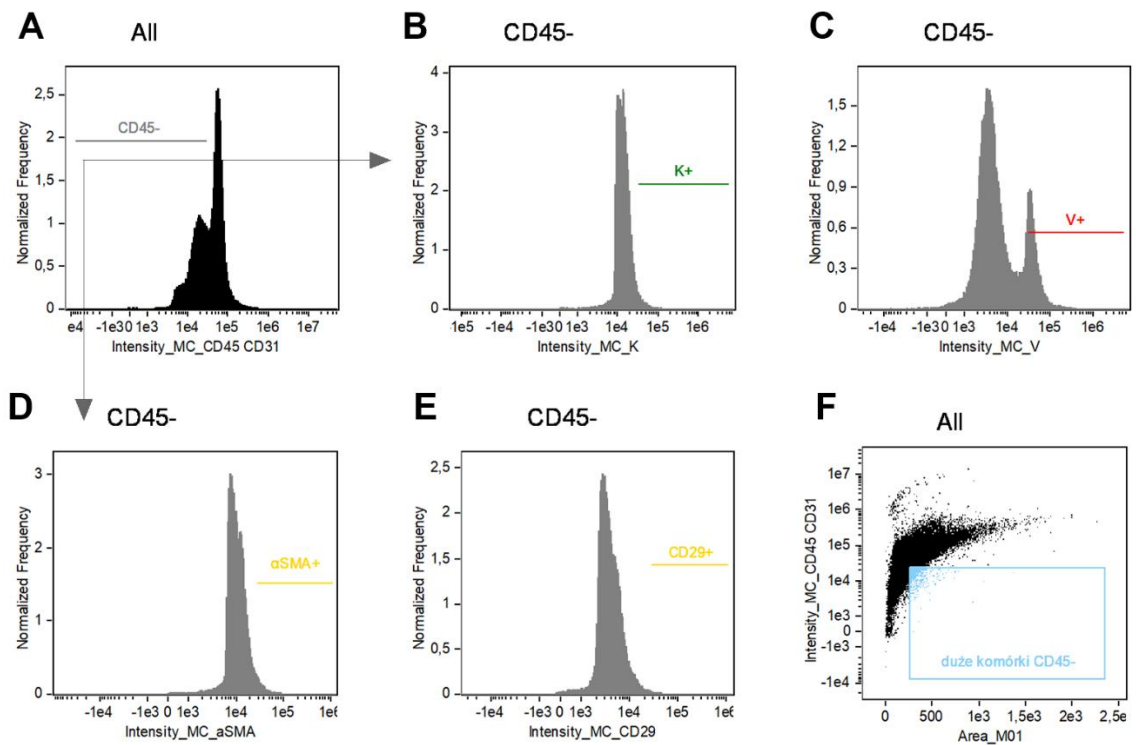
Podczas optymalizacji protokołu AR/EGFR stworzono macierz kompensacyjną dla wszystkich stosowanych kanałów fluorescencyjnych (**Tabela 5**). Techniczny schemat działania był analogiczny jak dla protokołu K/V.

Tabela 5. Linie komórkowe wykorzystane do stworzenia macierzy kompensacyjnej w protokołach K/V i AR/EGFR.

PROTOKÓŁ	LINIA KOMÓRKOWA	PRZECIWCIAŁO
K/V	HMEC-1	anty-V, DAPI
	BMCs	anty-CD45, anty-CD31
AR/EGFR	MCF-7	anty-K, DAPI
	Hs 578T	anty-AR
	HCC1806	anty-EGFR
	BMCs	anty-CD45, anty-CD31

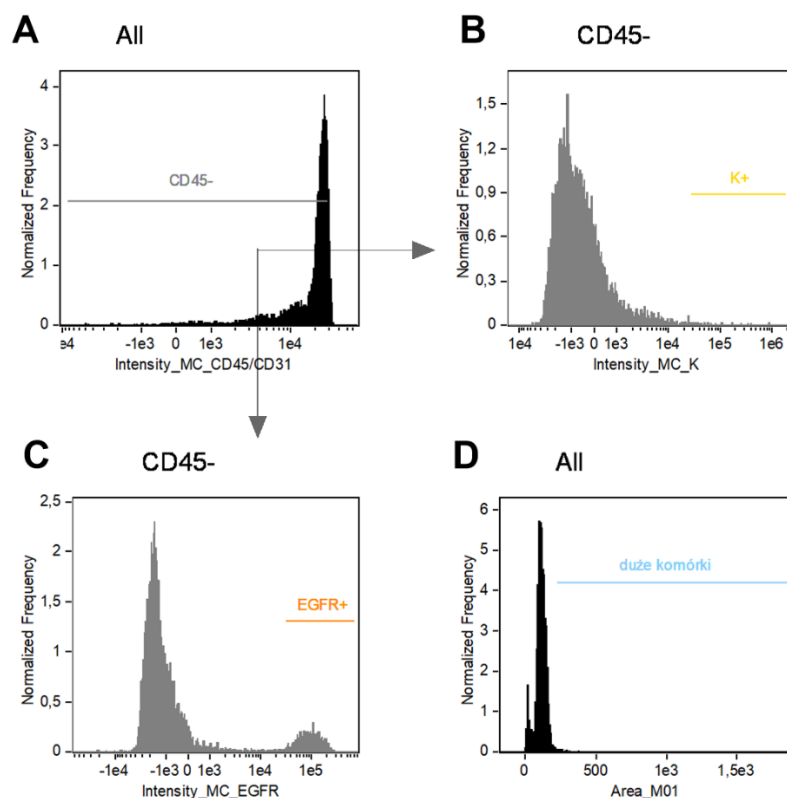
Podczas analizowania próbek z użyciem protokołu K/V ustalano bramkę DAPI+, obejmującą wszystkie komórki identyfikowane na podstawie obecności DAPI-pozytywnego jądra. Po zakończeniu analizy próbek zapisywano liczbę wszystkich wykrytych komórek DAPI+, która później posłużyła do przeliczenia liczby CTCs na 1 mln BMCs dla każdego chorego w celu porównywania wyników między chorymi. Z użyciem protokołu AR/EGFR archiwizowano już tylko komórki DAPI+/CD45-/CD31- w celu ograniczenia rozmiaru plików i ilości nieistotnych zdjęć, utrudniających archiwizację, a nawet czasami pracę na plikach.

Podczas analizy z użyciem protokołu K/V w celu wykrycia CTCs wizualizowano intensywność fluorescencji dla K i V na wykresach punktowych i histogramach, następnie ustalono optymalne bramki (punkty odcięcia) dla komórek wykazujących wyższy poziom fluorescencji niż $2 \cdot 10^4$, określony podczas optymalizacji, identyfikujący również komórki o słabej intensywności fluorescencji danego markera (**Ryc. 8**). Początkowo bramkowano komórki DAPI+, CD45/CD31-negatywne (**Ryc. 8A**). W tej populacji identyfikowano następnie komórki K-pozytywne (**Ryc. 8B**) i komórki V-pozytywne (**Ryc. 8C**). Analizowano również duże obiekty DAPI+, aby zidentyfikować dodatkowo potencjalne CTCs i ich klastry negatywne pod kątem obecności K i V, niewykryte w poprzednich analizowanych populacjach (**Ryc. 8F**). Protokół pozwalał także na detekcję krążących fibroblastów, dzięki barwieniu skierowanemu przeciwko α SMA (**Ryc. 8D**) i CD29 (**Ryc. 8E**) w populacji komórek CD45-negatywnych.



Rycina 8. Schemat bramkowania komórek programie INSPIRE™ podczas analizy próbek klinicznych w celu identyfikacji CTCs i krążących fibroblastów, protokół K-V. Bramka identyfikująca komórki DAPI+/CD45-/CD31-(A), CTCs o fenotypie K+ (B), CTCs o fenotypie V+ (C), duże komórki/klastry negatywne na K i V (F), a także CAFs α SMA-pozytywne (D) i CD29-pozytywne (E). DAPI – jądro komórkowe, K – keratyna, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłonna, α SMA – alfa aktyna mięśni gładkich, CD29 – integryna beta-1, V – wimentyna.

Podczas analizy danych uzyskanych z użyciem protokołu AR/EGFR, bramkowano komórki CD45-negatywne (**Ryc. 9A**) wśród których bramkowano komórki K-pozytywne (**Ryc. 9B**), a także komórki EGFR-pozytywne (**Ryc. 9C**). W całej populacji komórek bramkowano także duże obiekty CD45/CD31- posiadające jądro komórkowe, by nie pominąć żadnej CTCs negatywnej na stosowane markery (**Ryc. 9D**). We wszystkich zidentyfikowanych CTCs oceniano wizualnie ekspresję AR (CTCs AR-pozytywne i CTCs AR-negatywne).



Rycina 9. Schemat bramkowania programie INSPIRE™, wykorzystywany podczas analizy próbek klinicznych w celu identyfikacji CTCs protokołem AR/EGFR. Bramka wyjściowa, identyfikująca komórki posiadające jądro komórkowe, negatywne na CD45 i CD31 (A), CTCs o fenotypie K+ (B), CTCs EGFR+ (C), duże klastry/komórki negatywne na stosowane markery, tj. K- i EGFR- (D). W wykrytych CTCs oceniano dodatkowo obecność i lokalizację AR (manualnie na podstawie zdjęć). DAPI – jądro komórkowe, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłonna, K – keratyna, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, AR – receptor androgenowy.

Wszystkie obiekty negatywne pod kątem CD45, CD31, αSMA i CD29, w wyselekcjonowanych bramkach weryfikowano na podstawie obrazów immunofluorescencyjnych – morfologii komórek, morfologii jądra i szczegółów barwienia immunofluorescencyjnego. W próbkach analizowanych z użyciem protokołu K/V zidentyfikowano różne fenotypy CTCs: epitelialne (ang. *epithelial* CTCs, epi CTCs), epitelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal* CTCs, epi-mes CTCs), mezenchymalne (ang. *mesenchymal* CTCs, mes CTCs) i podwójnie negatywne CTCs (podwójnie-neg CTCs) oraz cCAFs, zgodnie z kryteriami przedstawionymi w **Tabeli 6**.

Tabela 6. Kryteria oceny obecności CTCs i cCAFs w frakcji komórek DAPI+/CD45/CD31-.

Rodzaj wykrytej komórki	Wzór markerów	Protokół
epi CTCs	K+/DAPI+/V-/CD45&CD31-/CD29-/αSMA-(K+/V-)	K/V
mes CTCs	K-/DAPI+/V+/CD45&CD31-/CD29-/αSMA-(K-/V+)	
epi-mes CTCs	K+/DAPI+/V+/CD45&CD31-/CD29-/αSMA-(K+/V+)	
podwójnie-neg CTCs	K-/DAPI+/V-/CD45&CD31-/CD29-/αSMA-(K-/V-)	
cCAFs	αSMA+/K-/DAPI+/V-/CD45&CD31- αSMA+/K-/DAPI+/V+/CD45&CD31- CD29+/K-/DAPI+/V-/CD45&CD31- CD29+/K-/DAPI+/V+/CD45&CD31-	K/V
CTCs K-pozytywne	K+/AR+/DAPI+/EGFR+/CD45&CD31- K+/AR-/DAPI+/EGFR+/CD45&CD31- K+/AR-/DAPI+/EGFR-/CD45&CD31- K-/AR-/DAPI+/EGFR+/CD45&CD31-	AR/EGFR
CTCs K-negatywne	K-/AR-/DAPI+/EGFR-/CD45&CD31- K-/AR+/DAPI+/EGFR-/CD45&CD31-	

Ponadto, CTCs obserwowane u chorych na mzRGK, dla niektórych analiz podzielono dodatkowo na dwie grupy: epiCTCs (K+/V-) oraz EMT CTCs (epi-mes-CTCs: K+/V+ oraz mes-CTCs: K-/V+ i podwójnie-neg: K-/V-). Podwójnie negatywne CTCs zakwalifikowano do grupy CTCs związanych z EMT, zakładając, że podczas procesu EMT przypuszczalnie mogłyby utracić markery epitelialne (K) i nie nabyć jeszcze markerów mezenchymalnych (V).

Komórki zakwalifikowane jako CTCs zliczono oraz określono ich fenotyp, stopień sklastrowania i interakcje z innymi komórkami. Udokumentowana obecność CTCs, ich liczba, fenotypy, obecność klastrów CTCs i potencjalnych klastrów CTCs z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna, erytrocytami i płytkami krwi, zostały następnie skorelowane

z danymi kliniczno-patologicznymi. W celu ujednolicenia analiz wszystkich próbek, liczbę CTCs dla każdego chorego i rodzaju CTCs przeliczono w odniesieniu do 1 mln BMCs. Dodatkowo, dla każdego chorego określano fenotyp dominujący, na podstawie najliczniejszej populacji CTCs o danym fenotypie. W sytuacji, gdy dwa fenotypy były jednakowo liczne, określano fenotyp dominujący jako heterogenny. Przyjęto, że liczba CTCs $\geq 1/1$ mln BMCs oznaczała, że chory był klasyfikowany jako CTCs-pozytywny.

7.8 Analiza immunohistochemiczna

Barwienia immunohistochemiczne fragmentów guzów na obecność markerów proliferacji (Ki-67) i naczyń krwionośnych (CD34) zostały przeprowadzone z wykorzystaniem urządzenia BenchMark ULTRA IHC/ISH System (Roche Diagnostics, **Materiały 6.6**) zgodnie z rutynowym zautomatyzowanym protokołem barwienia mikromacierzy tkankowych, w Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Pokrótce, w celu analizy Ki-67 w komórkach nowotworowych, TMA poddano deparafinizacji i odstonięciu antygenów przy użyciu buforu Low EnVision Flex Target Retrieval Solution (pH 6, **Materiały 6.4**) i gotowano przez 20 min w temp. 97 °C. Następnie, TMA zanurzono w buforze EnVision Flex Peroxidase-Blocking Reagent (**Materiały 6.5**) i inkubowano przez 5 min. Po upływie tego czasu przepłukano TMA buforem 1xPBS i dodano królicze przeciwciało pierwszorzędowe anti-Ki-67 (**Materiały 6.3**) i inkubowano 20 min. Następnie, TMA przepłukano 1x PBS i wizualizowano Systemem UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche, **Materiały 6.5**). Następnie TMA podbarwiono 5 min w hematoksylinie.

Wybarwione TMA skanowano przy użyciu skanera Pannoramic 250 Flash III (**Materiały 6.6**). Skany TMA przeanalizowano przy użyciu oprogramowania QuPath ver. 0.2.3. (**Materiały 6.7**). Określono, jaki procent komórek nowotworowych stanowią komórki Ki-67-pozytywne w danym fragmencie nowotworu. Wyniki skategoryzowano na komórki nowotworowe negatywne na Ki-67 (brak komórek Ki-67-pozytywnych), z niskim poziomem Ki-67 (1-10%

komórek guza była Ki-67-pozytywna) i z wysokim poziomem Ki-67 (gdy >10% komórek guza była Ki-67-pozytywna), poziomy odcięcia ustalono arbitralnie na podstawie częstości występowania białka Ki-67 we fragmentach nowotworów.

W celu analizy CD34, we fragmentach nowotworów, przeprowadzono deparafinizację TMA i odstonięcie antygenów przy użyciu buforu high EnVision Flex (pH 9, **Materialy 6.4**) i gotowano w temp. 97 °C przez 20 min. Kolejno, TMA traktowano buforem EnVision Flex Peroxidase-Blocking Reagent (**Materialy 6.5**) przez 5 min. Następnie, przepłukano TMA buforem 1xPBS i dodano mysie przeciwciało monoklonalne anty-CD34 i inkubowano przez 20 min. TMA przepłukano buforem 1x PBS i wizualizowano systemem Autostainer Link48 (Dako, **Materialy 6.6**). Następnie preparaty podbarwiono 5 min hematoksyliną.

Barwienie immunohistochemiczne oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego (Olympus BX 43, Olympus, **Materialy 6.6**). Udokumentowano całkowitą liczbę CD34-pozytywnych naczyń krwionośnych (ang. *vascular vessels*, VV) o widocznym świetle naczyń, które zidentyfikowano w pojedynczym fragmencie nowotworu⁶⁴. Wyniki skategoryzowano na podstawie mediany wynoszącej 120, podzielono je na fragmenty o dużej (≥ 120 , VV^{high}) i małej liczbie naczyń krwionośnych (< 120 naczyń, VV^{low}).

7.9 Analiza immunofluorescencyjna

TMA inkubowano w buforze o pH 9 (Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH Buffer; Dako, **Materialy 6.4**) w urządzeniu PT Link w temp. 96 °C przez 20 min. Następnie, slajdy mikroskopowe chłodzono przez 15 min w RT. Po upływie tego czasu, slajdy przemywano trzykrotnie 1x PBS i dodawano odczynnik wyciszający autofluorescencję tkanek (1x TrueBlack w 70% etanolu, **Materialy 6.4**) z którym inkubowano slajdy przez 1 min. Slajdy mikroskopowe przepłukiwano trzykrotnie 1x PBS. Następnie dodawano koktajl przeciwciał: królicze przeciwciało pierwszorzędowe anty-V (1:100), mysie przeciwciało anty-K skoniugowane z Alexa Fluor® 488 (klon AE1/AE3,

Materiały 6.3) i mysie przeciwciała anty-K skoniugowane z Alexa Fluor® 488 (klon C11, **Materiały 6.3)** w REAL™ Antibody Diluent (Dako, **Materiały 6.5)** i inkubowano przez 40 min w RT. Po upływie tego czasu, slajdy ponownie przepłukiwano trzykrotnie 1x PBS i nakładano na nie przeciwciała drugorzędowe anty-królicze skoniugowane z Alexa Fluor® 546 w rozcieńczeniu 1:200 w REAL™ Antibody Diluent (Dako, **Materiały 6.3)** i inkubowano przez 40 min w RT. Następnie, slajdy przepłukiwano trzykrotnie 1x PBS, dodawano EverBrite Mounting Medium zawierające DAPI (Vector Laboratories, **Materiały 6.5)** i na preparaty nakładano szkiełka nakrywkowe.

Barwienia dokumentowano przy użyciu skanera Pannoramic 250 Flash III (**Materiały 6.6)** Skany TMA przeanalizowano przy użyciu oprogramowania QuPath ver. 0.2.3 (**Materiały 6.7)**. Określono, jaki procent komórek nowotworowych stanowią komórki nowotworowe K-pozytywne, a jaki V-pozytywne w danym fragmencie nowotworu. Dla każdego chorego określono fenotyp dominujący, gdy jeden z fenotypów: K+/V- lub EMT (tj. K+/V+, K-/V+ i/lub K-/V-) był obecny w $\geq 50\%$ wszystkich analizowanych komórek guza.

7.10 Pomiar stężenia cytokin w osoczu

Stężenie transformującego czynnika wzrostu (ang. *transforming growth factor*, TGF- β) i płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor BB isoform*, PDGF-BB) zostało zmierzone w próbkach osocza zebranych po wirowaniu w gradiencie gęstości próbek krwi (PB i/lub TDVB) od chorych na mZRGK. Do momentu przeprowadzenia analiz osocze przechowywano w temp. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Metody 7.1)**. Poziom cytokin mierzono przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów do ilościowej immunodetekcji białek (Quantikine ELISA, R&D Systems, **Materiały 6.5)** i czytnika mikroplatek (BioTek Synergy H1 Microplate Reader, Agilent Technologies, **Materiały 6.6)** zgodnie z protokołem producenta.

Pokrótce, na płytce opłaszczoną przeciwciałami skierowanymi przeciwko TGF- β lub PDGF-BB naniesiono osocze w rozcieńczeniach 8x (TGF- β) lub 20x

(PDGF-BB) oraz roztwory wzorcowe. Płytki inkubowano przez 2 godziny w RT, w tym czasie wolne TGF- β lub PDGF-BB zostało związane przez przeciwciała na płytce, którą następnie przepłukiwano i dodawano skoniugowane z enzymem przeciwciała wykrywające TGF- β lub PDGF-BB. Po dwugodzinnej inkubacji w RT, płytki, przepłukiwano i do każdego dołka dodawano roztwór substratu, po czym inkubowano w ciemności. Reakcje zatrzymywano po 30 min i dokonywano pomiaru kolorymetrycznego przy długościach fali 450 nm z użyciem czytnika płytek Synergy H1 (BioTek, **Materiały 6.6**). Stężenia TGF- β i PDGF-BB określono na podstawie wartości względnych intensywności dla każdej próbki i krzywych wzorcowych, wykonanych z zastosowaniem seryjnych rozcieńczeń gotowego standardu kalibracyjnego w 8 następujących stężeniach: 0, 31,3; 62,5; 125; 250; 500; 1000 i 2000 pg/ml). Następnie porównano wyniki dla obu cytokin między próbkami.

7.11 Analiza statystyczna

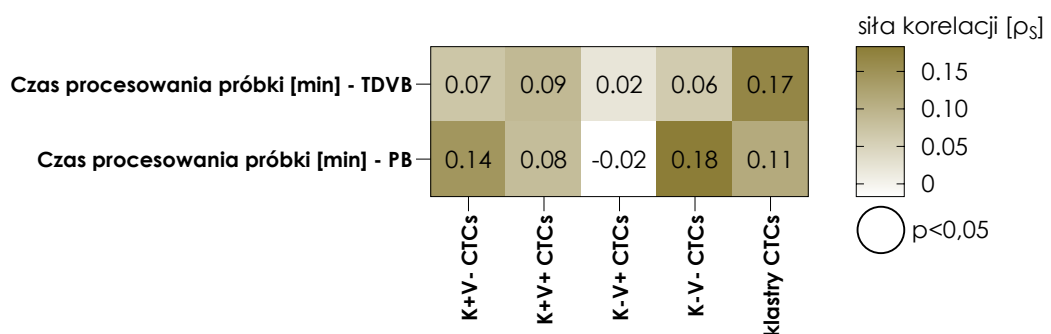
Zmienne jakościowe porównywano testem Chi² Pearsona lub testem Fishera, zaś zmienne ciągłe korelowano z użyciem testu rang Spearmana. Różnice w rozkładach zmiennych ilościowych między grupami: TDVB mRGK, PB mRGK, TDVB i/lub PB mRGK oraz PB pRGK, analizowano testami U Manna-Whitneya i Kruskalla – Wallisa. Krzywe Kaplana-Meiera dla BR porównywano testem log-rank Mantela-Coxa. Hazard względny (ang. *hazard ratio*, HR) z 95% przedziałem ufności (ang. *95% confidence interval*, 95% CI) w celu analizy ryzyka BR (analiza wieloczynnikowa) obliczano z użyciem metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa (ang. *stepwise Cox regression*). Różnice uznawano za istotne statystyczne, gdy prawdopodobieństwo testowe (ang. *P-value*, p) były mniejsze niż 0,05. Analizy statystycznych wykonano w programie SPSS (wersja 27). Ryciny przygotowywano w programie GraphPad Prism (wersja 8) i aplikacji Biorender (**Materiały 6.7**).

8. WYNIKI

8.1 Zbieranie i analiza próbek klinicznych

Z użyciem protokołu K/V (**Metody 7.5**) metodą imFC (**Metody 7.7**) przeanalizowano 68 próbek TDVB i 106 próbek PB od mZRGK. Jako kontrole negatywne, przeanalizowano również BMCs pochodzące od zdrowych mężczyzn ($n=20$, zakres wieku 21-80 lat, mediana 50,5). Tym samym protokołem przeanalizowano również próbki kliniczne pobrane od 20 chorych z pRGK, stanowiących kontrole pozytywne (zakres wieku 49-81 lat, mediana 76).

Wszystkie próbki od chorych z mZRGK, zdrowych ochotników i chorych z pRGK były analizowane w ten sam sposób (**Metody 7.7**), a liczbę zidentyfikowanych CTCs przeliczono na 1 mln BMCs w celu normalizacji wyników pochodzących z różnych próbek klinicznych w celu ich porównania między chorymi. Próbkę krwi były procesowane tak szybko po pobraniu, jak było to możliwe: 96% próbek TDVB (mediana 130 min) i 88% próbek PB (mediana 255 min) zostało przeprocesowanych w ciągu 3 godzin od pobrania. Obecność i liczba pojedynczych CTCs i klastrow CTCs w PB i TDVB nie była związana z czasem procesowania próbek (**Ryc. 10**). U zdrowych ochotników (kontrole negatywne) nie znaleziono CTCs i cCAFs.

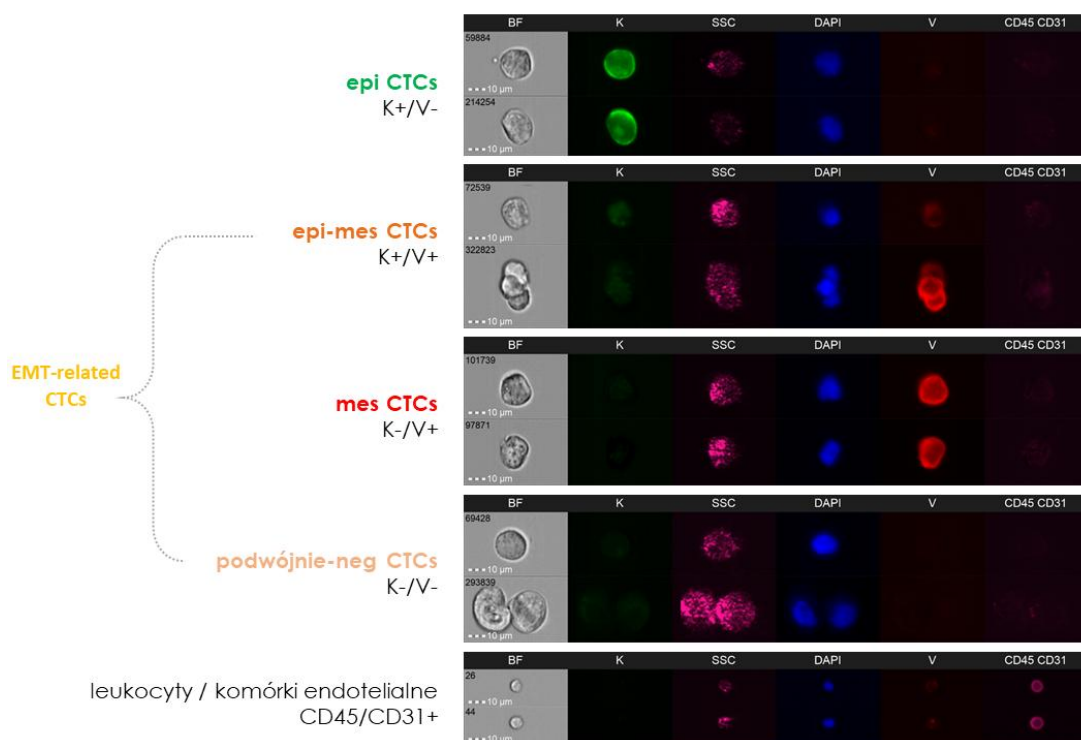


Rycina 10. Współczynniki korelacji rang Spearmana (ρ_s) pomiędzy fenotypami pojedynczych CTCs i ich klastrow, a czasem procesowania próbek TDVB i PB [min]. epi CTCs (K+/V-), epi-mes CTCs (K+/V+), mes CTCs (K-/V+), podwójnie-neg CTCs (K-/V-), TDVB – krew z żyły drenującej guz, PB – krew obwodowa. Siła korelacji: $\rho_s = 0,9-1$ – całkowita korelacja; $0,8-0,9$ – bardzo silna korelacja; $0,6-0,8$ – silna korelacja; $0,4-$

0,6 – umiarkowana korelacja; 0,2-0,4 – słaba korelacja; <0,2 – bardzo słaba korelacja. Skala ukazuje różnice kolorystyczne w poziomie korelacji, a wyniki istotne statystycznie ($p<0,05$) byłyby otoczone okręgiem.

8.2 CTCs, ich klastry i cCAFs wykrywane w TDVB i/lub PB u chorych na RGK

Analizowane markery wykazywały zróżnicowaną, aczkolwiek oczekiwaną lokalizację komórkową w CTCs. K, V i α SMA były zlokalizowane w cytoplazmie, natomiast CD45 i CD31 w błonie komórkowej (**Metody 7.4, Ryc. 5**) na podstawie których zidentyfikowano 4 fenotypy CTCs (**Metody 7.7, Tabela 5, Ryc. 11**). Podczas analiz dokumentowano komórki we wszystkich kanałach fluorescencyjnych, ale dla uproszczenia na rycinach zaprezentowane zostały jedynie kanały istotne dla wyników. Obserwowano pojedyncze CTCs (**Wyniki 8.2.1, Wyniki 8.2.2 i Wyniki 8.2.5**) i ich klastry (**Wyniki 8.2.4 i Wyniki 8.2.6**) oraz CAFs (**Wyniki 8.2.7**).



Rycina 11. Reprezentatywne fotografie przedstawiające poszczególne fenotypy CTCs oraz leukocyty i/lub krążące komórki endotelialne. Fenotyp epitelialny: K+/DAPI+/V-/CD45&CD31-/αSMA-/CD29- (K+/V-), fenotyp epitelialno-mezenchymalny: K+/DAPI+/V+/CD45&CD31-/αSMA-/CD29- (K+/V+), fenotyp mezenchymalny: K-/DAPI+/V+/CD45&CD31-/αSMA-/CD29- (K-/V+), fenotyp podwójnie-negatywny K-/DAPI+/V-/CD45&CD31-/αSMA-/CD29- (K-/V-), leukocyty/krążące komórki śródbłonna: K-/DAPI+/V-/CD45&CD31+/αSMA-/CD29-. BF - jasne pole; K – keratyna; SSC – rozproszenie boczne, DAPI – jądro komórkowe, V – wimentyna, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłonna. Fotografie wykonano w powiększeniu 40x, Amnis® ImageStream®X Mk II (Cytex).

8.2.1 Pojedyncze CTCs w TDVB od chorych mżRGK

Wykrywano średnio 328365 komórek DAPI+ u jednego chorego (**Metody 7.7**). W 35/68 (51,5%) próbkach TDVB od chorych mżRGK analizowanych protokołem K/V zidentyfikowano przynajmniej 1 CTC. W TDVB najczęściej obserwowano dwa fenotypy – epitelialny, wykryty u 85,7% chorych pozytywnych na CTCs i epitelialno-mezenchymalny, wykryty u 77,1% chorych. Fenotypy mezenchymalny i podwójnie-negatywny były obecne odpowiednio u 40% oraz 34,3% chorych CTC-pozytywnych chorych mżRGK

(**Tabela 7**). Średnia liczba CTCs w przeliczeniu na 1 mln BMC również najwyższa była w przypadku epitelialnych CTCs (**Tabela 6**).

Tabela 7. Zestawienie danych od CTCs-pozytywnych chorych z mzRGK, obejmujące % chorych posiadających CTCs o danym fenotypie oraz liczbę CTCs o konkretnym fenotypie w TDVB w przeliczeniu 1 mln BMCs. Procenty nie sumują się do 100, ponieważ różne fenotypy CTCs współwystępowały ze sobą. CTCs – krążące komórki nowotworowe, BMCs – jednojądrzaste komórki krwi, K – keratyna, V- wimentyna, TDVB – krew drenująca guz.

fenotypy CTCs w TDVB	Chorzy CTCs-pozytywni n / %	Liczba CTCs / 1 mln BMC zakres (średnia)
Wszystkie	35 / 100%	1-2542 (290,1)
K+/V-	30 / 85,7%	2-1747 (197,6)
K+/V+	27 / 77,1%	1-533 (45,4)
K-/V+	14 / 40,0%	2-191 (16,3)
K-/V-	12 / 34,3%	1-318 (30,7)

8.2.2 Pojedyncze CTCs w PB od chorych mzRGK

W próbkach PB od chorych z mzRGK wykrywano średnio – 410805 komórek DAPI+ (**Metody 7.7**) W PB, 20/106 (18,8%) chorych mzRGK było CTCs-pozytywnych. przypadających na jednego chorego. CTCs o fenotypie epitelialnym wykryto u 75,0%, epitelialno-mezenchymalnym u 85,0%, mezenchymalnym u 35,0%, a podwójnie-negatywnym u 35,0% chorych CTCs-pozytywnych (**Tabela 7**). Średnia liczba CTCs w przeliczeniu na 1 mln BMC była najwyższa w przypadku epitelialnych CTCs (**Tabela 8**).

Tabela 8. Zestawienie danych od CTCs-pozytywnych chorych z mzRGK, obejmujące % chorych posiadających CTCs o danym fenotypie oraz liczbę CTCs o konkretnym fenotypie w PB w przeliczeniu 1 mln BMCs. Procenty nie sumują się do 100, ponieważ różne fenotypy CTCs współwystępowały ze sobą. CTCs – krążące komórki nowotworowe, BMCs – jednojądrzaste komórki krwi, K – keratyna, V- wimentyna, PB – krew obwodowa.

fenotypy CTCs w PB	Chorzy CTCs-pozytywni n / %	Liczba CTCs / 1 mln BMC zakres (średnia)
wszystkie	20 / 100%	1-879 (67,1)
K+/V-	15 / 75,0%	1-709 (37,6)
K+/V+	17 / 85,0%	2-567 (24,8)
K-/V+	7 / 35,0%	1-30 (2,5)
K-/V-	7 / 35,0%	3-63 (2,3)

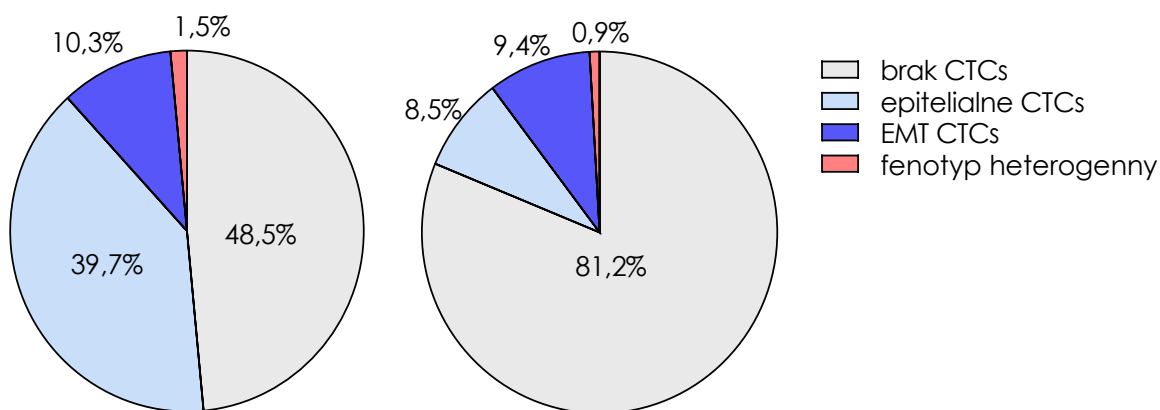
8.2.3 Porównanie TDVB i PB u chorych z mzRGK

U chorych z mzRGK, większą liczbę CTCs niż w PB wykryto w TDVB (test U- Manna-Whitneya=4864; $p<0,001$, **Tabela 6** i **Tabela 7**).

W TDVB heterogenność fenotypów występowała w 82,9% natomiast w PB w 75,0% chorych CTC-pozytywnych (brak istotności statycznej między tymi dwoma grupami). Dlatego określono również fenotyp dominujący przypadający na chorego (**Ryc.12**). W TDVB przeważał fenotyp epitelialny (39,7%), a w PB fenotyp związany z EMT (9,4%) jako dominujący i różnica ta była istotna statystycznie ($\text{Chi}^2=26,08$; $p<0,001$).

TDVB - dominujący fenotyp

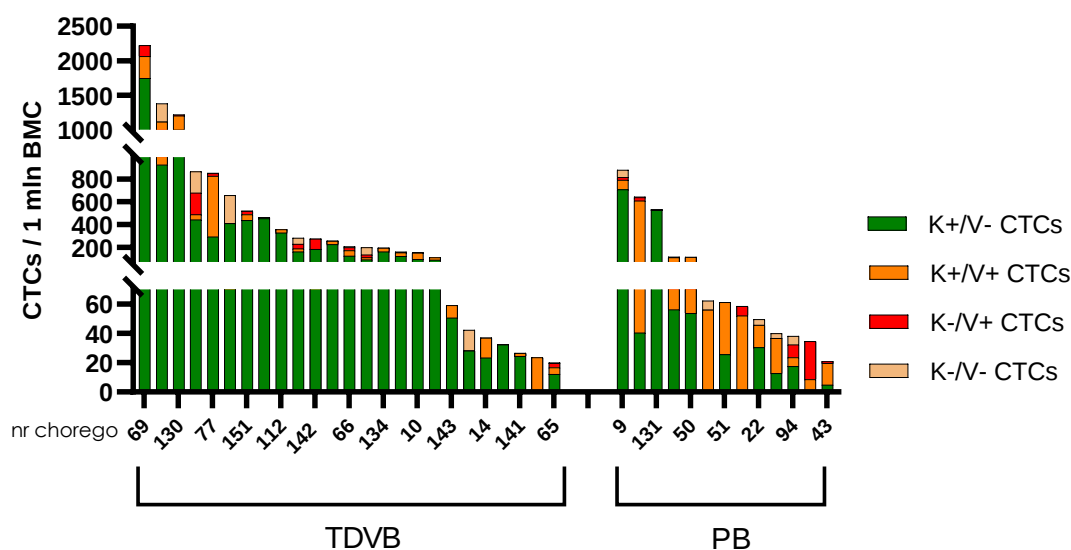
PB - dominujący fenotyp



$\chi^2=26,08$; $p<0,001$

Rycina 12. Rozkład dominujących fenotypów CTCs w TDVB (n=68) i PB (n=106) u chorych z mżRGK. Fenotyp heterogenny oznaczał współwystępowanie CTCs o fenotypie epitelialnym i CTCs o fenotypie EMT w tej samej liczbie. CTCs o fenotypie EMT, obejmowały CTCs epitelialno-mezenchymalne, mezenchymalne i podwójnie-negatywne. TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa, CTCs – krążące komórki nowotworowe.

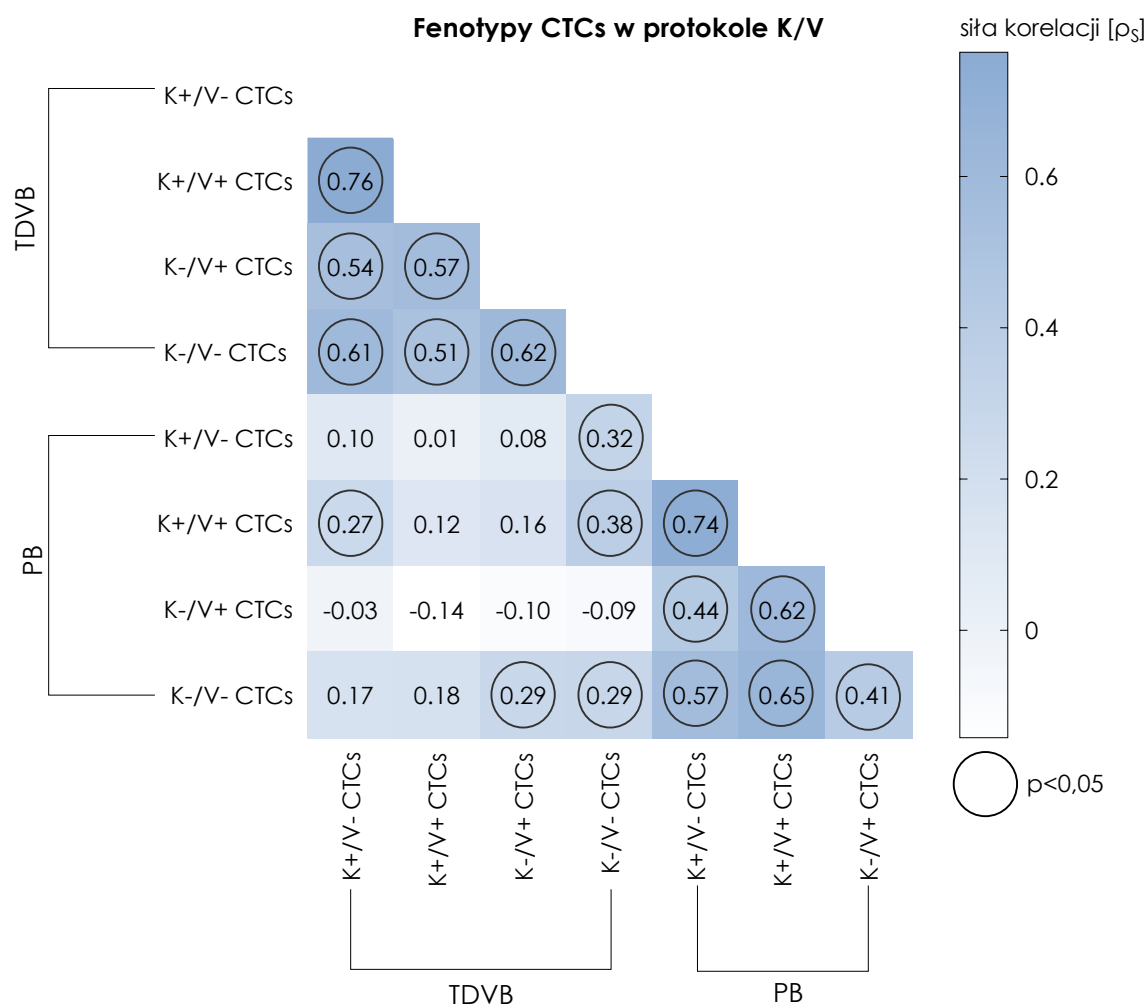
Rozkład różnych fenotypów CTCs w ograniczonej grupie chorych, tj. u chorych z liczbą CTCs ≥ 20 CTCs/ 1mln BMCs zaprezentowano na **Rycinie 13** w celu zobrazowania stopnia heterogenności fenotypów wśród indywidualnych chorych.



Rycina 13. Liczba CTCs w podziale na ich fenotypy u chorych z mZRGK z ≥ 20 CTCs/1mln BMCs. CTCs – krążące komórki nowotworowe, K – keratyna, V – wimentyna, BMCs – jednojądrzaste komórki krwi.

Porównywano związek liczby CTCs o poszczególnych fenotypach między sobą (**Ryc. 14**). Liczba epitelialnych CTCs w TDVB korelowała z liczbą epitelialno-mezenchymalnych CTCs ($\rho_s=0,76$; $p<0,001$), mezenchymalnych CTCs ($\rho_s=0,54$; $p<0,001$) i podwójnie-negatywnych CTCs ($\rho_s=0,61$; $p<0,001$) w TDVB, a także słabo korelowała z liczbą epitelialno-mezenchymalnych CTCs w PB ($\rho_s=0,27$; $p=0,048$). Ponadto, liczba epitelialno-mezenchymalnych CTCs w TDVB korelowała z liczbą mezenchymalnych CTCs ($\rho_s=0,57$; $p<0,001$) i podwójnie-negatywnymi CTCs w TDVB ($\rho_s=0,51$; $p<0,001$). Liczba podwójnie-negatywnych CTCs w TDVB korelowała z liczbą mezenchymalnych CTCs w TDVB ($\rho_s=0,62$; $p<0,001$) i słabo korelowała z liczbą mezenchymalnych CTCs w PB ($\rho_s=0,29$; $p=0,035$). W PB, liczba epitelialnych CTCs korelowała z liczbą podwójnie-negatywnych CTCs w TDVB ($\rho_s=0,32$; $p=0,017$), liczba epitelialno-mezenchymalnych CTCs w PB korelowała z liczbą podwójnie-negatywnych CTCs w TDVB ($\rho_s=0,38$; $p=0,004$), a liczba podwójnie-negatywnych CTCs w PB korelowała z liczbą podwójnie-negatywnych CTCs w TDVB ($\rho_s=0,29$; $p=0,030$). Dodatkowo, liczba epitelialno-mezenchymalnych CTCs w PB korelowała z liczbą epitelialnych CTCs w PB ($\rho_s=0,74$; $p<0,001$), liczba mezenchymalnych CTCs

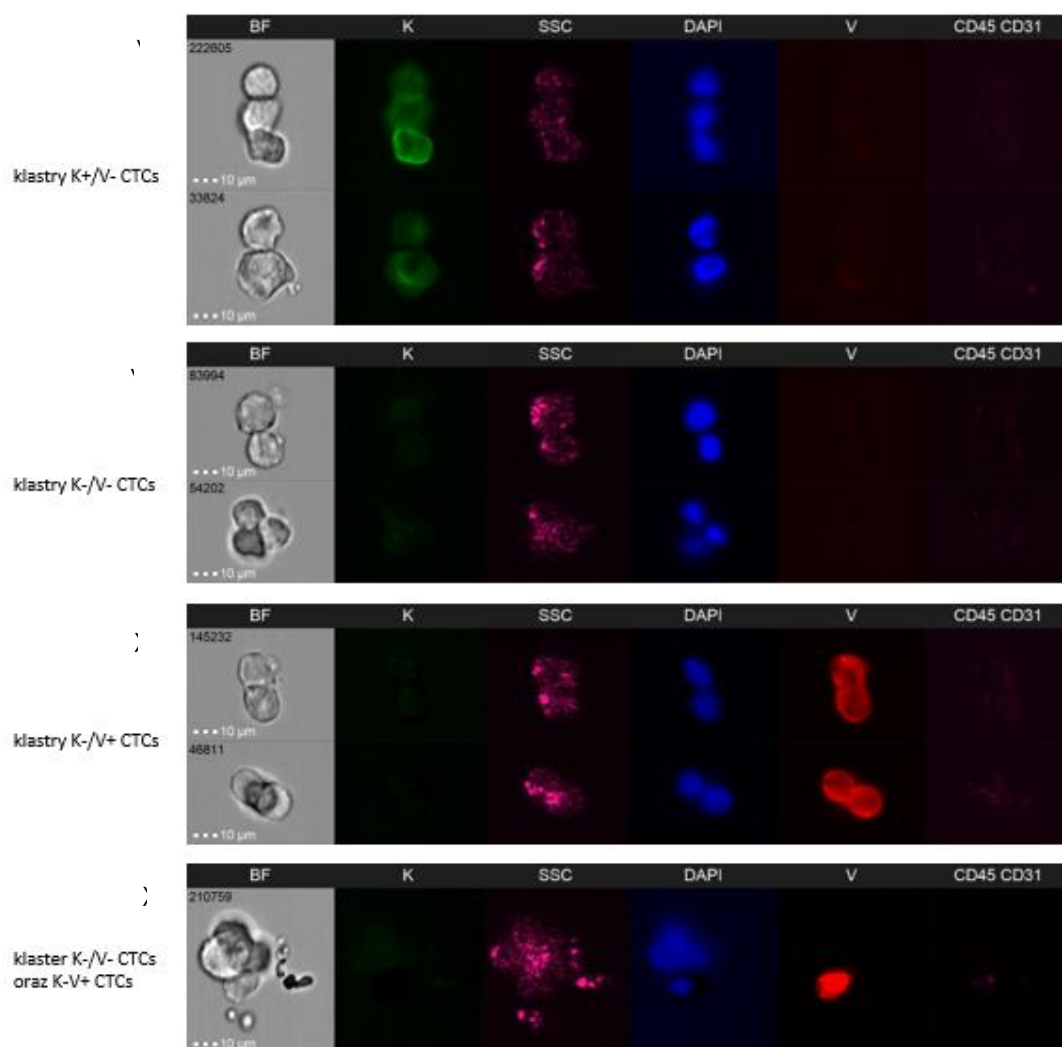
w PB korelowała z liczbą epitelialnych ($\rho_s=0,44$; $p<0,001$) i epitelialno-mezenchymalnych CTCs w PB ($\rho_s=0,62$; $p<0,001$). Z kolei liczba podwójnie-negatywne CTCs w PB korelowała z liczbą mezenchymalnych CTCs w TDVB ($\rho_s=0,29$; $p=0,035$), podwójnie-negatywnych CTCs w PB ($\rho_s=0,29$; $p=0,030$), epitelialnych CTCs w PB ($\rho_s=0,57$; $p<0,001$), epitelialno-mezenchymalnych CTCs w PB ($\rho_s=0,65$; $p<0,001$) i mezenchymalnych CTCs w PB ($\rho_s=0,41$; $p<0,001$).



Rycina 14. Współczynniki korelacji rang Spearmana (ρ_s) pomiędzy liczbą CTCs o różnych fenotypach w TDVB i PB. Istotne statystycznie korelacje zaznaczono okręgiem ($p<0,05$). epitelialne CTCs (K+/V-), epitelialno-mezenchymalne CTCs (K+/V+), mezenchymalne CTCs (K-/V+), podwójnie-negatywne CTCs (K-/V-), CTCs – krążące komórki nowotworowe, PB – krew obwodowa, TDVB – krew drenująca guz. Siła korelacji: $\rho_s = 0,9-1$ – całkowita korelacja; $0,8-0,9$ – bardzo silna korelacja; $0,6-0,8$ – silna korelacja; $0,4-0,6$ – umiarkowana korelacja; $0,2-0,4$ – słaba korelacja; $<0,2$ – bardzo słaba korelacja. Skala ukazuje różnice kolorystyczne w poziomie korelacji, a wyniki istotne statystycznie ($p<0,05$) są otoczone okręgiem.

8.2.4 Klastry CTCs w TDVB i PB u chorych mzRGK

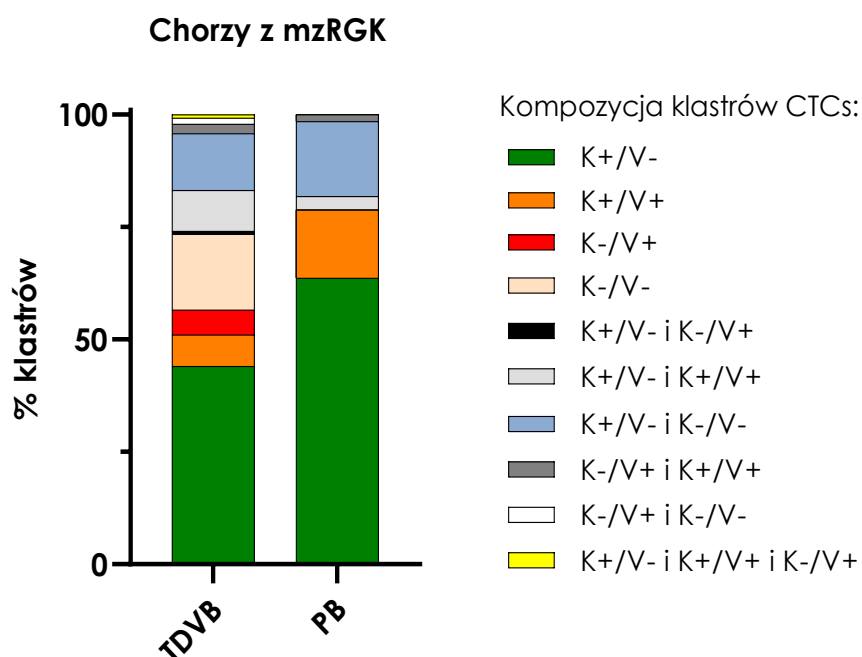
Część z wykrytych CTCs występowała w zgrupowaniach komórek, tzw. homotypowych klastrach CTCs (**Ryc. 15**).



Rycina 15. Reprezentatywne fotografie przedstawiające klastry złożone z CTCs o tym samym fenotypie (A-C) i CTCs o różnych fenotypach w obrębie jednego klastra (D). BF - jasne pole; K – keratyna; SSC – rozproszenie boczne, DAPI – jądro komórkowe, V – wimentyna, CD45/CD31 – marker leukocytów/kraążących komórek śródbłonna. Zdjęcia wykonane obiektywem o powiększeniu 40x, Amnis® ImageStream®X Mk II (Cytex).

W TDVB u chorych z mzRGK wykryto klastry CTCs u 21 (30,9%) z 68 chorych z mzRGK (zakres 1-135 klastrow CTCs/1 mln BMCs), które były zbudowane z 2-6 komórek, z przewagą klastrow 3-komórkowych. Co więcej zawsze współwystępowały one z pojedynczymi CTCs i miały zróżnicowaną kompozycję z przewagą klastrow CTCs składających się z komórek o fenotypie K+V- (**Ryc. 16**).

W PB od 11 (10,4%) z 106 chorych z mzRGK (zakres 3-147/1 mln BMCs) i zidentyfikowano jedynie klastry dwukomórkowe, składające się z CTCs o tym samym bądź dwóch różnych fenotypach, z dominującym fenotypem K+V-. W obu grupach najliczniejszą grupę stanowiły klastry CTCs zawierające przynajmniej jedną komórkę nowotworową o fenotypie epitelialnym (spośród innych CTCs tworzących klaster).



Rycina 16. Rozkład kompozycji klastrow CTCs wykrytych w PB i TDVB. CTCs – krążące komórki nowotworowe, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa, K – keratyna, V – wimentyna, mzRGK – miejscowo zaawansowany rak gruczołu krokowego.

8.2.5 Pojedyncze CTCs w PB od chorych z pRGK

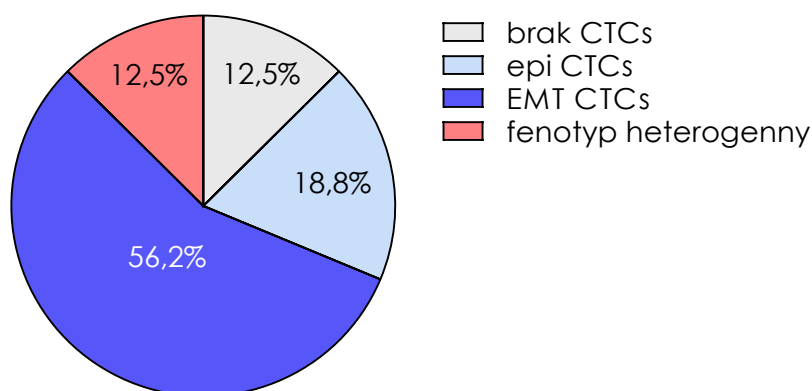
W przypadku PB od chorych z pRGK CTCs występowały częściej (tj. 87,5%, 14/16 próbek), ale mniej licznie w przeliczeniu na jednego chorego w porównaniu do chorych z mzRGK (**Tabela 8**). U chorych z pRGK, epitelialne CTCs wykryto u 35,7%, epitelialno-mezenchymalne CTCs u 21,4%, mezenchymalne CTCs u 35,7%, a podwójnie-negatywne CTCs u 50,0% chorych CTC-pozytywnych (**Tabela 9**).

Tabela 9. Zestawienie danych od CTCs-pozytywnych chorych z pRGK, obejmujące % chorych posiadających CTCs o danym fenotypie oraz liczbę CTCs o konkretnym fenotypie w PB w przeliczeniu 1 mln BMCs. Procenty nie sumują się do 100, ponieważ różne fenotypy CTCs współwystępowały ze sobą. CTCs – krążące komórki nowotworowe, BMCs – jednojądrzaste komórki krwi, K – keratyna, V- wimentyna, PB – krew obwodowa.

fenotypy CTCs w PB	Chorzy CTCs-pozytywni n /%	Liczba CTCs / 1 mln BMC zakres (średnia)
wszystkie	14 / 100%	1-230 (30,9)
K+/V-	5/14 (35,7%)	3-46 (5,6)
K+/V+	3/14 (21,4%)	2-19 (1,8)
K-/V+	5/14 (35,7%)	3-46 (4,5)
K-/V-	7/14 (50,0%)	1-184 (19,1)

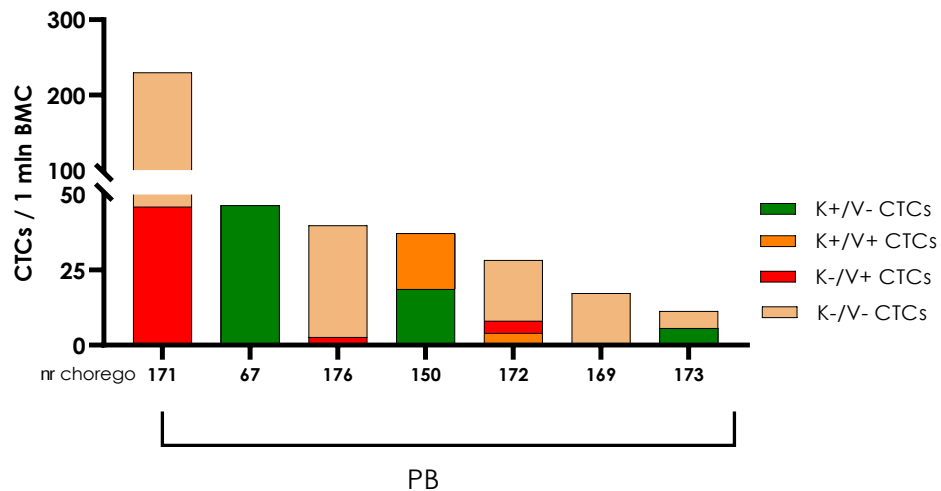
Określono fenotyp dominujący wśród chorych z pRGK. Fenotyp epitelialny występował jako dominujący u 18,8% (n=3/16), a fenotyp związany z EMT u 56,2% (n=9/16), natomiast fenotyp heterogeny u 12,5% (n=2/16) chorych z pRGK (**Ryc. 17**). Warto zauważyć, że w PB u chorych z pRGK zaobserwowano przewagę fenotypu EMT (tj. epitelialno-mezenchymalne, mezenchymalne i podwójnie negatywne CTCs; 56,2%), w porównaniu do chorych z mzRGK (tj. 9,4% w PB), lecz nie wykazano statystycznie znaczącej różnicy między tymi grupami ($\chi^2=1,551$; $p=0,213$).

Chorzy z pRGK (PB) - dominujący fenotyp



Rycina 17. Rozkład dominujących fenotypów CTCs w PB u chorych z pRGK (n=16). Fenotyp heterogenny, oznaczał występowanie CTCs o fenotypie epithelialnym i CTCs o fenotypie EMT w tej samej ilości; CTCs o fenotypie EMT, obejmowały CTCs epithelialno-mezenchymalne, mezenchymalne i podwójnie-negatywne. PB – krew obwodowa, CTCs – krążące komórki nowotworowe, pRGK – rak gruczołu krokowego z przerzutami.

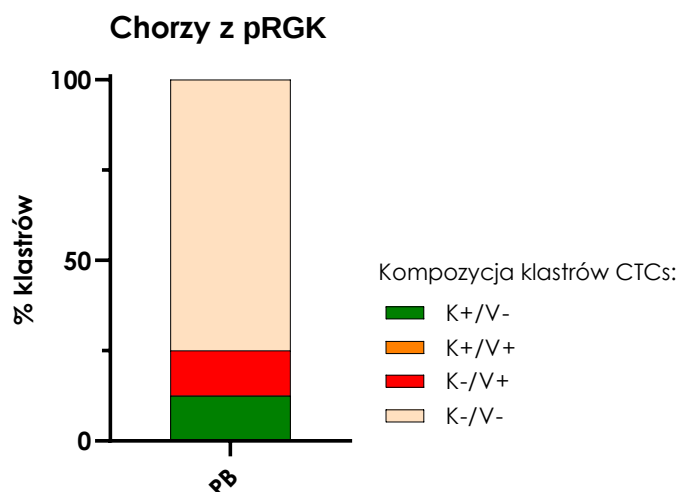
U chorych z pRGK również obserwowano heterogenność fenotypową CTCs, jednak wystąpiła ona jedynie w 35,7% przypadków i była ona dużo niższa niż heterogenność oznaczona u CTCs-pozytywnych chorych z mRGK (tj. 75,0%, $\chi^2=5,247$, $p=0,022$). Rozkład różnych fenotypów u poszczególnych chorych z liczbą CTCs $\geq 10/1\text{mln BMCs}$ zaprezentowano na **Rycinie 18**.



Rycina 18. Liczba i fenotypy CTC u chorych pRGK z ≥ 10 CTCs/ 1mln BMCs. CTCs – krążące komórki nowotworowe, K - keratyna, V – wimentyna, BMCs – jednojądrzaste komórki krwi.

8.2.6 Klastry CTCs w PB u chorych z pRGK

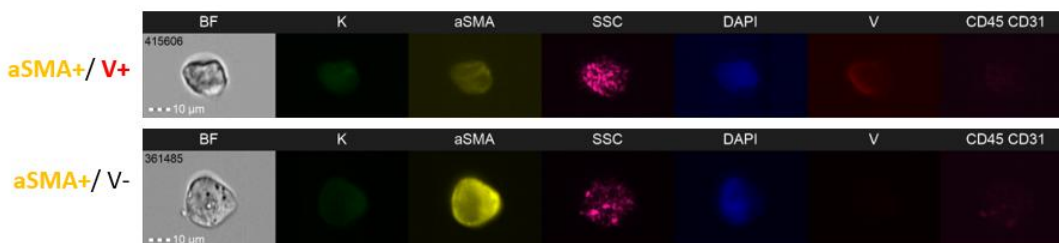
W próbkach od chorych z pRGK klastry CTCs wystąpiły u 31,3% (n=5/16) (2-46 klastrow CTCs / 1 mln BMCs) chorych. Wykryto klastry składające się z CTCs tylko epitelialnych (12,5%), tylko mezenchymalnych (12,5%) lub tylko podwójnie-negatywnych (75% przypadków) nie zidentyfikowano klastrow o mieszanej kompozycji różnych fenotypów, ani żadnego klastra o fenotypie epitelialno-mezenchymalnym (**Ryc. 19**).



Rycina 19. Procentowy udział poszczególnych fenotypów CTCs w klastrach w PB od CTCs-pozytywnych chorych z pRGK. CTCs – krążące komórki nowotworowe, PB – krew obwodowa, K – keratyna, V – wimentyna, pRGK – rak gruczołu krokowego z przerzutami.

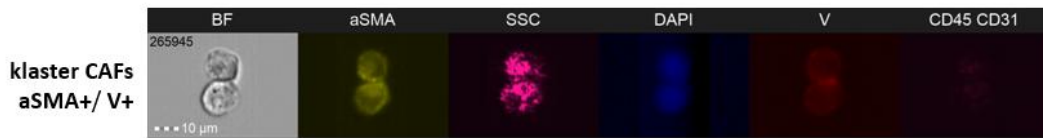
8.2.7 Pojedyncze i klastry cCAFs

Z kolei, cCAFs (tj. krążące fibroblasty związane z nowotworem) w odróżnieniu od CTCs występowały u chorych bardzo rzadko: w TDVB nie wykryto ani jednej komórki o takim fenotypie, zaś w PB wykryto je u 2 chorych z mRGK (1,9%, w liczbie 44,79-59,30 cCAFs/ 1mln BMCs). Wykryte cCAFs charakteryzowały dwa fenotypy: K-/αSMA+/V+/CD45&CD31- i K-/αSMA+/V-/CD45&CD31- (**Ryc. 20**) i współwystępowały zawsze z CTCs.



Rycina 20. Reprezentatywne fotografie przedstawiające dwa identyfikowane w mRGK fenotypy cCAFs, tj. αSMA+/V+ i αSMA+/V-. BF - jasne pole; K – pan-keratyna; αSMA – alfa aktyna mięśni gładkich, SSC – rozproszenie boczne, DAPI – jądro komórkowe, V – wimentyna, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłónka. Zdjęcia wykonano w powiększeniu 40x, Amnis® ImageStream®X Mk II (Cytex).

W PB, oprócz klastrów CTCs, u jednego chorego wykryto również jeden klaster CAFs o fenotypie α SMA+/V+/CD45&CD31- (**Ryc. 21**).



Rycina 21. Fotografia przedstawiająca klaster dwóch cCAFs. BF – jasne pole; α SMA – alfa aktyna mięśni gładkich; SSC – rozproszenie boczne, DAPI – jądro komórkowe, V – wimentyna, CD45/CD31 – marker leukocytów/krążących komórek śródbłónka. Zdjęcia wykonano obiektywem o powiększeniu 40x, Amnis® ImageStream® Mk II (Cyttek).

U chorych z pRGK nie zidentyfikowano żadnej komórki cCAFs.

Podsumowanie Wyników 8.1 i 8.2

Chorzy z mZRGK

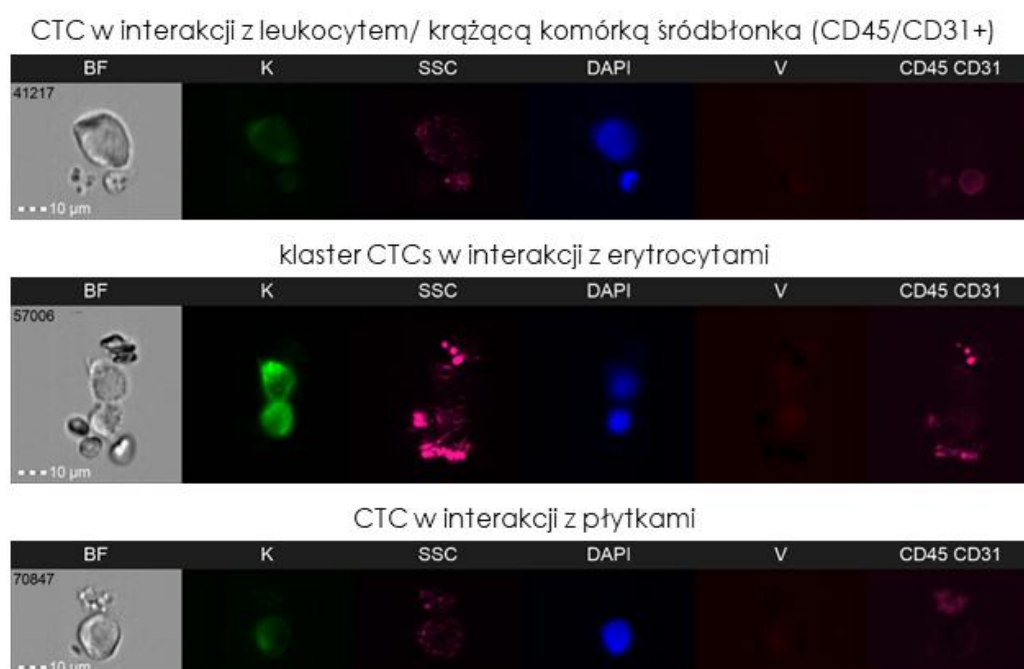
- Pojedyncze CTCs i klastry CTCs identyfikowano istotnie częściej i w większej liczbie w TDVB niż w PB (pojedyncze oraz klastry).
- Dominujący fenotyp CTCs wykrywany w TDVB to epitelialny, a w PB fenotyp związany z EMT.

Chorzy z pRGK

- Prawie wszyscy chorzy byli pozytywni pod kątem CTCs, jednak ich liczba / 1 mln PBMC była znacznie mniejsza niż w przypadku chorych na mZRGK.
- Dominujący fenotyp CTCs to fenotyp związany z EMT.

8.3 Potencjalne interakcje CTCs z komórkami krwi w PB i TDVB

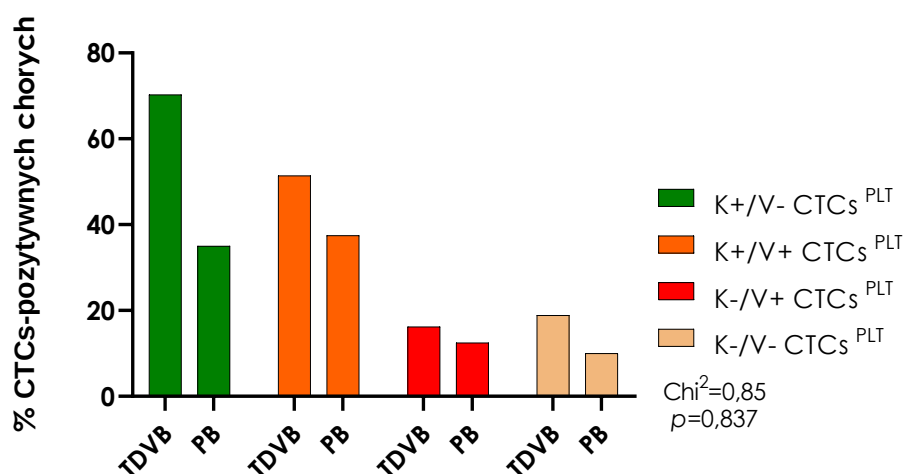
Na podstawie zdjęć CTCs w grupie chorych z mzRGK i pRGK uwidoczniono potencjalne interakcje pomiędzy CTCs a elementami morfotycznymi krwi, tworzącymi tzw. heterotypowe klastry CTCs. Wykryto 3 typy takich interakcji CTCs: z płytkami (CTCs^{PLT}), leukocytami/krążącymi komórkami śródbłónka (CTCs^{LEUKO}) i erytrocytami (CTCs^{ERYTRO}; **Ryc. 22**).



Rycina 22. Przykładowe zdjęcia przedstawiające CTCs w interakcjach z normalnymi komórkami krwi. BF - jasne pole; K – keratyna; SSC – rozproszenie boczne, DAPI – jądro komórkowe, V – wimentyna, CD45/CD31 – marker leukocytów/komórek śródbłónka. Zdjęcia wykonane obiektywem o powiększeniu 40x, Amnis® ImageStream®X Mk II (Cyttek).

Interakcje z płytkami zaobserwowano u 78,9% chorych w TDVB i 45,0% chorych CTC-pozytywnych w PB. Wszystkie fenotypy CTCs wykazywały interakcje z płytkami krwi. Najwięcej tych interakcji wśród CTCs-pozytywnych chorych z mzRGK, zaobserwowano w przypadku epitelialnych (70,3% w TDVB

i 35,0% w PB) i epitelialno-mezenchymalnych CTCs (51,4% w TDVB i 37,5% w PB), niewiele zaś w przypadku podwójnie negatywnych (18,9% w TDVB i 10,0% w PB) i mezenchymalnych CTCs (16,2% w TDVB i 12,5% w PB; **Ryc. 23**). Częstości występowania potencjalnych interakcji CTCs^{PLT} w TDVB i PB pod względem ich udziału w CTCs o różnych fenotypach, nie różniły się istotnie od siebie ($p=0,837$).



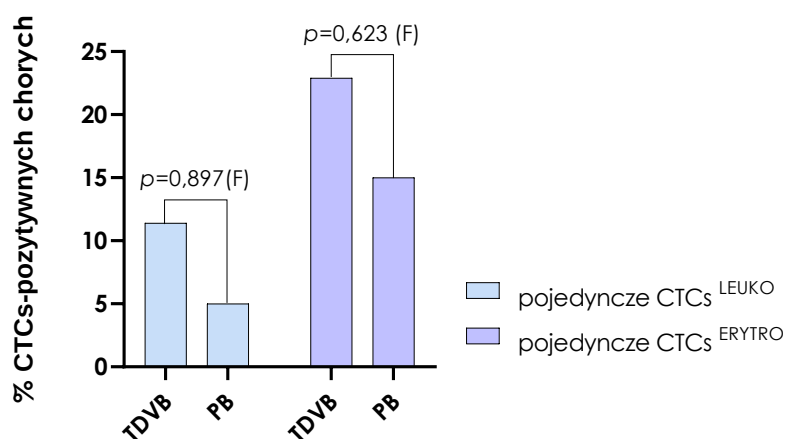
Rycina 23. Częstości występowania interakcji pojedynczych CTCs z płytkami (CTC^{PLT}) zaobserwowane w próbkach TDVB i PB u CTCs-pozytywnych chorych z mzRGK. Zakresy i średnie poszczególnych fenotypów zostały zestawione w tabeli. CTCs^{PLT} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z płytkami, K- keratyna, V - wimentyna, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

Dane dotyczące liczby wszystkich zaobserwowanych pojedynczych CTCs wchodzących w potencjalne interakcje z płytkami, które wykryto protokołem K/V zestawiono w **Tabeli 10**.

Tabela 10. Podsumowanie danych dotyczących fenotypów CTCs wchodzących w interakcje z płytkami w TDVB i PB w przeliczeniu na 1 mln BMC. CTCs^{PLT} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z płytkami, K- keratyna, V – wimentyna, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

CTCs ^{PLT}	TDVB	PB
	zakres (średnia)	zakres (średnia)
K+/V-	1-354 (26,5)	1-352 (7,3)
K+/V+	1-170 (7,4)	2-426 (6,1)
K-/V+	1-39 (0,9)	1-20 (0,4)
K-/V-	4-318 (7,1)	3-16 (0,3)

Potencjalne interakcje pojedynczych CTCs z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna (ze względu na wielkość tych komórek, których średnica nie przekraczała 8,79 μ m, raczej z dużym prawdopodobieństwem wyłącznie leukocytami) występowały bardzo nielicznie u chorych z mZRGK i były nieobecne u chorych z pRGK. Zaobserwowano występowanie CTCs^{LEUKO} u 11,4% (n=4/35) chorych w TDVB i 5,0% (n=1/20) chorych CTC-pozytywnych w PB z mZRGK. Interakcje pojedynczych CTCs z erytrocytami zidentyfikowano u 22,9% (n=8/35) chorych w TDVB i 15,0% (n=3/20) chorych CTC-pozytywnych w PB (**Ryc. 24**).



Rycina 24. Interakcje pojedynczych CTCs z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna (pojedyncze CTC^{LEUKO}) i erytrocytami (pojedyncze CTC^{ERYTRO}) zaobserwowane CTCs-pozytywnych chorych z mZRGK. CTCs^{LEUKO} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z leukocytami/komórkami śródbłonna, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

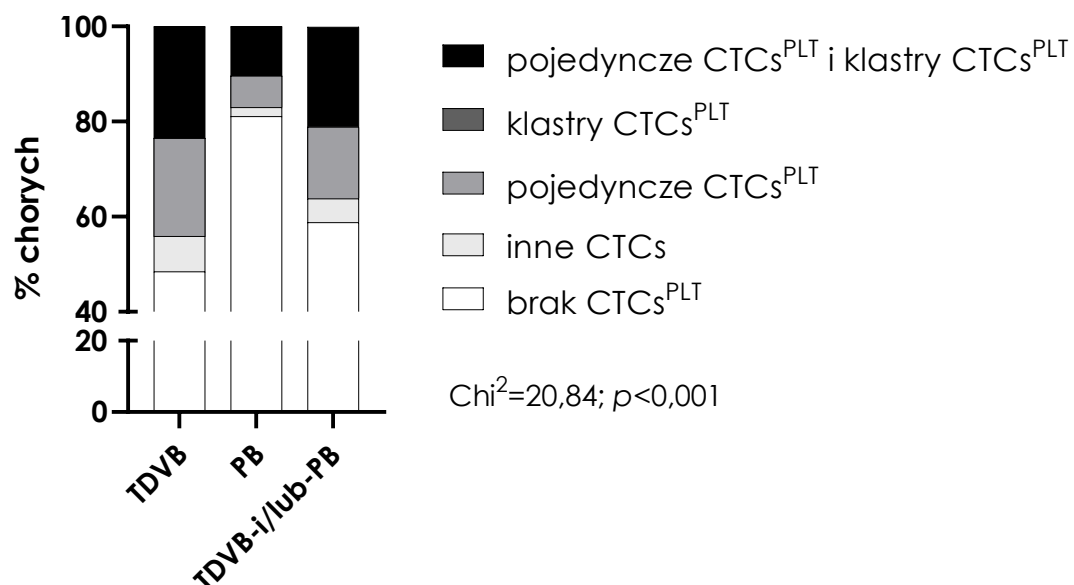
Warto dodać, że oba typy interakcji CTCs^{LEUKO} i CTCs^{ERYTRO} obserwowano głównie w interakcjach z epitelialnymi CTCs. Liczby CTCs wchodzących w interakcji z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonka i erytrocytami zestawiono w **Tabeli 11**.

Tabela 11. Podsumowanie danych dotyczących liczb interakcji CTCs z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonka i erytrocytami w TDVB i PB/ 1 mln BMC. CTCs^{LEUKO} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonka, CTCs^{ERYTRO} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z erytrocytami, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

Interakcje	TDVB	PB
	zakres (średnia)	zakres (średnia)
CTCs ^{LEUKO}	3-82 (1,6)	1-5 (0,1)
CTCs ^{ERYTRO}	2-147 (3,6)	1-10 (0,2)

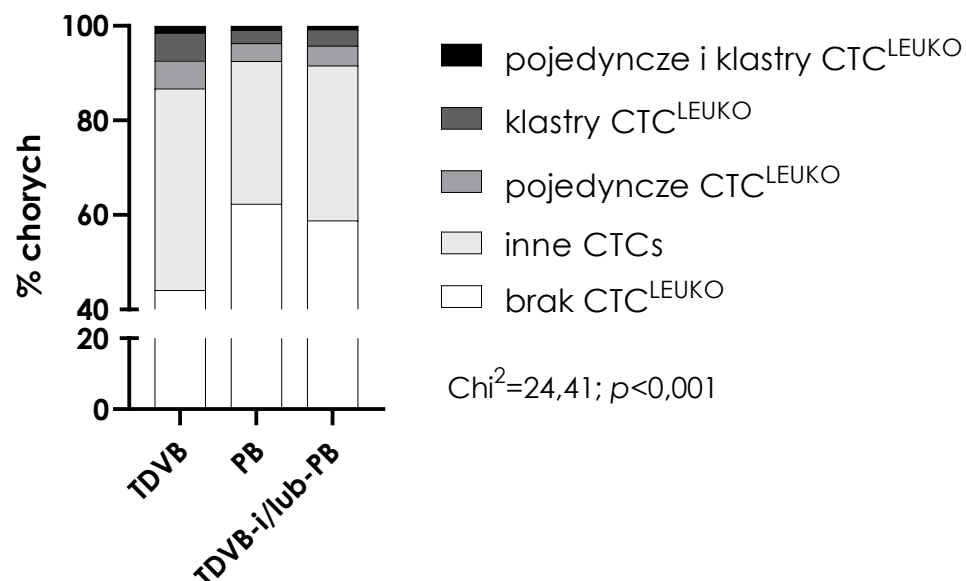
Oprócz interakcji pojedynczych CTCs z erytrocytami, leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonka i płytkami, uwidoczniono również klastry CTCs wchodzące w takie same interakcje (klastry CTCs^{PLT}, klastry CTCs^{LEUKO}, klastry CTCs^{ERYTRO}). Oceniono je w trzech grupach chorych z mZRGK– TDVB (n=68), PB (n=106) i w całej kohorcie TDVB i/lub PB (n=106), obejmującej wszystkie analizowane próbki. W próbkach klinicznych oznaczono brak CTCs, występowanie CTCs (bez interakcji), występowanie pojedynczych CTCs wchodzących w interakcje, klastrów CTCs wchodzących w interakcje, a także obecność pojedynczych- i klastrów CTCs wchodzących w interakcje. Dane zaprezentowano na wykresach przedstawiających interakcje CTCs^{PLT} (**Ryc. 25**), CTCs^{LEUKO} (**Ryc. 26**) i CTCs^{ERYTRO} (**Ryc. 27**).

Klastry CTCs w interakcji z płytkami krwi obserwowano w 20,6% vs 6,6% vs 15,1% w przypadku pojedynczych CTCs^{PLT}, odpowiednio w grupie TDVB, PB i TDVB i/lub PB. Jeśli identyfikowano klastry CTCs^{PLT}, zawsze współwystępowały z nimi też pojedyncze CTCs^{PLT}. Otrzymane wyniki wskazują na to, że istotnie różniły się rozkłady występowania interakcji klastrów CTCs z płytkami: było ich więcej w TDVB w porównaniu do PB (p<0,001) (**Ryc. 25**).



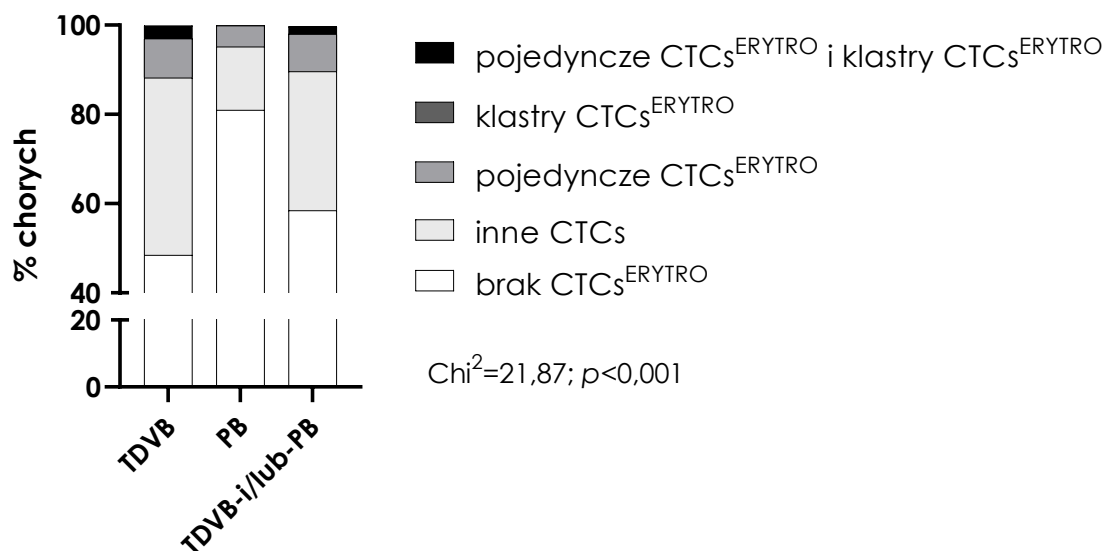
Rycina 25. Częstości występowania różnych form CTCs w interakcjach z płytkami krwi w TDVB, PB i wszystkich próbkach (TDVB i/lub PB) pobranych od chorych z mzRGK. Testy Chi² zostały policzone na podstawie danych z TDVB i PB przy użyciu internetowego kalkulatora Chi². CTCs^{PLT} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z płytkami, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

Kolejno, interakcje CTCs z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna obserwowano w 5,9% vs 3,8% vs 4,2% w przypadku pojedynczych CTCs^{LEUKO}, odpowiednio w grupie TDVB, PB i TDVB i/lub PB. Z kolei w przypadku klastrów CTCs^{LEUKO} obserwowano je w 5,9% vs. 2,8% vs. 3,4% , w grupie w TDVB, PB i TDVB i/lub PB (**Ryc. 26**). W TDVB również częściej identyfikowano potencjalne interakcje CTCs z leukocytami/komórkami śródbłonna, w porównaniu z PB.



Rycina 26. Częstości występowania różnych form CTCs w interakcjach z leukocytami/komórkami śródbłonka w TDVB, PB i wszystkich próbkach (TDVB i/lub PB) pobranych od chorych z mZRGK. Testy Chi² zostały policzone na podstawie danych z TDVB i PB przy użyciu internetowego kalkulatora Chi². CTCs^{LEUKO} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonka, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

Natomiast potencjalne interakcje CTCs z erytrocytami (**Ryc. 27**) obserwowano w 8,8% vs 4,7% vs 8,4% pojedynczych CTCs^{ERYTRO}, odpowiednio w grupie TDVB, PB i TDVB i/lub PB. Co ciekawe nie obserwowano samych klastrów CTCs^{ERYTRO} u poszczególnych chorych, współwystępowały zawsze z pojedynczymi CTCs^{ERYTRO}. W tym przypadku również w TDVB częściej obserwowano interakcje z erytrocytami w porównaniu do PB.



Rycina 27. Częstości występowania różnych form CTCs w interakcjach z erytrocytami w TDVB, PB i wszystkich próbkach (TDVB i/lub PB) pobranych od chorych z mzRGK. Testy Chi² zostały policzone na podstawie danych z TDVB i PB przy użyciu internetowego kalkulatora Chi². CTCs^{ERYTRO} - krążące komórki nowotworowe w interakcji z erytrocytami, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

Podsumowanie Wyników 8.3

- Zidentyfikowano potencjalne interakcje CTCs z leukocytami, płytkami i z erytrocytami.
- W interakcje z płytkami najczęściej wchodziły epitelialne i epitelialno-mezenchymalne CTCs, natomiast z leukocytami i erytrocytami – epitelialne CTCs.
- Pojedyncze i klastry CTCs^{PLT} występowały głównie w TDVB.

8.4 Znaczenie kliniczne CTCs w PB i TDVB

Obecność, stopień sklastrowania, fenotyp CTCs oraz ich interakcje z komórkami normalnymi oznaczone w TDVB, PB oraz TDVB i/lub PB porównywano z danymi kliniczno-patologicznymi.

Obecność CTCs oznaczonych tylko w TDVB lub tylko w PB nie korelowała z wiekiem, statusem pT, pN, przedoperacyjnym stężeniem PSA, a także skalą d'Amico. Obecność CTC oznaczonych w TDVB i/lub PB była statystycznie istotnie związana z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu w skali Gleasona ($p=0,046$, **Tabela 12**).

Tabela 12. Korelacje obecności CTCs z czynnikami kliniczno-patologicznymi analizowane testem Chi² Pearsona, testem Fishera (F) lub Mantel-Haenszel (L). prePSA – przedoperacyjne stężenie PSA. T – wielkość guza pierwotnego, N – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe.

		wszystkie CTCs w TDVB			wszystkie CTCs w PB			wszystkie CTCs w TDVB i/lub PB		
		brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p
		n / %	n / %		n / %	n / %		n / %	n / %	
wiek	<65	11 / 42%	15 / 58%	0,309	31 / 82%	7 / 18%	1 (F)	24 / 54%	20 / 46%	0,233
	≥65	21 / 55%	17 / 45%		54 / 81%	13 / 19%		46 / 66%	24 / 34%	
status T	pT2a	2 / 100%	0	0,059 (L)	4 / 67%	2 / 33%	0,836	4 / 67%	2 / 33%	0,655
	pT2b	2 / 67%	1 / 33%		3 / 100%	0		3 / 75%	1 / 25%	
	pT2c	11 / 50%	11 / 50%		33 / 82%	7 / 18%		29 / 64%	16 / 36%	
	pT3a	12 / 46%	14 / 54%		30 / 83%	6 / 17%		24 / 60%	16 / 40%	
	pT3b	2 / 25%	6 / 75%		10 / 77%	3 / 23%		6 / 40%	9 / 60%	
	pT3c	0	0		1 / 100%	0		1 / 100%	0	
status N	pN0	30 / 51%	29 / 49%	1 (F)	76 / 81%	18 / 19%	1 (F)	63 / 61%	40 / 39%	1 (F)
	pN1	2 / 50%	2 / 50%		7 / 87%	1 / 13%		6 / 67%	3 / 33%	
skala Gleasona	3+4	8 / 40%	12 / 60%	0,486	23 / 79%	6 / 21%	0,061	17 / 51%	16 / 49%	0,046
	4+3	16 / 59%	11 / 41%		37 / 86%	6 / 14%		35 / 71%	14 / 29%	
	8	4 / 67%	2 / 33%		15 / 88%	2 / 12%		13 / 76%	4 / 24%	
	9	4 / 44%	5 / 56%		7 / 54%	6 / 46%		5 / 38%	8 / 62%	
prePSA	<10	20 / 51%	19 / 49%	0,685	56 / 79%	15 / 21%	0,597	48 / 64%	27 / 36%	0,346
	≥10	12 / 46%	14 / 54%		29 / 85%	5 / 15%		22 / 55%	18 / 45%	
skala ryzyka d'Amico	średnie	7 / 70%	3 / 30%	0,180 (F)	11 / 79%	3 / 21%	0,728	11 / 69%	5 / 31%	0,586 (F)
	wysokie	25 / 45%	31 / 55%		74 / 81%	17 / 19%		59 / 59%	41 / 41%	

Co więcej, pojedyncze CTC i klastry CTC nie wykazały statystycznie istotnego związku z badanymi wskaźnikami klinicznymi i wiekiem chorych niezależnie od rodzaju próbek krwi, w których zostały wykryte, choć pojedyncze CTCs wykryte w TDVB oraz PB pojawiły się częściej u – odpowiednio – chorych z wyższym stopniem pT ($p=0,056$) oraz z wyższym stopniem zaawansowania w saski Gleasona ($p=0,061$, **Tabela 13**).

Tabela 13. Korelacje obecności pojedynczych CTCs i klastrów CTCs z czynnikami kliniczno-patologicznymi analizowane testem Chi² Pearsona lub testem Fishera (F) lub Mantel-Haenszel (L). prePSA – przedoperacyjne stężenie PSA, T – wielkość guza pierwotnego, N – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe.

		pojedyncze CTCs w TDVB			klastry CTCs w TDVB			pojedyncze CTCs w PB			klastry CTCs w PB		
		brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p
		n / %	n / %		n / %	n / %		n / %	n / %		n / %	n / %	
wiek	<65	11 / 42%	15 / 58%	0,362	18 / 69%	8 / 31%	1 (F)	31 / 82%	7 / 18%	0,902	34 / 89%	4 / 11%	1 (F)
	≥65	21 / 54%	18 / 46%		28 / 72%	11 / 28%		54 / 81%	13 / 19%		60 / 89%	7 / 10%	
status T	pT2a	2 / 100%	0	0,052 (L)	2 / 100%	0	0,460	4 / 67%	2 / 33%	0,836	5 / 83%	1 / 17%	0,939
	pT2b	62 / 67%	1 / 33%		3 / 100%	0		3 / 100%	0		3 / 100%	0	
	pT2c	11 / 50%	11 / 50%		16 / 73%	6 / 27%		33 / 82%	7 / 18%		36 / 90%	4 / 10%	
	pT3a	12 / 44%	15 / 56%		16 / 59%	11 / 41%		10 / 77%	6 / 17%		33 / 92%	3 / 8%	
	pT3b	2 / 25%	6 / 75%		5 / 62%	3 / 38%		1 / 100%	0		11 / 85%	2 / 15%	
	pT3c	-	-		-	-		1 / 100%	0		1 / 100%	0	
status N	pN0	30 / 51%	29 / 49%	1 (F)	42 / 71%	17 / 29%	0,171 (F)	76 / 81%	18 / 19%	1 (F)	85 / 90%	9 / 10%	0,576 (F)
	pN1	2 / 40%	3 / 60%		2 / 40%	3 / 60%		7 / 87%	1 / 13%		7 / 87%	1 / 13%	
skala Gleasona	3+4	8 / 40%	12 / 60%	0,580	13 / 65%	7 / 35%	0,739	23 / 79%	6 / 21%	0,061	23 / 79%	6 / 21%	0,245
	4+3	16 / 59%	11 / 41%		20 / 74%	7 / 26%		37 / 86%	6 / 14%		40 / 93%	3 / 7%	
	8	4 / 57%	3 / 43%		4 / 57%	3 / 43%		15 / 88%	2 / 12%		16 / 94%	1 / 6%	
	9	4 / 44%	5 / 56%		7 / 78%	2 / 22%		7 / 54%	6 / 46%		12 / 92%	1 / 8%	
prePSA	<10	20 / 51%	19 / 49%	0,585	28 / 72%	11 / 28%	0,786 (F)	56 / 79%	15 / 21%	0,433	62 / 87%	9 / 13%	0,497
	≥10	12 / 44%	15 / 57%		18 / 67%	9 / 33%		29 / 85%	5 / 15%		32 / 94%	2 / 6%	
skala ryzyka d'Amico	średnie	7 / 70%	3 / 30%	0,175 (F)	9 / 90%	1 / 10%	0,153 (F)	11 / 79%	3 / 21%	0,807	13 / 93%	1 / 7%	0,662
	wysokie	25 / 44%	32 / 56%		37 / 65%	20 / 35%		74 / 81%	17 / 19%		81 / 89%	10 / 11%	

Nie obserwowano również korelacji pomiędzy obecnością epitelialnych CTCs, ani CTCs związanych z EMT CTCs, a większością cech kliniczno-patologicznych. Jedynie w grupie EMT CTCs wykrytych w PB, częściej występował najwyższy stopień zaawansowania w skali Gleasona ($p=0,009$, **Tabela 14**).

Tabela 14. Korelacje obecności epitelialnych CTC (epi CTCs) i CTCs związanych z EMT (EMT-related CTCs) z czynnikami kliniczno-patologicznymi analizowane testem Chi² Pearsona lub testem Fishera (F). prePSA – przedoperacyjne stężenie PSA, T – wielkość guza pierwotnego, N – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe.

		epi CTCs w TDVB			EMT-related CTCs w TDVB			epi CTCs w PB			EMT-related CTCs w PB		
		brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p	brak CTCs	CTCs	wartość p
		n / %	n / %		n / %	n / %		n / %	n / %		n / %	n / %	
wiek	<65	14 / 54%	12 / 46%	0,683	13 / 50%	13 / 50%	0,476	33 / 87%	5 / 13%	0,804	32 / 84%	6 / 16%	1 (F)
	≥65	23 / 59%	16 / 41%		23 / 59%	16 / 41%		57 / 85%	10 / 15%		56 / 84%	11 / 16 %	
status T	pT2a	2 / 100%	0	0,593	2 / 100%	0	0,533	4 / 67%	2 / 33%	0,600	4 / 67%	3 / 33%	0,710
	pT2b	2 / 67%	1 / 33%		2 / 67%	1 / 33%		3 / 100%	0		3 / 100%	0	
	pT2c	12 / 54%	10 / 46%		13 / 59%	9 / 41%		34 / 85%	6 / 15%		35 / 87%	5 / 13%	
	pT3a	15 / 56%	12 / 44%		12 / 44%	15 / 56%		33 / 92%	3 / 8%		30 / 83%	6 / 17%	
	pT3b	3 / 37%	5 / 63%		4 / 50%	4 / 50%		11 / 85%	2 / 15%		10 / 77%	3 / 23%	
	pT3c	-	-		-	-		1 / 100%	0		1 / 100%	0	
status N	pN0	35 / 59%	24 / 41%	0,642	33 / 56%	26 / 44%	0,651 (F)	81 / 86%	13 / 14%	1 (F)	79 / 84%	15 / 16%	1 (F)
	pN1	2 / 40%	3 / 60%		2 / 40%	3 / 60%		7 / 87%	1 / 13%		7 / 87%	1 / 13%	
skala Gleasona	3+4	10 / 50%	10 / 50%	0,711	8 / 40%	12 / 60%	0,478	23 / 79%	6 / 21%	0,688	23 / 79%	6 / 21%	0,009
	4+3	18 / 67%	9 / 33%		17 / 63%	10 / 37%		37 / 86%	6 / 14%		39 / 91%	4 / 9%	
	8	4 / 57%	3 / 43%		4 / 57%	3 / 43%		15 / 88%	2 / 12%		16 / 94%	1 / 6%	
	9	5 / 56%	4 / 44%		5 / 56%	4 / 44%		12 / 92%	1 / 8%		7 / 54%	6 / 46%	
prePSA	<10	23 / 59%	16 / 41%	0,566	21 / 54%	18 / 46%	0,891	59 / 83%	12 / 17%	0,376	59 / 83%	12 / 17%	0,775
	≥10	14 / 52%	13 / 48%		15 / 56%	12 / 44%		31 / 91%	3 / 9%		29 / 85%	5 / 15%	
skala ryzyka d'Amico	średnie	30 / 53%	27 / 47%	0,493	7 / 70%	3 / 30%	0,320 (F)	11 / 79%	3 / 21%	0,418 (F)	12 / 86%	2 / 14%	1 (F)
	wysokie	7 / 70%	3 / 30%		29 / 51%	28 / 49%		79 / 87%	12 / 13%		76 / 83%	15 / 17%	

W przypadku interakcji normalnych komórek krwi z CTCs wzięto pod uwagę interakcje z pojedynczymi CTCs lub ich klastrami (**Tabela 15**). CTCs w interakcji z erytrocytami w TDVB i/lub PB obserwowano statycznie częściej u chorych z zajęтыми węzłami chłonnymi niż u chorych z wolnymi węzłami chłonnymi (33% vs 8%, $p=0,041$).

Tabela 15. Korelacje obecności pojedynczych CTCs w interakcjach z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna, erytrocytami i płytkami w TDVB i/lub PB z danymi kliniczno-patologicznymi analizowane testem Chi² Pearsona lub testem Fishera (F). prePSA – przedoperacyjne stężenie PSA, T – wielkość guza pierwotnego, N – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe.

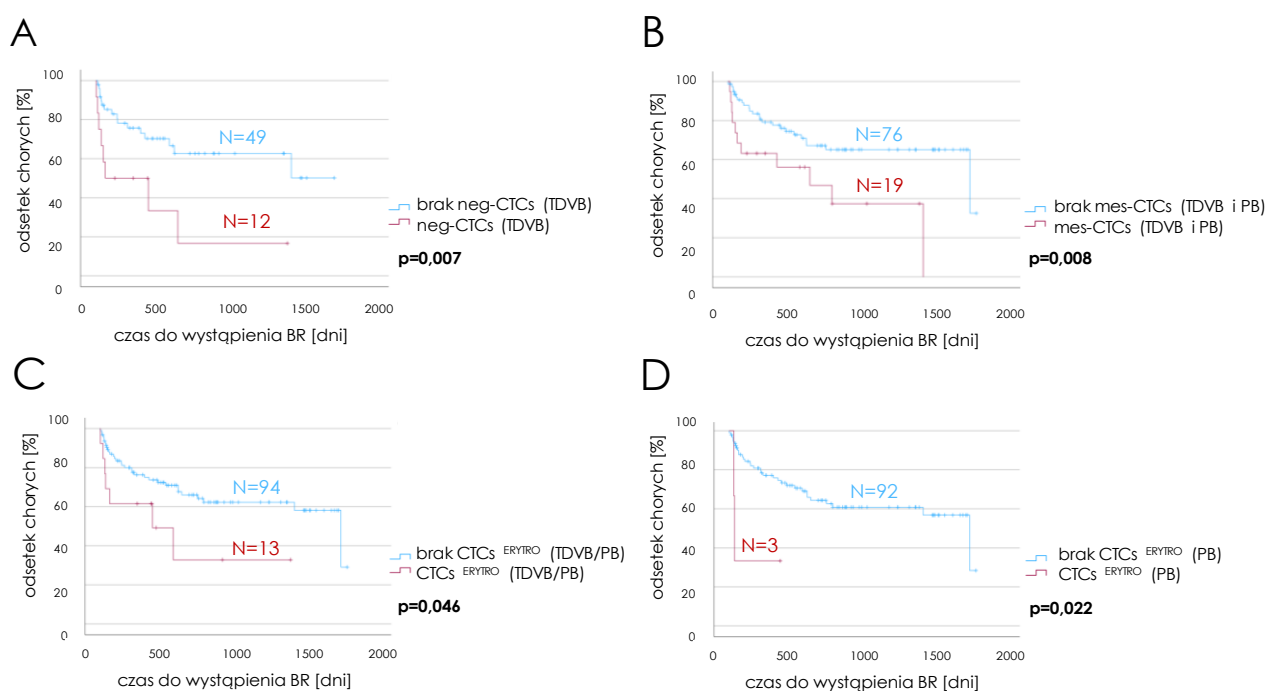
		pojedyncze CTCs łączące się z leukocytami / komórkami endotelialnymi w TDVB i/lub PB			pojedyncze CTCs łączące się z erytrocytami w TDVB i/lub PB			pojedyncze CTCs łączące się z płytkami w TDVB i/lub PB		
		brak CTCs n / %	CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	CTCs n / %	wartość p
wiek	<65	43 / 96%	2 / 4%		41 / 91%	4 / 9%		28 / 62%	17 / 38%	
	≥65	66 / 94%	4 / 6%	1 (F)	63 / 89%	8 / 11%	0,764 (F)	48 / 68%	23 / 32%	0,555
status T	pT2a	6 / 100%	0		6 / 100%	0		4 / 67%	2 / 33%	
	pT2b	4 / 100%	0		4 / 100%	0		3 / 75%	1 / 25%	
	pT2c	44 / 96%	2 / 4%		42 / 91%	4 / 9%		31 / 67%	15 / 33%	
	pT3a	38 / 95%	2 / 5%		37 / 90%	4 / 10%		26 / 63%	15 / 37%	
	pT3b	13 / 93%	1 / 7%		11 / 79%	3 / 21%		8 / 57%	6 / 43%	
	pT3c	1 / 100%	0	0,979	1 / 100%	0	0,640	1 / 100%	0	0,939
status N	pN0	100 / 96%	4 / 4%		97 / 92%	8 / 8%		68 / 65%	37 / 35%	
	pN1	8 / 89%	1 / 11%	0,345 (F)	6 / 67%	3 / 33%	0,041 (F)	6 / 67%	3 / 33%	1 (F)
skala Gleasona	3+4	32 / 94%	2 / 6%		29 / 85%	5 / 15%		19 / 56%	15 / 44%	
	4+3	47 / 96%	2 / 4%		46 / 92%	4 / 8%		36 / 72%	14 / 28%	
	8	15 / 88%	2 / 12%		16 / 94%	1 / 6%		13 / 77%	4 / 23%	
	9	13 / 100%	0	0,511	11 / 85%	2 / 15%	0,640	7 / 54%	6 / 46%	0,259
prePSA	<10	70 / 95%	4 / 5%		65 / 87%	10 / 13%		50 / 67%	25 / 33%	
	≥10	40 / 95%	2 / 5%	1 (F)	40 / 95%	2 / 5%	0,207 (F)	26 / 62%	16 / 38%	0,687
skala ryzyka d'Amico	średnie	15 / 94%	1 / 6%		15 / 94%	1 / 6%		11 / 69%	5 / 31%	
	wysokie	96 / 95%	5 / 5%	1 (F)	91 / 89%	11 / 11%	1 (F)	65 / 64%	37 / 36%	0,785

Obecność klastrow CTCs w interakcjach z normalnymi komórkami krwi wykrytych w TDVB lub PB nie korelowała z żadnymi czynnikami kliniko-patologicznymi (**Tabela 16**).

Tabela 16. Korelacje obecności klastrow CTCs w interakcjach z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna, erytrocytami i płytkami w TDVB i/lub PB z danymi kliniczno-patologicznymi analizowane testem Chi² Pearsona lub testem Fishera (F). prePSA – przedoperacyjne stężenie PSA, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe.

		klastry CTCs łączące się z leukocytami / komórkami endotelialnymi w TDVB i/lub PB			klastry CTCs łączące się z erytrocytami w TDVB i/lub PB			klastry CTCs łączące się z płytkami w TDVB i/lub PB		
		brak CTCs n / %	CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	CTCs n / %	wartość p
wiek	<65	44 / 98%	1 / 2%		44 / 98%	1 / 2%		36 / 82%	8 / 18%	
	≥65	67 / 94%	4 / 6%	0,647 (F)	70 / 99%	1 / 1%	1 (F)	55 / 79%	15 / 21%	0,812 (F)
status T	pT2a	6 / 100%	0		6 / 100%	0		5 / 83%	1 / 17%	
	pT2b	4 / 100%	0		4 / 100%	0		4 / 100%	0	
	pT2c	43 / 94%	3 / 6%		45 / 98%	1 / 2%		36 / 80%	9 / 20%	
	pT3a	40 / 98%	1 / 2%		40 / 98%	1 / 2%		32 / 80%	8 / 20%	
	pT3b	14 / 100%	0		14 / 100%	0		9 / 64%	5 / 36%	
	pT3c	1 / 100%	0	0,815	1 / 100%	0	0,988	1 / 100%	0	0,656
status N	pN0	101 / 96%	4 / 4%		103 / 98%	2 / 2%		84 / 82%	19 / 18%	
	pN1	9 / 100%	0	1 (F)	9 / 100%	0	1 (F)	5 / 56%	4 / 44%	0,084 (F)
skala Gleasona	3+4	31 / 91%	3 / 9%		32 / 94%	2 / 6%		23 / 68%	11 / 32%	
	4+3	50 / 100%	0		50 / 100%	0		41 / 85%	7 / 15%	
	8	15 / 88%	2 / 12%		17 / 100%	0		13 / 77%	4 / 23%	
	9	13 / 100%	0	0,082	13 / 100%	0	0,188	11 / 85%	2 / 15%	0,254
prePSA	<10	72 / 96%	3 / 4%		73 / 97%	2 / 3%		58 / 78%	16 / 22%	
	≥10	40 / 95%	2 / 5%	1 (F)	42 / 100%	0	0,536 (F)	33 / 81%	8 / 19%	1 (F)
skala ryzyka d'Amico	średnie	14 / 88%	2 / 12%		16 / 100%	0		15 / 94%	1 / 6%	
	wysokie	99 / 97%	3 / 3%	0,135 (F)	100 / 98%	2 / 2%	1 (F)	76 / 76%	24 / 24%	0,187 (F)

Przeprowadzone przy pomocy testu log-rank analizy przeżycia wykazały, że obecność podwójnie-negatywnych CTCs w TDVB ($p=0,007$, **Ryc. 28A**) i obecność mezenchymalnych CTCs w TDVB i/lub PB ($p=0,008$, **Ryc. 28B**) korelowały z krótszym czasem do wystąpienia BR po zabiegu. Dodatkowo, CTCs w interakcjach z erytrocytami w całej grupie TDVB i/lub PB ($p=0,046$ **Ryc. 28C**) i tylko w PB ($p=0,022$, **Ryc. 28D**) również korelowały z krótszym czasem do wystąpienia BR.



Rycina 28. Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera przedstawiające czas przeżycia wolnego od wznowy biochemicznej u chorych z *mzRGK* w zależności od obecności podwójnie-negatywnych CTCs w TDVB ($p=0,007$; A), mezenchymalnych CTCs w TDVB i/lub PB ($p=0,008$; B), CTCs w interakcjach z erytrocytami w TDVB i/lub PB ($p=0,046$; C), CTCs w interakcjach z erytrocytami w PB ($p=0,022$; D). Analizy przeżycia przeprowadzono za pomocą testu log-rank.

Ze względu na częste współwystępowanie różnych form i fenotypów CTCs, przez trudności w identyfikacji ich rzeczywistego wpływu na progresję choroby, przeprowadzono analizę wieloczynnikową w kontekście wystąpienia BR, mającą na celu sprawdzenie znaczenia rokowniczego

wieku, stężenia PSA, statusu pT i pN, stopnia zaawansowania w skali Gleasona, obecności różnych fenotypów CTCs (K+/V-, K-/V+, K+/V+, K-/V-) i ich klastrow CTCs (**Tabela 17**, całą analizę metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa przedstawiono w **Tabeli U1**).

Tabela 17. Wynik końcowy metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w kontekście BR, obejmująca fenotypy CTCs. pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, K-V+ CTCs o fenotypie mezenchymalnym, HR – współczynnik ryzyka, 95%CI – 95% przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

	wartość p	HR	CI 95%	
			Dołny	Górny
status pN poz vs. neg	0,000	8,691	2,940	25,687
skala Gleasona >7 vs. 7	0,002	3,280	1,562	6,889
K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,000	6,700	2,708	16,577
klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,035	0,334	0,121	0,927

Obecność CTCs o fenotypie mezenchymalnym w TDVB i/lub PB ($p < 0,001$; HR 6,700; 95%CI 2,708-16,577), tak samo jak pN ($p < 0,001$; HR 8,691; 95% CI 2,940-25,687) i stopień zaawansowania w skali Gleasona ($p = 0,002$; HR 3,280; 95%CI 1,562-6,889) okazały się niezależnymi negatywnymi czynnikami prognostycznymi w kontekście wystąpienia BR. Natomiast obecność klastrow CTCs w TDVB i/lub PB ($p = 0,035$; HR 0,334; 95%CI 0,121-0,927) okazała się pozytywnym czynnikiem rokowniczym w kontekście BR w tej samej analizie.

W kolejnej analizie wieloczynnikowej w kontekście wystąpienia BR dedykowanej interakcjom CTC z komórkami krwi, brano pod uwagę wiek, stężenie PSA, status pT, pN, skalę Gleasona, klastry CTCs^{LEUKO}, pojedyncze CTCs^{LEUKO}, klastry CTCs^{ERYTRO}, pojedyncze CTCs^{ERYTRO}, klastry CTCs^{PLT} i pojedyncze CTCs^{PLT} (**Tabela 18**, całą analizę metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa przedstawiono w **Tabeli U2**).

Tabela 18. Wynik końcowy metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w kontekście BR, obejmującej interakcje CTCs z komórkami krwi, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs^{LEUKO} – CTCs w interakcji z leukocytami/komórkami śródbłonna, CTCs^{ERYTRO} – CTCs w interakcji z erytrocytami, CTCs^{PLT} – CTCs w interakcji z płytkami, HR – współczynnik ryzyka, 95%CI – 95% przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

	wartość p	HR	CI 95%	
			Dolny	Górny
status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,054	2,142	0,988	4,646
status pN poz vs. neg	0,004	5,410	1,698	17,232
skala Gleasona >7 vs. 7	0,006	2,929	1,363	6,291
klastry CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. Neg	0,130	0,194	0,023	1,624
pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,091	0,342	0,099	1,186
pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,003	3,643	1,565	8,480

Obecność pojedynczych CTCs^{PLT} w TDVB i/lub PB (p=0,003; HR 3,643; 95%CI 1,565-8,480), tak samo jak pN (p=0,004; HR 5,410; 95% CI 1,698-17,232) i stopień zaawansowania w skali Gleasona (p=0,006; HR 2,929; 95%CI 1,363-6,291) okazały się niezależnymi negatywnymi czynnikami prognostycznym w kontekście BR.

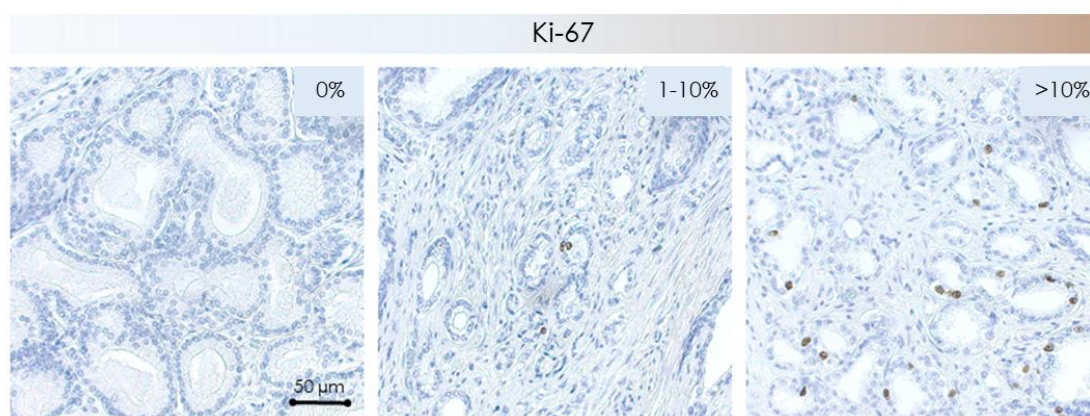
Podsumowanie Wyników 8.4

- Obecność podwójnie-negatywnych CTCs (w TDVB), mezenchymalnych CTCs (w całej grupie TDVB i/lub PB), CTCs^{ERYTRO} (w TDVB i/lub PB) oraz CTCs^{ERYTRO} (w PB) korelowała z krótszym czasem do wystąpienia BR.
- Analizy wieloczynnikowe dowiodły, że tylko obecność mezenchymalnych CTCs i pojedynczych CTCs^{PLT} (w całej grupie TDVB i/lub PB) była negatywnym czynnikiem rokowniczym w kontekście ryzyka wystąpienia BR.
- Obecność klastrów CTCs (w całej grupie TDVB i/lub PB) okazała się być pozytywnym czynnikiem prognostycznym w kontekście BR.

8.5 Korelacje fenotypów CTCs z białkami obecnymi w guzach pierwotnych

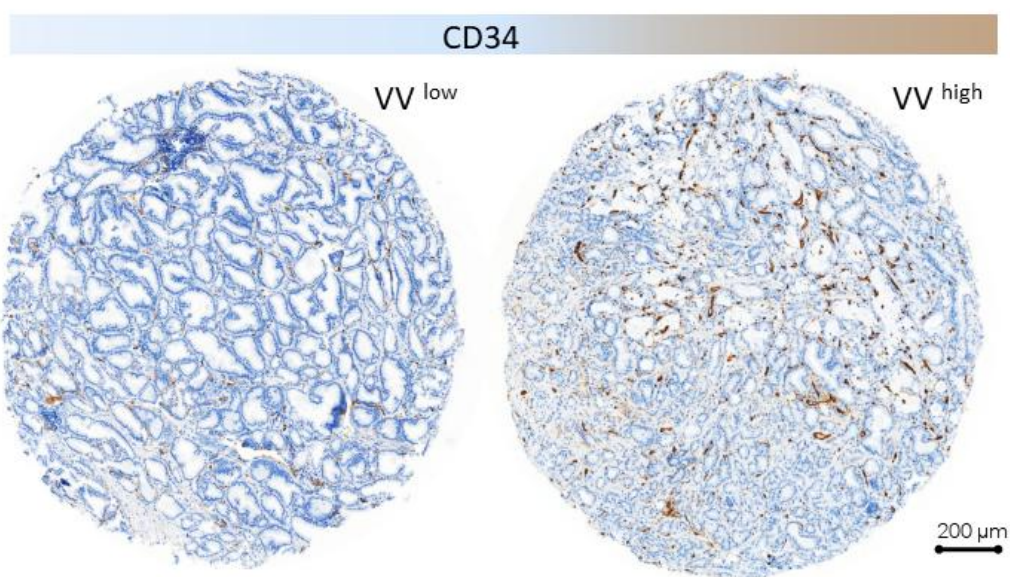
Mikromacierze tkankowe (**Metody 7.2**) zawierające fragmenty nowotworów od chorych z mZRGK wybarwiono immunohistochemicznie i immunofluorescencyjnie (**Metody 7.8 i 7.9**) w celu oznaczenia wybranych cech guzów pierwotnych, potencjalnie związanych z stopniem rozsiewu nowotworu, tj.: stopnia proliferacji komórek nowotworowych (Ki-67), obecności naczyń krwionośnych w guzie (CD34) i fenotypu epi/EMT komórek nowotworowych (K/V), odpowiadającego fenotypowi ocenianemu w CTCs.

Marker Ki-67 zlokalizowany był w jądrach komórek nowotworowych (**Ryc. 29**). W wybarwionych fragmentach nowotworów, zaobserwowano komórki nowotworowe negatywne na Ki-67 (brak komórek Ki-67-pozytywnych, n=17; 18,3%), z niskim poziomem Ki-67 (1-10% komórek guza była Ki-67-pozytywna, n=26; 28%) i z wysokim poziomem Ki-67 (gdy >10% komórek guza była Ki-67-pozytywna, n= 50; 53,7%). Punkty odcięcia wybrano arbitralnie w oparciu o obserwowane wyniki.



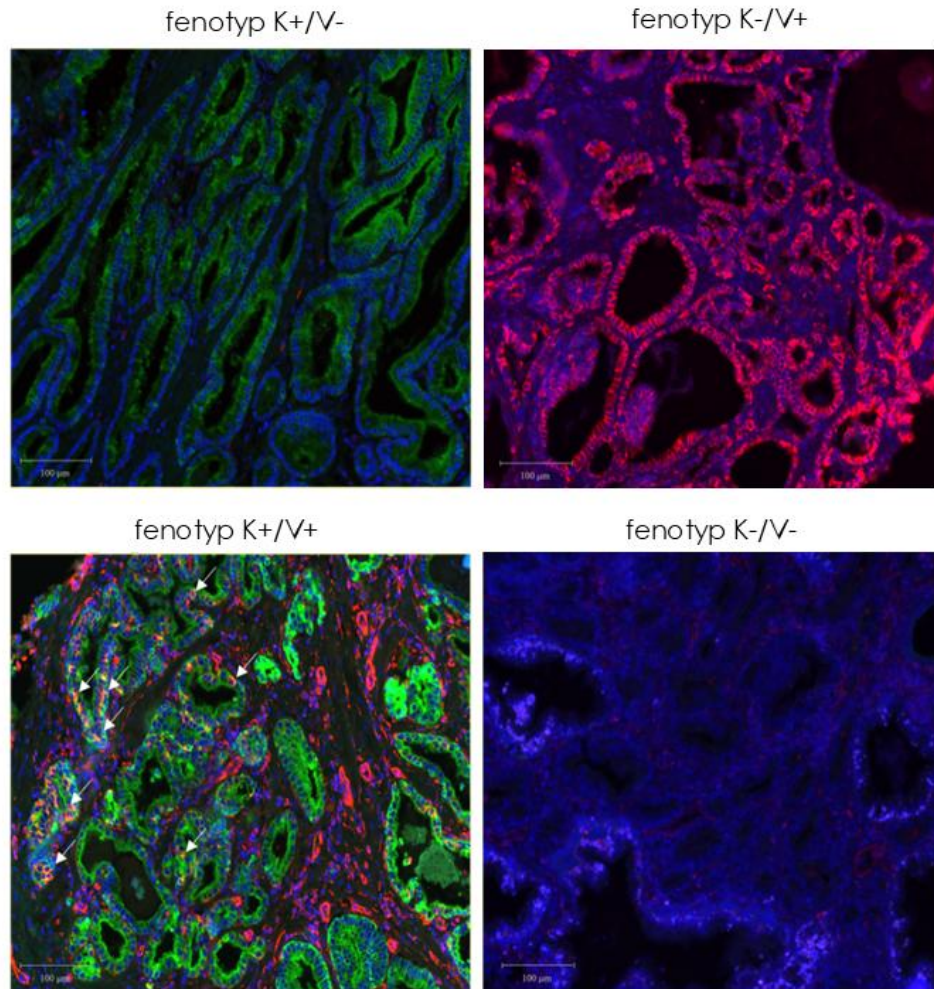
Rycina 29. Ekspresja markera proliferacji Ki-67 w guzach pierwotnych pobranych od chorych. 0% – brak Ki-67, 1-10% – niska ekspresja Ki-67, >10% – wysoka ekspresja Ki-67. Fotografie wykonano obiektywem 20x (mikroskop Axio Observer 21, Zeiss).

Naczynia krwionośne identyfikowano i zliczano w każdym badanym fragmencie guza, gdy obecne były komórki endotelialne (CD34-dodatnie) i widoczne światło naczynia. W badanych fragmentach nowotworów oceniono liczbę naczyń krwionośnych przypadających na fragment guza. Wykryto nieliczne naczynia krwionośne (<120 , VV^{low} ; $n=50$; 55,6%) i liczne naczynia krwionośne (≥ 120 , VV^{high} ; $n=40$; 44,4%) przy wartości granicznej (cut-off) ustalonej na poziomie mediany wynoszącej 120 (**Ryc. 30**).



Rycina 30. Reprezentatywne fotografie przedstawiające fragmenty guzów z małą (VV^{low}) i dużą (VV^{high}) liczbą naczyń krwionośnych. CD34 – komórki endotelialne (wybarwione na brązowo), hematoksylina (niebieski). Powiększenie 20x (średnica nowotworu 1.5 mm, skaner Pannoramic 250).

W guzach wybarwionych fluorescencyjnie przeciwciałami anty-K i anty-V, zliczano udział komórek nowotworowych o poszczególnych fenotypach (tj. $K+/V-$, $K+/V+$, $K-/V+$, $K-/V-$) i oceniono fenotyp dominujący (tzn. fenotyp przypisany choremu, gdy jeden z fenotypów: epi lub EMT był obecny w $\geq 50\%$ wszystkich analizowanych komórek guza) fenotyp komórek nowotworowych w każdym fragmencie (**Metody 7.9**). Zidentyfikowano komórki nowotworowe o fenotypach epitelialnym, mezenchymalnym, epitelialno-mezenchymalnym (bardzo rzadko) oraz podwójnie-negatywnym (**Ryc. 31**).

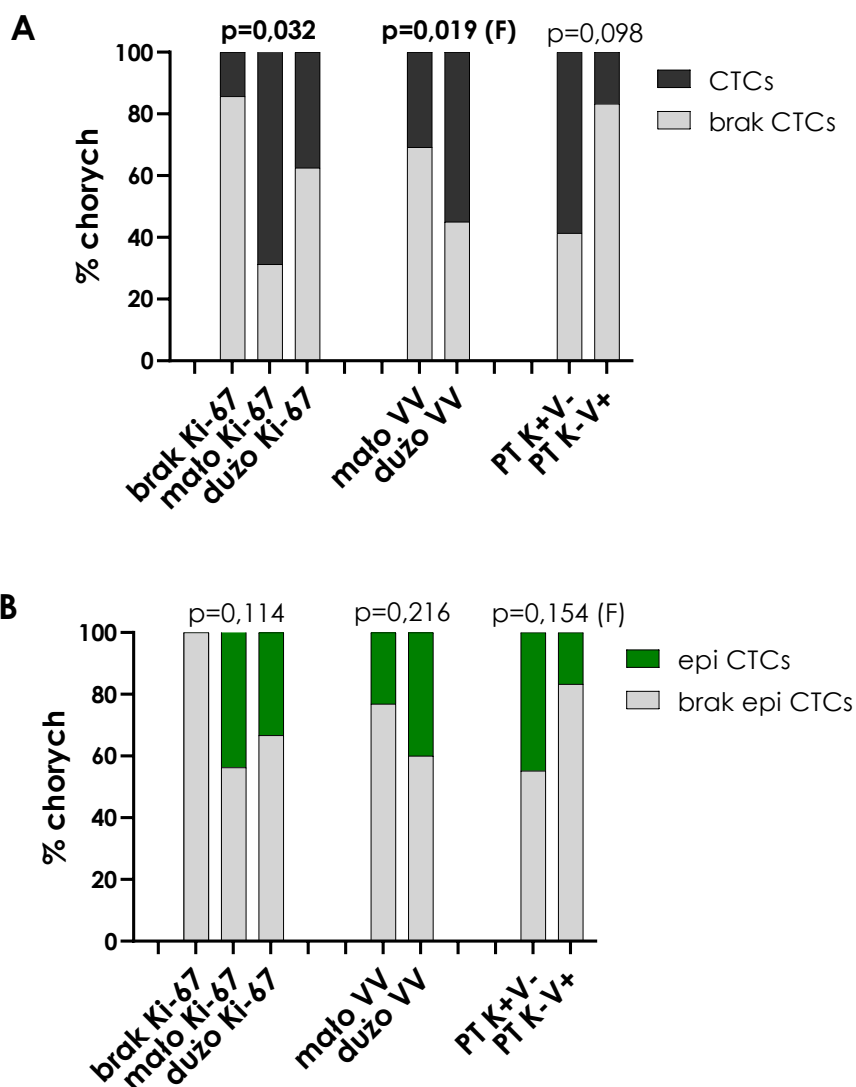


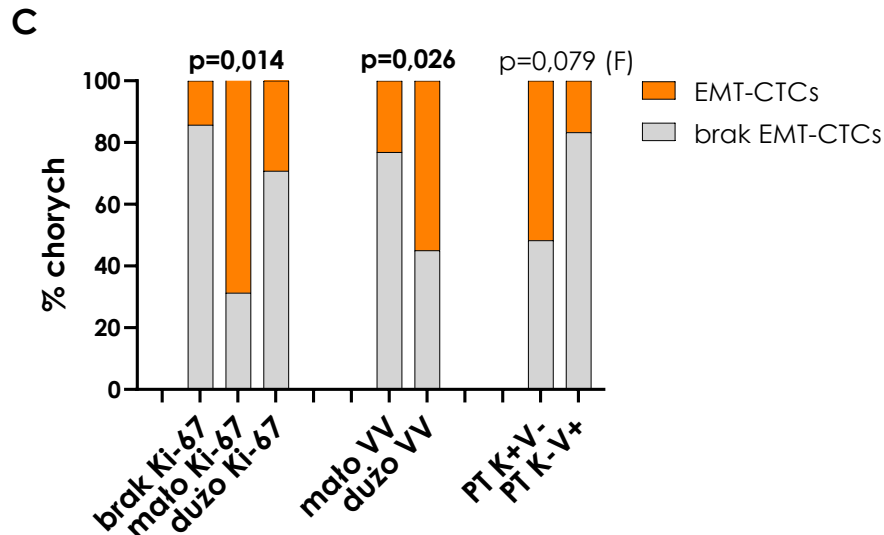
Rycina 31. Reprezentatywne fotografie przedstawiające fragmenty guzów wybarwione na obecność keratyny (K) i wimentyny (V). Fenotyp K+/V+ wskazują białe strzałki. K+/V- – fenotyp epitelialny, K+/V+ – fenotyp epitelialno-mezenchymalny, K-/V+ – fenotyp mezenchymalny, K-/V- – fenotyp podwójnie-negatywny. Powiększenie 400x, średnica nowotworu 1.5 mm, skala 50 µm, skaner Panoramic 250.

W badanych fragmentach guzów przeważały komórki nowotworowe o fenotypie dominującym epitelialnym (K, 75,9%, n=44). Rzadziej obserwowano jako dominujący fenotyp mezenchymalny (V, 24,1%, n=14).

Fenotyp K/V, poziom Ki-67 i liczbę naczyń krwionośnych oznaczonych w guzach pierwotnych skorelowano z obecnością wszystkich fenotypów CTCs, obecnością epitelialnych CTCs i CTCs związanych z EMT. W przypadku wszystkich fenotypów CTCs uzyskano podobny wynik, w niektórych

przypadkach osiągając istotność statystyczną. Wykazano, że CTCs pochodziły z guzów pierwotnych o dobrym unaczynieniu ($p=0,019$ (F), **Ryc. 32A**) i niskim stopniu aktywności proliferacyjnej komórek nowotworowych ($p=0,032$, **Ryc. 32A**). W przypadku epithelialnych CTCs nie wykryto istotnych korelacji z Ki-67, liczbą naczyń krwionośnych i fenotypem guza pierwotnego (**Ryc. 32B**). Natomiast CTCs związane z EMT występowały częściej u chorych z guzami o niskiej aktywności proliferacyjnej ($p=0,014$, **Ryc. 32C**) i dobrze unaczynionymi guzami pierwotnymi ($p=0,026$, **Ryc. 32C**).



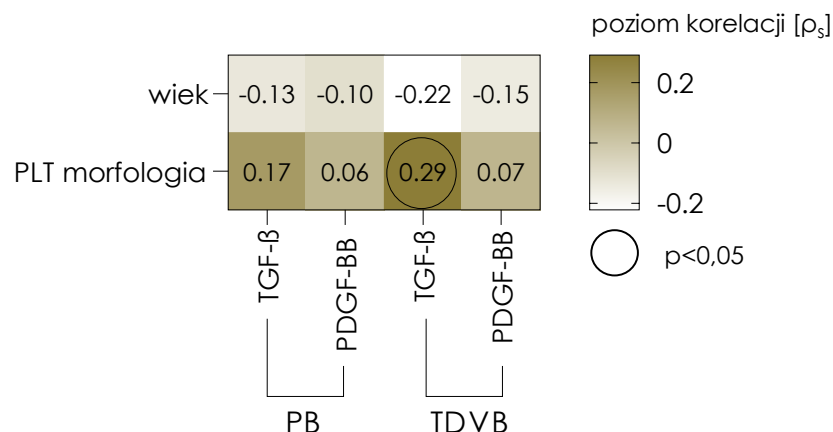


Rycina 32. Rozkład występowania CTCs w kontekście potencjału proliferacyjnego, unaczynienia i fenotypu guza pierwotnego. Wszystkie CTCs (A), epithelialne CTCs (B) i CTC o fenotypie EMT (C). W analizach zastosowano test χ^2 i dokładny test Fishera, istotne statystycznie wyniki, tj. $p < 0,05$ wytłuszczono. CTCs – krążące komórki nowotworowe, Ki-67 – marker proliferacji, PT – guz pierwotny, VV – naczynia krwionośne, K – keratyna, V – wimentyna.

8.6 Korelacje poziomów cytokin TGF- β i PDGF-BB z fenotypami CTCs w TDVB i PB

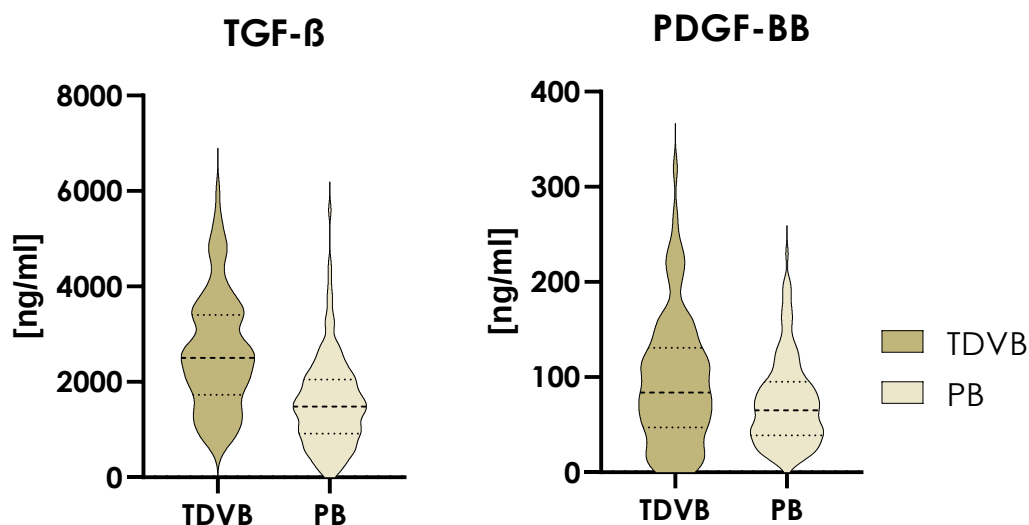
Wyniki uzyskane w podrozdziałach **Wyników 8.3** i **8.4** wskazywały, że CTCs w interakcjach z płytkami mogą mieć znaczenie rokownicze. Płytki mogą wydzielać czynniki takie jak cytokiny i/lub chemokiny. Część z tych czynników może wpływać na indukcję EMT. Dlatego też postanowiono zbadać poziom cytokin, tj. TGF- β i PDGF-BB, potencjalnie uwalnianych przez płytki krwi u chorych z mZRGK (**Metody 7.10**).

Skorelowano stężenia cytokin TGF- β i PDGF-BB z wiekiem chorych i liczbą płytek krwi pozyskanych z rutynowej przedoperacyjnej morfologii krwi (PLT). Jedynie w TDVB, TGF- β słabo korelowało z ilością płytek przed operacją ($p_s = 0,29$; $p = 0,011$, **Ryc. 33**).



Rycina 33. Współczynniki korelacji rang Spearmana (ρ_s) pomiędzy wiekiem chorych i przedoperacyjną liczbą płytek krwi ze stężeniem cytokin TGF- β i PDGF-BB analizowanych w osoczu TDVB i PB. PLT – płytki krwi, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu beta, PDGF-BB – płytkopochodny czynnik wzrostu, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa. Siła korelacji: $\rho_s = 0,9-1$ – całkowita korelacja; $0,8-0,9$ – bardzo silna korelacja; $0,6-0,8$ – silna korelacja; $0,4-0,6$ – umiarkowana korelacja; $0,2-0,4$ – słaba korelacja; $<0,2$ – bardzo słaba korelacja. Korelacje istotne statystycznie ($p < 0,05$) zaznaczono okręgiem. Legenda przedstawia poziom korelacji w ujęciu kolorystycznym.

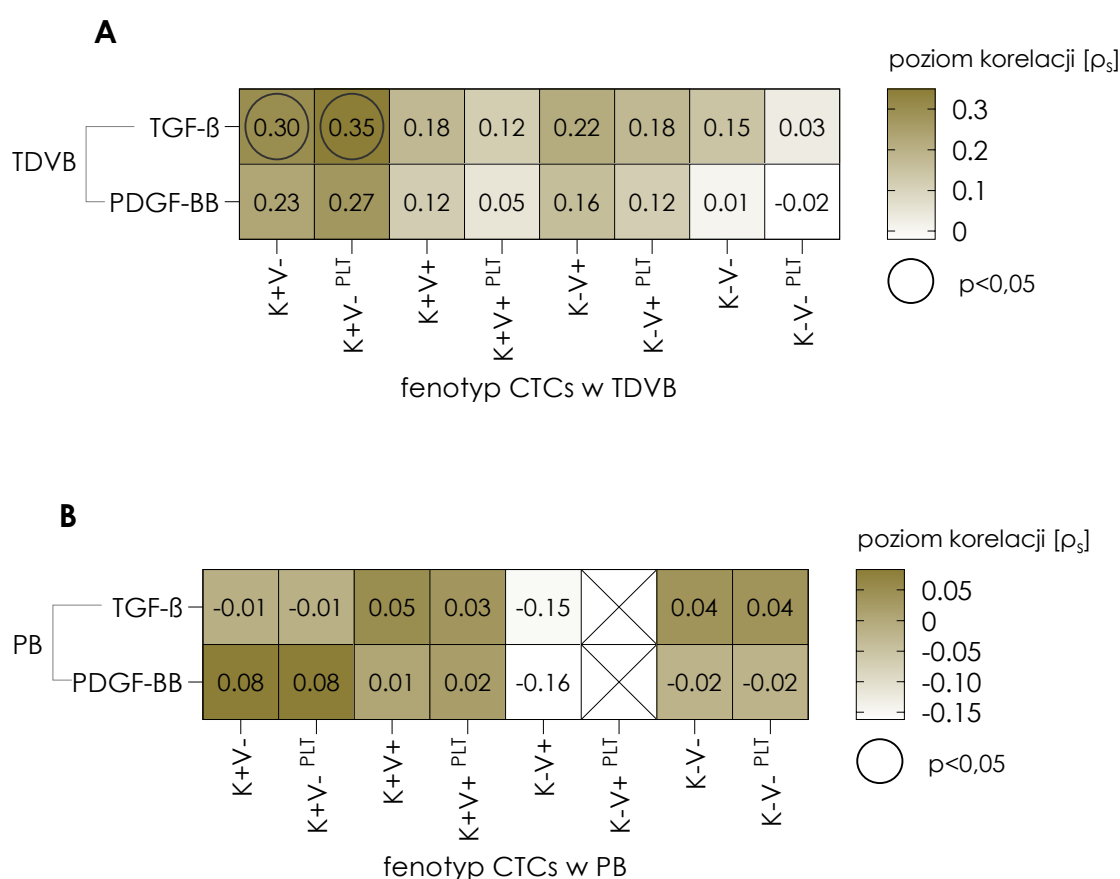
Rozkład stężenia obu cytokin, potencjalnie produkowanych przez płytki krwi przedstawiono na wykresie (**Ryc. 34**).



Cytokina	Osocze TDVB [ng/ml]	Osocze PB [ng/ml]
	zakres (średnia)	zakres (średnia)
TGF-β	673-5986 (2617,4)	117-5599 (1634,9)
PDGF-BB	4-319 (95,4)	12-230 (80,0)

Rycina 34. Graficzne przedstawienie stężenia cytokin TGF-β i PDGF-BB mierzonego w osoczu PB i TDVB. TGF-β - transformujący czynnik wzrostu beta, PDGF-BB - płytkopochodny czynnik wzrostu, TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa.

Sprawdzono, czy stężenie badanych cytokin przekładało się na występowanie konkretnego fenotypu CTCs i fenotypu CTCs w interakcji z płytkami we krwi (TDVB i PB) chorego (**Ryc. 35**).



Rycina 35. Współczynniki korelacji rang Spearmana (ρ_s) pomiędzy fenotypami CTCs i CTCs^{PLT}, występującymi w próbkach TDVB i PB ze stężeniem cytokin TGF-β i PDGF-BB analizowanych w osoczach TDVB (A) i PB (B). epi CTCs (K+V-), epi-mes CTCs (K+V+), mes CTCs (K V+), podwójnie-neg CTCs (K-V-), TDVB – krew z żyły drenującej guz, PB – krew obwodowa. Siła korelacji: $\rho_s = 0,9-1$ – całkowita korelacja; $0,8-0,9$ –

bardzo silna korelacja; 0,6-0,8 – silna korelacja; 0,4-0,6 – umiarkowana korelacja; 0,2-0,4 – słaba korelacja; <0,2 – bardzo słaba korelacja. Legenda przedstawia poziom korelacji w ujęciu kolorystycznym. Korelacje istotne statystycznie zaznaczono okręgiem ($p < 0,05$).

Stężenie TGF- β w TDVB słabo korelowało z liczbą epitelialnych CTCs w TDVB ($\rho_s = 0,301$; $p = 0,040$) oraz z liczbą epitelialnych CTCs w interakcji z płytkami w TDVB ($\rho_s = 0,348$; $p = 0,017$, **Ryc. 35A**). Natomiast TGF- β i PDGF-BB analizowane w osoczu PB nie wykazały istotnych korelacji pomiędzy stężeniem cytokin, a liczbą i fenotypem CTCs (**Ryc. 35B**).

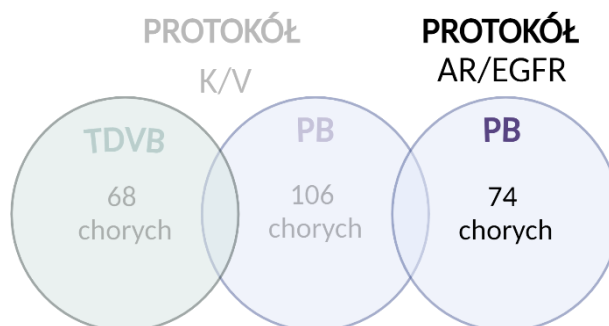
Podsumowanie Wyników 8.5 i 8.6

- CTCs występowały częściej u chorych z dobrze unaczynionymi guzami pierwotnymi o niskiej aktywności proliferacyjnej.
- Cytokina TGF- β , uwalniana przez płytki krwi, wykazała słabą pozytywną korelację z liczbą epitelialnych CTCs w TDVB oraz z liczbą epitelialnych CTCs^{PLT} w TDVB.

8.7 Protokół AR/EGFR - charakterystyka grupy chorych

Analiza z zastosowaniem protokołu AR/EGFR przeprowadzona została w celu potwierdzenia i rozwinięcia wyników uzyskanych we wcześniejszych badaniach naszego Zespołu⁴⁷, a dotyczących roli EGFR w przerzutowaniu do kości u chorych na RGK. Z użyciem tego protokołu przeanalizowano 74 próbki kliniczne pochodzące od zawężonej grupy chorych analizowanych z użyciem protokołu K/V (**Materiały 6.1, Ryc. 36**). Wielkość grupy zdeterminowała nieoczekiwana i długotrwała awaria cytometru przepływowego, przeciągająca się ze względów proceduralnych od kwietnia 2023. Ze względu na bardzo ograniczoną liczbę

zarchiwizowanych próbek klinicznych, tej analizie poddano jedynie próbki pochodzące z krwi obwodowej (PB).



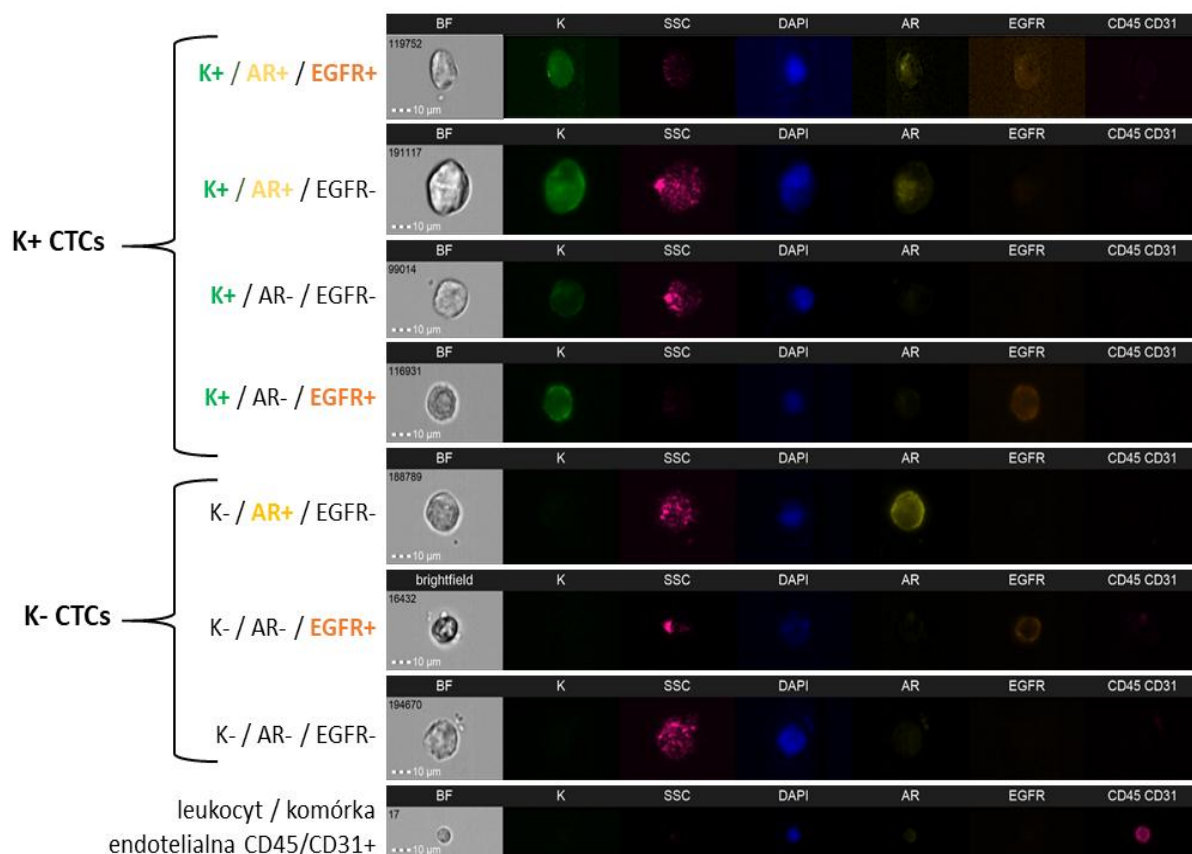
Rycina 36. Próbkę pobrane od chorych z mZRGK analizowane z użyciem protokołów K/V i AR/EGFR. TDVB – krew drenująca guz, PB – krew obwodowa, K – keratyna, V – wimentyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu.

8.8 Wykrywanie komórek CTCs na podstawie barwienia AR/EGFR

W tym protokole również przeanalizowano próbki od 20 zdrowych ochotników, które stanowiły negatywne kontrole. W żadnej z nich nie wykryto CTCs.

Z użyciem protokołu AR/EGFR wykryto średnio 192845 komórek DAPI+ w przeliczeniu na próbkę pochodzącą od jednego chorego z mZRGK. Dwudziestu dwóch chorych (29,73%) było CTCs-pozytywnych i zidentyfikowano u nich w sumie 705 CTCs (zakres 3–7603 CTCs/1mln BMCs, średnia 280 CTCs/1mln BMCs). Tak jak w przypadku analizy z użyciem poprzedniego protokołu (K/V), oceniono liczbę CTCs o różnych fenotypach zidentyfikowanych u każdego chorego (**Ryc. 37**). Wykryto następujące fenotypy CTCs: K+/AR+/EGFR+ (n=9, 13,5% wszystkich analizowanych chorych, zakres 4-1601 CTCs), K+/AR-/EGFR+ (n=1 chory, 1,5%, zakres 1-470 CTCs), K+/AR-/EGFR- (n=9 chorych, 13,2%, zakres 2-1059 CTCs), K+/AR+/EGFR- (n=14 chorych, 20,6%, zakres 4-4002 CTCs), K-/AR-/EGFR+ (n=1

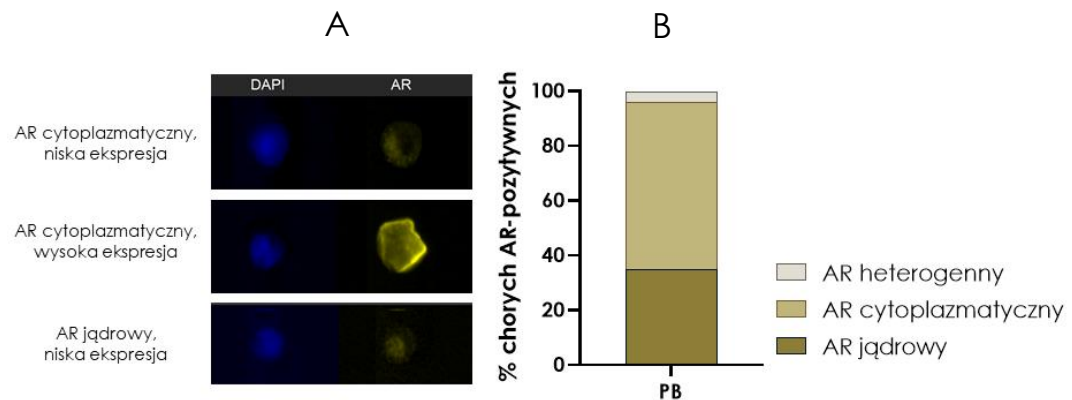
chory, 1,5%, zakres 1-19 CTCs), K-/AR-/EGFR- (n=9 chorych, 13,2%, zakres 2-470 CTCs) i K-/AR+/EGFR- (n=11 chorych, 16,2%, zakres 6-2000 CTCs; **Ryc. 33**). Nie zidentyfikowano natomiast ani jednej CTC o fenotypie K-/AR+/EGFR+.



Rycina 37. Reprezentatywne fotografie przedstawiające różne fenotypy CTCs (K+ i K-) oraz przykładowe komórki CD45/CD31+ zidentyfikowane we krwi chorych z mRZGK. BF - jasne pole; K – pan-keratyna; SSC – rozproszenie boczne, DAPI – jądro komórkowe, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłonna. Obiektyw 40x, Amnis® ImageStream® Mk II (Cytek).

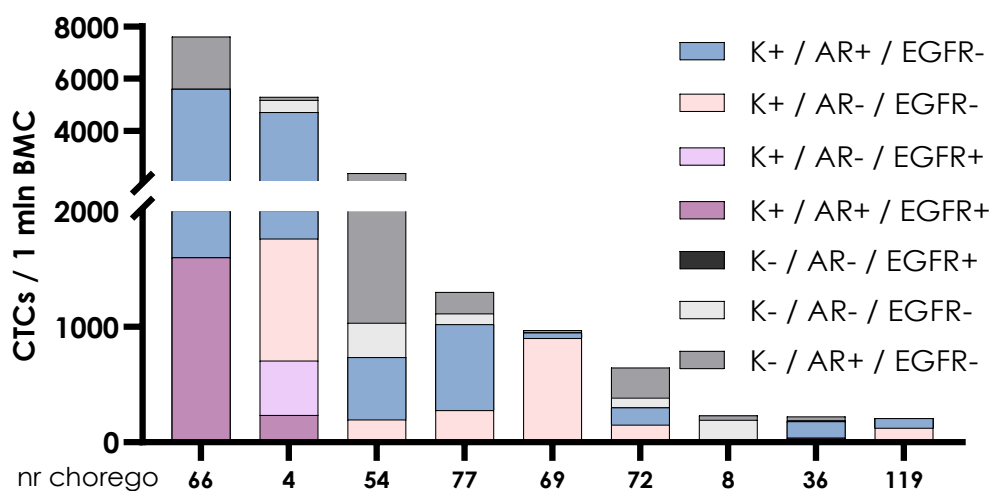
Dodatkowo, ze względu na potencjalne znaczenie terapeutyczne oceniono lokalizację AR w jądrze i cytoplazmie zidentyfikowanych potencjalnych CTCs (**Ryc. 38A**). Większość AR-pozytywnych CTC charakteryzowała się lokalizacją cytoplazmatyczną tego receptora. CTCs z AR-jądrowym stanowiło 6,50% wszystkich wykrytych CTCs (n=1122/ 1mln BMC), a AR-cytoplazmatyczne obserwowano w 93,50% CTCs (n=16152/ 1mln BMC). W podgrupie chorych CTCs-pozytywnych z ekspresją AR barwienie jądrowe obserwowano u 34,8%

(n=8), cytoplazmatyczne u 60,9% (n=14), a obie lokalizacje AR w różnych CTCs u 4,35% (n=1) chorych (**Ryc. 38B**).



Rycina 38. Fotografie CTCs przedstawiające cytoplazmatyczną i jądrową lokalizację AR w komórce (A). Wykres przedstawia dominującą lokalizację AR w CTCs przypadającą na chorego (B). Heterogeny AR oznacza taką samą liczbę CTCs o cytoplazmatycznym i jądrowym barwieniu CTCs przypadającą na chorego. AR – receptor androgenowy, DAPI – barwnik barwiący jądra komórkowe. Obiektyw 40x, Amnis® ImageStream® Mk II (Cytex).

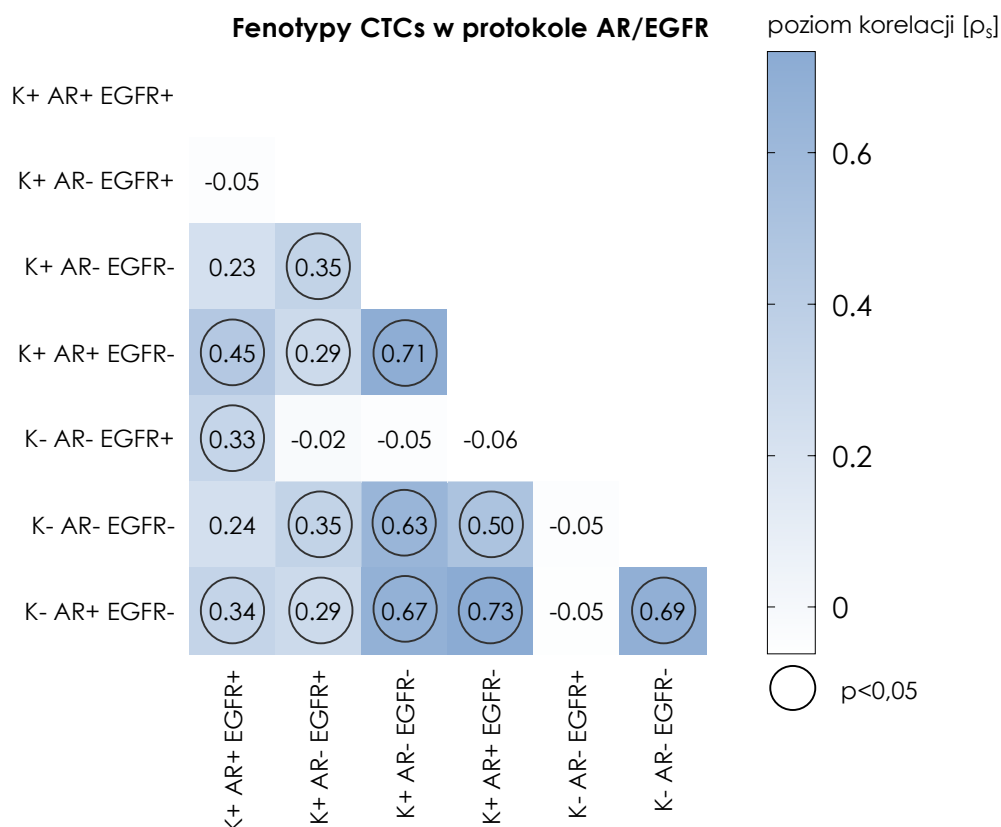
CTCs wykryte przy użyciu tego protokołu, podobnie jak w przypadku protokołu K/V, wykazywały znaczną heterogenność; u poszczególnych chorych identyfikowano różne współwystępujące fenotypy CTCs ze zdecydowaną przewagą K⁺ CTCs (**Ryc. 39**).



Rycina 39. Częstości występowania CTCs o różnych fenotypach u wybranych chorych na w przeliczeniu na 1 mln BMCs. W celu zaprezentowania heterogenności CTCs wykres obejmuje chorych z liczbą CTCs ≥ 200 / 1 mln PBMC. CTCs – krążące

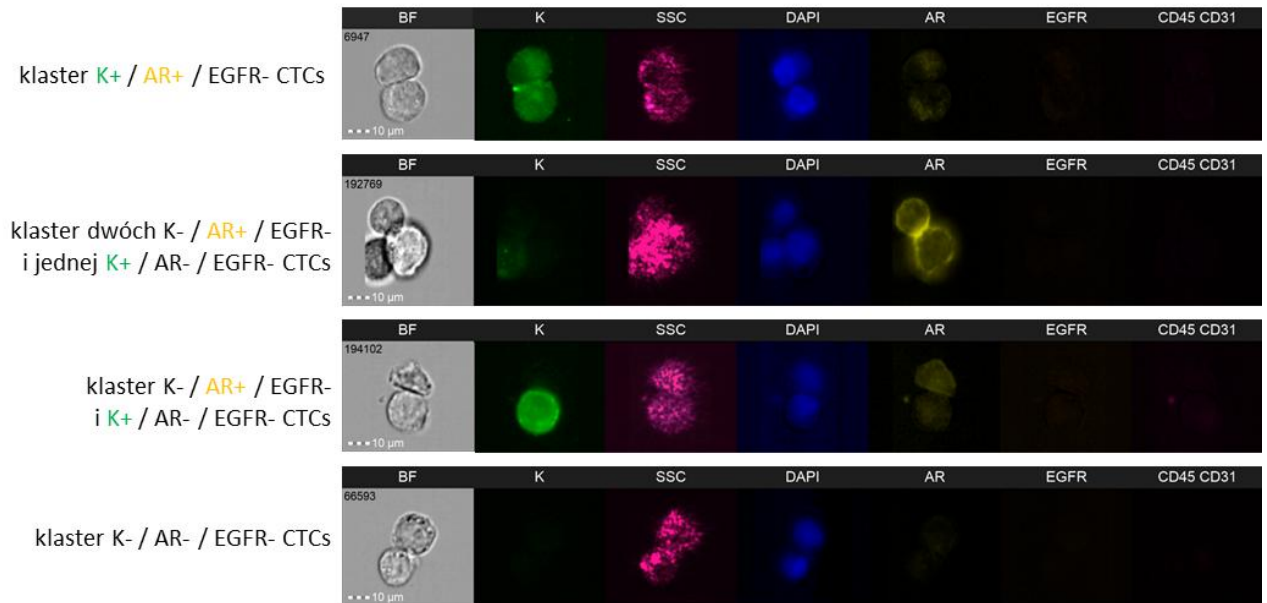
komórki nowotworowe, K – keratyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, BMCs – jednojądrzaste komórki krwi.

Liczbę CTCs o różnych fenotypach zidentyfikowanych z użyciem protokołu AR/EGFR skorelowano ze sobą z użyciem korelacji rang Spearmana (**Ryc. 40**). Liczba CTCs o fenotypie K+/AR-/EGFR- korelowała z liczbą CTCs o fenotypie K+/AR-/EGFR+ ($\rho_s=0,35$; $p=0,003$). Liczba CTCs K+/AR+/EGFR- korelowała z liczbą CTCs K+/AR+/EGFR+ ($\rho_s=0,45$; $p<0,001$), K+/AR-/EGFR+ ($\rho_s=0,29$; $p=0,018$) i K+/AR-/EGFR- ($\rho_s=0,71$; $p<0,001$) (**Ryc. 40**). Dodatkowo, liczba CTCs o fenotypie K-/AR-/EGFR+ słabo korelowała z liczbą CTCs K+/AR+/EGFR+ ($\rho_s=0,33$; $p=0,006$). Liczba CTCs o fenotypie potrójnie negatywnym, tj. K-/AR-/EGFR- korelowała z liczbą CTCs K+/AR-/EGFR+ ($\rho_s=0,35$; $p=0,003$), K+/AR-/EGFR- ($\rho=0,63$; $p<0,001$) oraz K+/AR+/EGFR- ($\rho_s=0,50$; $p<0,001$) (**Ryc. 40**). Co ciekawe, liczba CTCs o fenotypie K-/AR+/EGFR- korelowała z liczbą CTCs o prawie wszystkich fenotypach, tj. K+/AR+/EGFR+ ($\rho_s=0,34$; $p=0,005$), K+/AR-/EGFR+ ($\rho_s=0,29$; $p=0,018$), K+/AR-/EGFR- ($\rho_s=0,67$, $p<0,001$), K+/AR+/EGFR- ($\rho_s=0,73$, $p<0,001$) i K-/AR-/EGFR- ($\rho_s=0,69$, $p<0,001$) (**Ryc. 40**).



Rycina 40. Współczynniki korelacji rang Spearmana (ρ_s) pomiędzy liczbą CTCs o różnych fenotypach wykrytych z użyciem protokołu AR/EGFR. Moc korelacji, $\rho_s = 0,9 - 1$ – całkowita korelacja; $0,8-0,9$ – bardzo silna korelacja; $0,6-0,8$ – silna korelacja; $0,4-0,6$ – umiarkowana korelacja; $0,2-0,4$ – słaba korelacja; $<0,2$ – bardzo słaba korelacja. K – keratyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, CTCs – krążące komórki nowotworowe. Istotne statystycznie korelacje zaznaczono okręgiem ($p < 0,05$). Legenda przedstawia poziom korelacji w skali kolorystycznej.

Przy użyciu protokołu AR/EGFR zidentyfikowano także klastry CTCs, które zawsze współwystępowały z pojedynczymi CTCs. Wystąpiły one u 13,5% (10/74) chorych z mZRGK (zakres 1,52-508,61/1 mln BMCs; średnia 22,68/1 mln BMCs; **Ryc. 41**).



Rycina 41. Reprezentatywne fotografie przedstawiające różne fenotypy CTCs w klastrach. BF - jasne pole; K – pan-keratyna; SSC – rozproszenie boczne, DAPI – jądro komórkowe, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, CD45 – marker leukocytów, CD31 – marker komórek śródbłónka. Obiektyw 40x, Amnis® ImageStream®X Mk II (Cytek).

Podsumowanie Wyników 8.7 i 8.8

- Z wykorzystaniem protokołu AR/EGFR zidentyfikowano 7 fenotypów CTCs, spośród których najczęściej obserwowano fenotyp K⁺/AR⁺/EGFR⁺ i K⁻/AR⁻/EGFR⁻.
- Zarówno pojedyncze CTCs jak i ich klastry były zróżnicowane pod kątem fenotypów.
- W CTCs AR-pozytywnych, dominowała cytoplazmatyczna lokalizacja tego receptora.

8.9 Znaczenie kliniczne CTCs w protokole AR/EGFR

Występowanie CTCs oznaczonych w PB skorelowano z wiekiem chorych i statusem pT, pN, stopniem zaawansowania nowotworu w skali Gleasona, a także przedoperacyjnym stężeniem PSA i stopniem zaawansowania w skali ryzyka d'Amico.

Zajęte węzły chłonne obserwowano częściej u chorych CTCs-pozytywnych (24% vs 6%, $p=0,042$; **Tabela 19**). Jednakże, obecność CTCs nie korelowała z wiekiem chorych, statusem pT, przedoperacyjnym poziomem PSA, ani skalą ryzyka d'Amico.

Tabela 19. Korelacje obecności CTCs z cechami kliniczno-patologicznymi analizowane testem χ^2 Pearsona lub testem Fishera (F). PrePSA – przedoperacyjne stężenie PSA, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe.

	wszystkie CTCs		wartość p
	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	
<65	19 / 37%	10 / 48%	0,434
≥65	33 / 63%	11 / 52%	
pT2a	5 / 10%	0	0,188
pT2b	1 / 2%	1 / 5%	
pT2c	21 / 42%	5 / 25%	
pT3a	18 / 36%	9 / 45%	
pT3b	4 / 8%	5 / 25%	
pT3c	1 / 2%	0	
pN0	48 / 94%	16 / 76%	0,042 (F)
pN1-3	3 / 6%	5 / 24%	
3+4	16 / 32%	4 / 19%	0,589
4+3	21 / 42%	9 / 43%	
8	8 / 16%	4 / 19%	
9	5 / 10%	4 / 19%	
<10	36 / 69%	15 / 71%	1 (F)
≥10	16 / 31%	6 / 29%	
średnie	6 / 12%	2 / 10%	1 (F)
wysokie	46 / 88%	19 / 90%	

W przypadku podziału CTCs pod kątem obecności EGFR zaobserwowano, że CTCs EGFR-negatywne częściej obserwowano u chorych z zajętymi węzłami chłonnymi (28% vs 6%, $p=0,020$; **Tabela 20**).

Tabela 20. Korelacje obecności EGFR-pozytywnych i EGFR-negatywnych CTCs z cechami kliniczno-patologicznymi analizowane testem χ^2 Pearsona lub testem Fishera (F). Pre-PSA – przedoperacyjne stężenie PSA, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu.

	EGFR+ CTCs			EGFR- CTCs		
	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p
<65	23 / 37%	6 / 55%	0,327 (F)	20 / 36%	9 / 50%	0,406 (F)
≥65	39 / 63%	5 / 45%		35 / 64%	9 / 50%	
pT2a	5 / 8%	0	0,799	5 / 9%	0	0,071
pT2b	2 / 3%	0		1 / 2%	1 / 6%	
pT2c	23 / 38%	3 / 30%		23 / 43%	3 / 18%	
pT3a	22 / 37%	5 / 50%		19 / 36%	8 / 47%	
pT3b	7 / 12%	2 / 20%		4 / 8%	5 / 29%	
pT3c	1 / 2%	0		1 / 2%	0	
pN0	55 / 90%	9 / 82%	0,599 (F)	51 / 94%	13 / 72%	0,02 (F)
pN1-3	6 / 10%	2 / 18%		3 / 6%	5 / 28%	
3+4	17 / 28%	3 / 27%	0,846	18 / 34%	2 / 11%	0,199
4+3	25 / 42%	5 / 46%		22 / 42%	8 / 45%	
8	11 / 18%	1 / 9%		8 / 15%	4 / 22%	
9	7 / 12%	2 / 18%		5 / 9%	4 / 22%	
<10	43 / 69%	8 / 73%	1 (F)	39 / 71%	12 / 67%	0,772 (F)
≥10	19 / 31%	3 / 27%		16 / 29%	6 / 33%	
średnie	7 / 11%	1 / 9%	1 (F)	6 / 11%	2 / 11%	1 (F)
wysokie	55 / 89%	10 / 91%		49 / 89%	16 / 89%	

Ponadto, u chorych, u których wykryto AR-pozytywne CTCs, częściej obserwowano zajęte węzły chłonne (28% vs 6%, $p=0,020$; **Tabela 21**).

Tabela 21. Korelacje obecności AR-pozytywnych i AR-negatywnych CTCs z cechami kliniczno-patologicznymi analizowane testem Chi² Pearsona lub testem Fishera (F). Pre-PSA – przedoperacyjne stężenie PSA, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe, AR – receptor androgenowy.

	AR+ CTCs			AR- CTCs		
	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p
<65	20 / 36%	9 / 50%	0,406 (F)	21 / 35%	8 / 62%	0,117 (F)
≥65	35 / 64%	9 / 50%		39 / 65%	5 / 38%	
pT2a	5 / 9%	0	0,376	5 / 9%	0	0,185
pT2b	2 / 4%	0		1 / 2%	1 / 8%	
pT2c	21 / 40%	5 / 29%		23 / 40%	3 / 23%	
pT3a	19 / 36%	8 / 47%		22 / 38%	5 / 38%	
pT3b	5 / 9%	4 / 24%		5 / 9%	4 / 31%	
pT3c	1 / 2%	0		1 / 2%	0	
pN0	51 / 94%	13 / 72%	0,02 (F)	53 / 90%	11 / 85%	0,629 (F)
pN1-3	3 / 6%	5 / 28%		6 / 10%	2 / 15%	
3+4	17 / 32%	3 / 17%	0,343	19 / 33%	1 / 8%	0,235
4+3	23 / 44%	7 / 39%		23 / 40%	7 / 54%	
8	8 / 15%	4 / 22%		10 / 17%	2 / 15%	
9	5 / 9%	4 / 22%		6 / 10%	3 / 23%	
<10	37 / 67%	14 / 78%	0,557 (F)	42 / 70%	9 / 69%	1 (F)
≥10	18 / 33%	4 / 22%		18 / 30%	4 / 31%	
średnie	7 / 13%	1 / 6%	0,67 (F)	7 / 12%	1 / 8%	1 (F)
wysokie	48 / 87%	17 / 94%		53 / 88%	12 / 92%	

Zajęte węzły chłonne obserwowano również częściej u chorych, u których wykryto K-pozytywne CTCs (28% vs 6%, p=0,020; **Tabela 22**).

Tabela 22. Korelacje obecności K-pozytywnych i K-negatywnych CTCs z cechami kliniczno-patologicznymi analizowane testem χ^2 Pearsona lub Fishera (F). Pre-PSA – przedoperacyjne stężenie PSA, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe, K – keratyna.

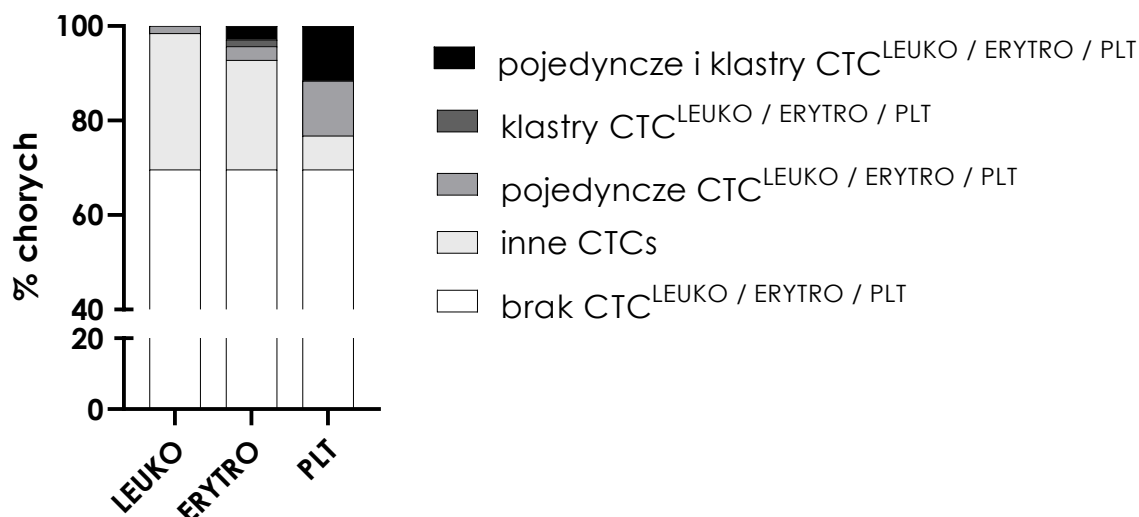
	K+ CTCs			K- CTCs		
	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p
<65	20 / 36%	9 / 50%	0,406 (F)	20 / 34%	9 / 64%	0,066 (F)
≥65	35 / 64%	9 / 50%		39 / 66%	5 / 36%	
pT2a	5 / 9%	0	0,412	5 / 9%	0	0,327
pT2b	1 / 2%	1 / 6%		2 / 4%	0	
pT2c	21 / 40%	5 / 29%		22 / 39%	4 / 29%	
pT3a	20 / 38%	7 / 41%		21 / 37%	6 / 42%	
pT3b	5 / 9%	4 / 24%		5 / 9%	4 / 29%	
pT3c	1 / 2%	0		1 / 2%	0	
pN0	51 / 94%	13 / 72%	0,020 (F)	53 / 91%	11 / 79%	0,180 (F)
pN1-3	3 / 6%	5 / 28%		5 / 9%	3 / 21%	
3+4	16 / 30%	4 / 22%	0,783	19 / 33%	1 / 7%	0,093
4+3	23 / 44%	7 / 39%		24 / 42%	6 / 43%	
8	8 / 15%	4 / 22%		9 / 16%	3 / 21%	
9	6 / 11%	3 / 17%		5 / 9%	4 / 29%	
<10	38 / 69%	13 / 72%	1 (F)	42 / 71%	9 / 64%	0,747 (F)
≥10	17 / 31%	5 / 28%		17 / 29%	5 / 36%	
średnie	6 / 11%	2 / 11%	1 (F)	7 / 12%	1 / 7%	1 (F)
wysokie	49 / 89%	16 / 89%		52 / 88%	13 / 93%	

Obecność CTCs z jądrową lokalizacją AR wykazały korelację na granicy istotności z zajętymi węzłami u chorych z mzRGK (28% vs 6%, $p=0,052$; **Tabela 23**).

Tabela 23. Korelacje obecności AR-pozytywnych CTCs z cytoplazmatyczną lub jądrową lokalizacją z cechami kliniczno-patologicznymi analizowane testem Chi² Pearsona lub testem Fishera (F). Pre-PSA – przedoperacyjne stężenie PSA, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe, AR – receptor androgenowy.

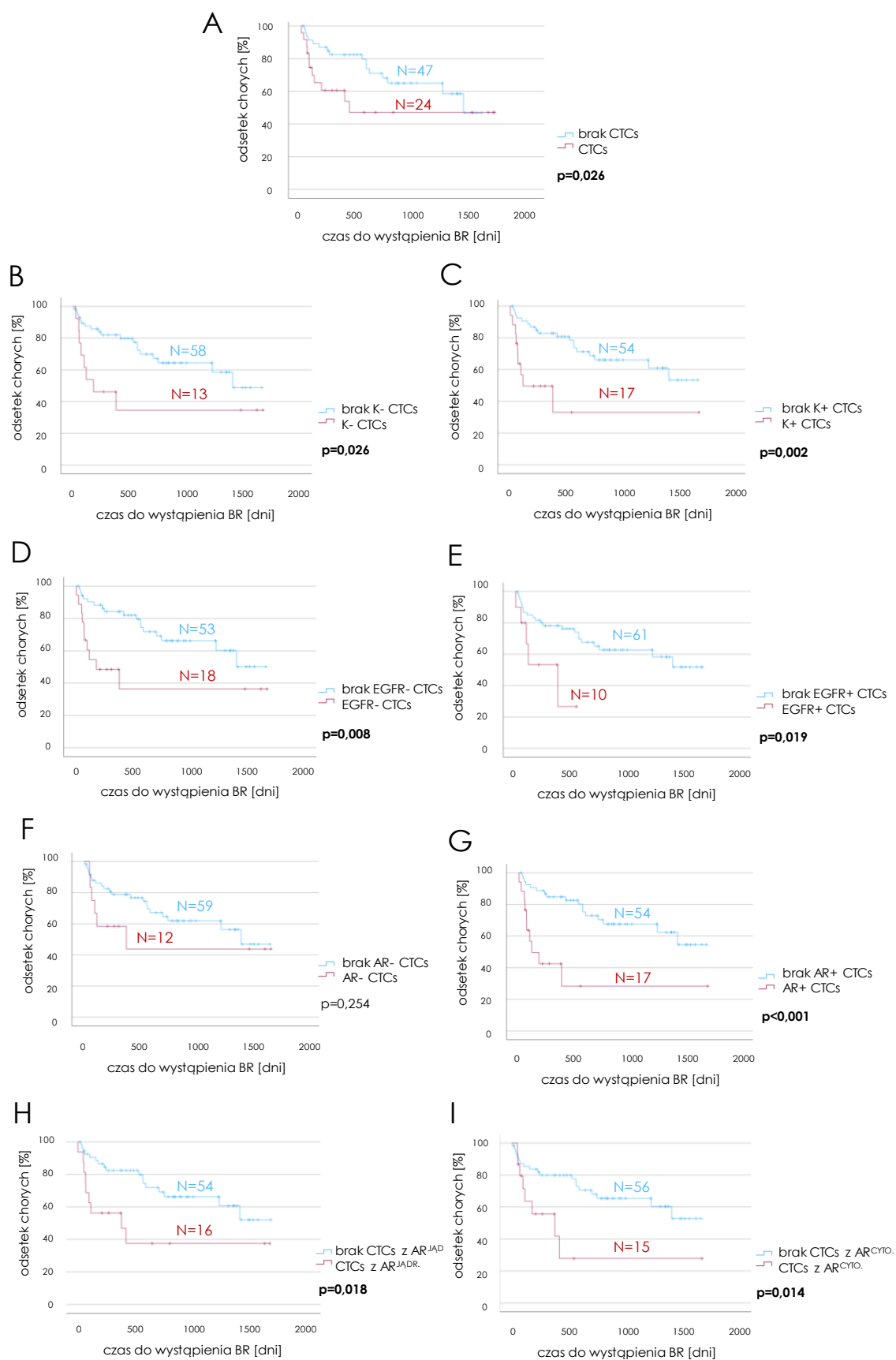
	AR cytoplazmatyczny-CTCs			AR jądrowy-CTCs		
	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p	brak CTCs n / %	obecność CTCs n / %	wartość p
<65	21 / 36%	8 / 53%	0,25 (F)	20 / 36%	9 / 53%	0,265 (F)
≥65	37 / 64%	7 / 47%		35 / 64%	8 / 47%	
pT2a	5 / 9%	0	0,731	5 / 9%	0	0,145
pT2b	2 / 4%	0		1 / 2%	1 / 6%	
pT2c	22 / 41%	4 / 27%		22 / 42%	4 / 25%	
pT3a	18 / 33%	8 / 53%		19 / 36%	7 / 44%	
pT3b	6 / 11%	20%		5 / 9%	4 / 25%	
pT3c	1 / 2%	0		1 / 2%	0	
pN0	51 / 89%	13 / 87%	0,669 (F)	51 / 94%	13 / 76%	0,052 (F)
pN1-3	6 / 11%	2 / 13%		3 / 6%	4 / 24%	
3+4	17 / 30%	3 / 20%	0,278	18 / 34%	2 / 12%	0,310
4+3	25 / 45%	5 / 33%		22 / 42%	8 / 46%	
8	9 / 16%	3 / 20%		7 / 13%	4 / 24%	
9	5 / 9%	4 / 27%		6 / 11%	3 / 18%	
<10	39 / 67%	12 / 80%	0,529 (F)	39 / 71%	12 / 71%	1 (F)
≥10	19 / 33%	3 / 20%		16 / 29%	5 / 29%	
średnie	7 / 12%	1 / 7%	1 (F)	6 / 11%	2 / 12%	1 (F)
wysokie	51 / 88%	14 / 93%		49 / 89%	15 / 88%	

Pojedyncze CTCs występowały w interakcjach z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna (niemożliwymi do dokładnego zidentyfikowania z uwagi na analizę markerów leukocytów (CD45) i komórek śródbłonna (CD31) na jednym kanale), erytrocytami i płytkami krwi. Powyższe interakcje udokumentowano także w przypadku klastrow CTCs (**Ryc. 42**). Interakcje CTCs z płytkami występowały najliczniej w postaci pojedynczych CTCs^{PLT} oraz współwystępujących pojedynczych CTCs^{PLT} i klastrow CTCs^{PLT}. CTCs w interakcji z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna występowały jedynie jako pojedyncze CTCs^{LEUKO}. CTCs^{ERYTRO} występowały zarówno jako pojedyncze CTCs^{ERYTRO}, klastry CTCs^{ERYTRO} oraz współwystępujące pojedyncze CTCs^{ERYTRO} i klastry CTCs^{ERYTRO}.



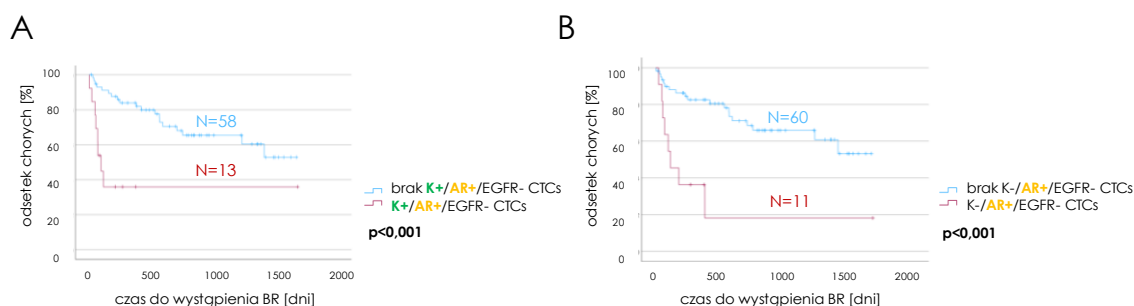
Rycina 42. Procentowy udział CTCs o różnych fenotypach w połączeniu z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna ($CTCs^{LEUKO}$), erytrocytami ($CTCs^{ERYTRO}$) i płytkami krwi ($CTCs^{PLT}$). CTCs – krążące komórki nowotworowe.

W celu oceny przeżycia wolnego od wznowy biochemicznej (BR) w zależności od obecności CTCs o różnych fenotypach w próbkach PB pobranych od chorych z mZRGK przeanalizowano krzywe Kaplana-Meiera. CTCs podzielono pod kątem ekspresji K, AR i EGFR na poziomie białka, a także lokalizacji AR w komórce (jądrowej lub cytoplazmatycznej). Obecność zarówno K-negatywnych jak i K-pozytywnych CTCs była związana z krótszym czasem do wystąpienia BR (odpowiednio $p=0,026$ i $p=0,002$; **Ryc. 43**). Obecność EGFR-pozytywnych, EGFR-negatywnych oraz AR-pozytywnych CTCs korelowała z krótszym przeżyciem wolnym od BR (odpowiednio $p=0,019$, $p=0,008$ i $p<0,001$). Co więcej, obecność AR-pozytywnych CTCs o zarówno jądrowej i cytoplazmatycznej lokalizacji tego receptora wiązała się z krótszym czasem przeżycia wolnego od BR chorych na mZRGK (odpowiednio $p=0,018$ i $p=0,014$).



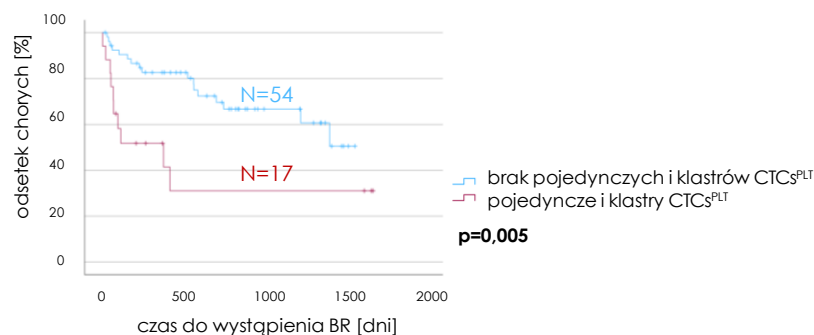
Rycina 43. Krzywe Kaplana-Meiera przedstawiające czas przeżycia wolnego od BR u chorych z mRGK w zależności od obecności CTCs ($p=0,026$, A), K-negatywnych CTCs ($p=0,026$, B), K-pozytywnych CTCs ($p=0,002$, C), EGFR-negatywnych CTCs ($p=0,008$, D), EGFR-pozytywnych CTCs ($p=0,019$, E), AR-negatywnych CTCs ($p=0,254$, F), AR-pozytywnych CTCs ($p<0,001$, G), AR-pozytywnych CTCs z lokalizacją jądrową ($p=0,018$, H) i AR-pozytywnych CTCs z lokalizacją cytoplazmatyczną ($p=0,014$, I). Analizy przeżycia przeprowadzono za pomocą testu log-rank. CTCs – krążące komórki nowotworowe, K – keratyna, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, AR – receptor androgenowy, BR – wznova biochemiczna, AR^{JADR.} – receptor androgenowy zlokalizowany w jądrze komórki, AR^{CYTO.} – receptor androgenowy zlokalizowany w cytoplazmie komórki.

Spośród zidentyfikowanych fenotypów CTCs jedynie obecność CTCs o fenotypach K+/AR+/EGFR- i K-/AR+/EGFR- była związana z istotnie krótszym czasem do wystąpienia BR ($p<0,001$, **Ryc. 44**). Należy jednak mieć na uwadze, że mała liczba chorych z CTCs o innych fenotypach mogła być przyczyną braku istotności statystycznej.



Rycina 44. Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera czas przeżycia wolnego od BR u chorych z mRGK w zależności od fenotypu wykrytych CTCs. Jedynie obecność CTCs o fenotypach K+/AR+/EGFR- ($p<0,001$, A) i K-/AR+/EGFR- ($p<0,001$, B) korelowały z krótszym czasem do wystąpienia BR u chorych z mRGK. Analizy przeżycia przeprowadzono za pomocą testu log-rank. CTCs – krążące komórki nowotworowe, K- keratyna, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, AR – receptor androgenowy, BR – wznova biochemiczna.

Przeanalizowano także korelację pomiędzy obecnością CTCs w interakcjach z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna oraz z płytkami, a czasem wolnym do wystąpienia BR. Jedynie obecność CTCs^{PLT} (pojedynczych i klastrów) była związana z krótszym czasem do wystąpienia BR ($p=0,005$, **Ryc. 45**).



Rycina 45. Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera przedstawiające czas przeżycia wolnego od BR w zależności od obecności pojedynczych CTCs^{PLT} i klastrow CTCs^{PLT}. Analizy przeżycia przeprowadzono za pomocą testu log-rank. CTCs – krążące komórki nowotworowe, CTCs^{PLT} – krążące komórki nowotworowe w interakcji z płytkami, BR – wznowa biochemiczna.

W celu określenia znaczenia rokowniczego wieku chorych, przedoperacyjnego stężenia PSA, statusu pT i pN, stopnia zaawansowania w skali Gleasona, obecności różnych CTCs o różnych fenotypach zidentyfikowanych protokołem AR/EGFR przeprowadzono analizę wieloczynnikową w kontekście wystąpienia BR (**Tabela 24**, całą analizę krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa przedstawiono w **Tabeli U3**). Obecność CTCs o fenotypie K-/AR+/EGFR- okazała się negatywnym czynnikiem prognostycznym u chorych na mZRKG w kontekście wystąpienia BR ($p < 0,001$; HR 11,290; 95%CI 3,338-38,182). Z kolei obecność CTCs o fenotypie K-/AR-/EGFR- była pozytywnym czynnikiem prognostycznym w kontekście BR u chorych na mZRKG ($p = 0,040$; HR 0,237; 95%CI 0,060-0,938).

Tabela 24. Wynik końcowy metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w kontekście BR. pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, CTCs – krążące komórki nowotworowe, K – keratyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu, HR – współczynnik ryzyka, 95%CI – 95% przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

	wartość p	HR	CI 95%	
			Dolny	Górny
status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,054	2,642	0,984	7,093
status pN poz vs. neg	0,022	3,509	1,199	10,271
K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,040	0,237	0,060	0,938
K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	<0,001	11,290	3,338	38,182

W kolejnej analizie wieloczynnikowej w kontekście wystąpienia BR brano pod uwagę wiek chorych, przedoperacyjne stężenie PSA, status pT i pN, stopień zaawansowania w skali Gleasona, obecność pojedynczych CTCs i klastrow CTCs w interakcjach z leukocytami/komórkami śródbłonna, erytrocytami i płytkami (całą analizę krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa przedstawiono w **Tabela U4**). Obecność CTCs w interakcjach z elementami morfotycznymi krwi nie miała jednak wartości prognostycznej.

Przeprowadzono także analizę wieloczynnikową w kontekście wystąpienia BR sprawdzającą znaczenie rokownicze wieku chorych, przedoperacyjnego stężenia PSA, statusu pT i pN, stopnia zaawansowania w skali Gleasona, a także obecności CTCs pozytywnych i negatywnych pod kątem K, AR i EGFR (**Tabela 25**, całą analizę metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa przedstawiono w **Tabeli U5**). Obecność K-pozytywnych CTCs była negatywnym czynnikiem prognostycznym u chorych na mzRGK ($p=0,024$, HR 2,799; 95%CI 1,144-6,850).

Tabela 25. Wynik końcowy metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa w kontekście BR. pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, PB – krew obwodowa, CTCs K+ – krążące komórki nowotworowe pozytywne pod kątem keratyny, HR – współczynnik ryzyka, 95%CI – 95% przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

	wartość p	HR	CI 95%	
			Dolny	Górny
status pN poz vs. neg	0,002	5,270	1,875	14,815
skala Gleasona >7 vs. 7	0,014	2,751	1,229	6,159
CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,024	2,799	1,144	6,850

Podsumowanie Wyników 8.9

- Obecność CTCs o jakimkolwiek wykrytym fenotypie, a także specyficznie fenotypie EGFR-negatywnych i AR-pozytywnych korelują z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych u chorych na mRGGK.
- Obserwowano pojedyncze CTCs oraz klastry CTCs w interakcjach z erytrocytami i płytkami krwi oraz pojedyncze CTCs w interakcjach z leukocytami/krążącymi komórkami śródbłonna.
- Analizy wieloczynnikowe wykazały, że obecność K-pozytywnych CTCs i CTCs o fenotypie K-/AR+/EGFR- były negatywnym czynnikiem prognostycznym, natomiast obecność CTCs o fenotypie K-/AR-/EGFR- była pozytywnym czynnikiem prognostycznym w kontekście wystąpienia BR.

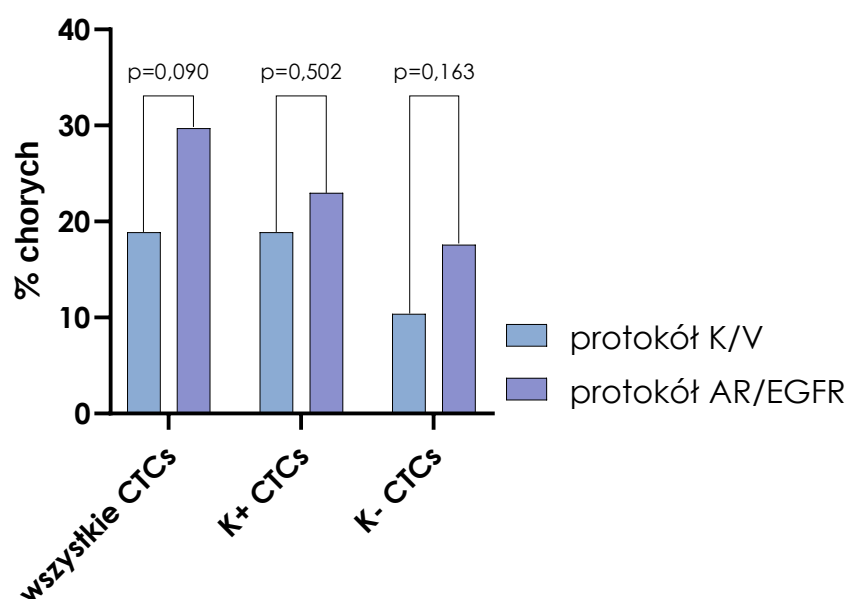
8.10 Porównanie protokołów K/V i AR/EGFR w kontekście detekcji CTCs

Protokół K/V umożliwił ukazanie ogólnego rozsiewu CTCs oraz identyfikację fenotypów CTCs pod kątem fenotypu EMT wraz z jednoczesną detekcją cCAFs. Z kolei zastosowanie protokołu AR/EGFR umożliwiło wykrycie CTCs, które mogą być potencjalnie związane z większym ryzykiem przerzutowania (w szczególności prawdopodobnie do kości; ekspresja EGFR) oraz potencjalnie sugerować nawet odpowiedź na ADT (ekspresja AR). Porównano liczby CTCs wykrytych z użyciem obu protokołów. Wszystkich komórek DAPI+ i CTCs K-pozytywnych wykryto więcej w protokole K/V, natomiast większą liczbę CTCs K-negatywnych CTCs zidentyfikowano w protokole AR/EGFR (**Tabela 26**).

Tabela 26. Porównanie liczby CTCs wykrytych przy użyciu protokołu K/V (n=106, chorzy na mżRGK) i AR/EGFR (n=67, chorzy na mżRGK) w podziale na komórki DAPI+ oraz CTCs K-pozytywne i K-negatywne w próbkach PB i w przeliczeniu na jednego chorego.

Protokół	DAPI+ mediana	CTCs K+ / 1mln BMCs mediana	CTCs K- / 1mln BMCs mediana
K/V (PB)	303932	30,20	1,35
AR/EGFR (PB)	137784	18,91	10,16

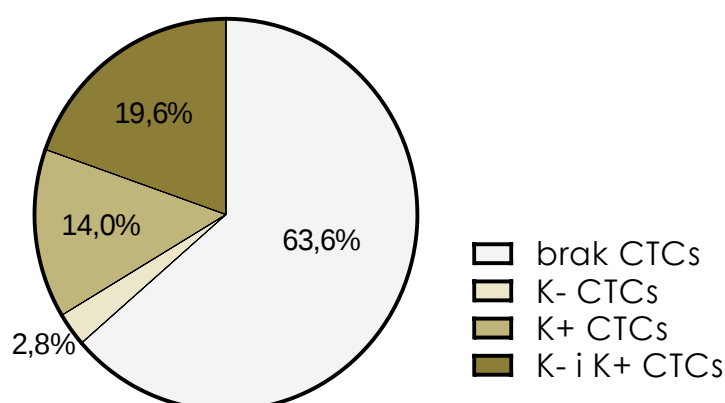
Porównując odsetek chorych z mżRGK (w PB) zidentyfikowanych przy użyciu obu protokołów zaobserwowano większą wykrywalność CTCs z użyciem protokołu AR/EGFR (29,7%, n=22/74) w porównaniu do protokołu K/V (18,9%; n=20/106; p=0,090, **Ryc. 46**). Więcej CTCs K-pozytywnych (22,97%, n=17/74 vs. 18,9%, 20/106; p=0,502) i K-negatywnych (17,6%, n=13/74 vs. 10,4%, n=11/106; p=0,163) również zidentyfikowano w protokole AR/EGFR.



Rycina 46. Porównanie odsetka chorych na mżRGK, u których występowały jakiegokolwiek CTCs oraz K-pozytywne i K-negatywne CTCs identyfikowane z użyciem protokołów K/V i AR/EGFR. CTCs – krążące komórki nowotworowe, K– keratyna. V – wimentyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu.

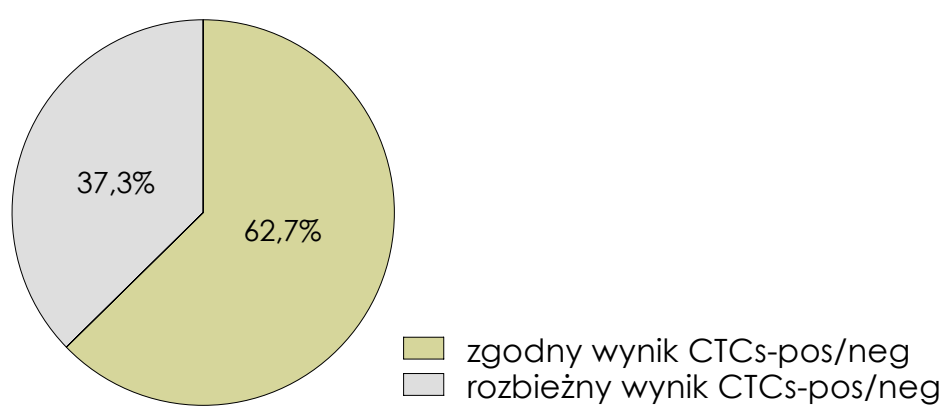
Oceniono także jaki odsetek stanowili chorzy z K-pozytywnymi i K-negatywnymi CTCs w analizowanych grupach (K/V, próbki PB, n=106; AR/EGFR, próbki PB, n=67). Chorzy na mżRGK, u których wykryto K-pozytywne CTCs stanowili 18,9% (n=20/106), gdy CTCs wykrywano z użyciem protokołu K/V, oraz 25,4% (n=17/67), gdy CTCs wykrywano z użyciem protokołu AR/EGFR. Z kolei chorzy na mżRGK, u których wykryto K-negatywne CTCs stanowili odpowiednio 10,4% (K/V; n=11/106) i 19,4% (AR/EGFR; n=13/67) (**Ryc. 46**). Wskaźniki wykrywalności CTCs obu protokołów wydają się proporcjonalne ($p=0,530$), jednak nie oceniano CTCs u tych samych chorych, lecz porównywano dwie populacje o różnej liczebności.

W kontekście obecności CTCs o różnych fenotypach przeanalizowano także wszystkich chorych z mżRGK, u których w PB wykrywano CTCs z użyciem protokołów K/V i/lub AR/EGFR. Jedynym wspólnym dla tych analiz markerem identyfikującym potencjalne CTCs była K, analizowana w obu protokołach. Chorych klasyfikowano jako CTCs-negatywnych (brak CTCs), pozytywnych pod względem obecności jedynie K-negatywnych CTCs (K- CTCs), jedynie K-pozytywnych CTCs (K+ CTCs) oraz jednocześnie K-negatywnych i K-pozytywnych CTCs (K- i K+ CTCs). Analiza powyższej grupy chorych na mżRGK wykazała, że 36,4% chorych było pozytywnych pod kątem występowania CTCs. Dodatkowo, u chorych najczęściej obserwowano występowanie obu fenotypów CTCs (K- i K+) u (19,6%), zaś najrzadziej CTCs o fenotypie K- (2,8%) (**Ryc. 47**).



Rycina 47. Częstości występowania różnych fenotypów CTCs u chorych (PB) na mżRGK (n=106). CTCs – krążące komórki nowotworowe, K – keratyna.

Finalnie, przeprowadzono również analizę obejmującą tylko sparowane próbki porównującą próbki PB od chorych na mZRGK (n=67), analizowane przy użyciu dwóch protokołów – K/V i AR/EGFR. Takie podejście pozwoliło określić czy próbki od tego samego chorego przełożyły się na jednakowy wynik w kontekście obecności CTCs. Określono liczbę i procent chorych, u których oba protokoły dały ten sam wynik, tj. pozytywny/negatywny na CTCs. Zgodność otrzymanych wyników z użyciem dwóch protokołów wyniosła 62,7% (**Ryc. 48, Tabela 27**).



Rycina 48. Porównanie obecności CTCs, w sparowanych próbkach, analizowanych u tych samych chorych na mZRGK (próbki PB, n=67), z użyciem dwóch protokołów – K/V i AR/EGFR. CTCs – krążące komórki nowotworowe.

Tabela 27. Porównanie wykrywalności CTCs z użyciem obu protokołów (K/V i AR/EGFR) i określenie stopnia zgodności między nimi.

		Protokół AR/EGFR	
		CTCs-pozytywne n / %	CTCs-negatywne n / %
Protokół K/V	CTCs-pozytywne n / %	40 / 59,7 %	18 / 26,9 %
	CTCs-negatywne n / %	7 / 10,4 %	2 / 2,99 %

Próbki o identycznym statusie - 42/67 (62,7%); Chi2 = 0,289; p = 0,714 (F)

Zbadano również zgodność w obecności CTCs w próbkach od chorych z pRGK (PB), analizowanych protokołem K/V i AR/EGFR. Grupa ta była bardzo nieliczna (n=9), ale zgodność wyniosła 77,8% (n=7, **Ryc. 49**).



Rycina 49. Porównanie obecności CTCs, w sparowanych próbkach, analizowanych u tych samych chorych z pRGK (próbki PB, n=9), z użyciem dwóch protokołów – K/V i AR/EGFR. CTCs – krążące komórki nowotworowe.

Oceniono także zdolność obu protokołów do wykrywania klastrow i zgodne wyniki otrzymano w przypadku 79,1% chorych z mRGK (PB, n=67, **Ryc. 50**).



Rycina 50. Porównanie obecności klastrow CTCs, w sparowanych próbkach, analizowanych u tych samych chorych z mRGK (próbki PB, n=67), z użyciem dwóch protokołów – K/V i AR/EGFR. CTCs – krążące komórki nowotworowe.

Co ciekawe, w przypadku klastrow CTCs u chorych z pRGK (n=9), wszystkie próbki pochodzące od tych samych chorych dały zgodny wynik obecność/braku klastrow, a więc zgodność tej części wyniosła 100%.

Podsumowanie Wyników 8.10

- Analiza wszystkich CTCs u chorych z mRGK, identyfikowanych przez oba protokoły potwierdziła, że najczęściej występowały CTCs K+.
- Obecność CTCs oceniona przy użyciu dwóch protokołów (K/V i AR/EGFR) u chorych z mRGK wykazała 63% zgodności (n=67).
- Obecność CTCs oceniana w ten sam sposób, ale u chorych z pRGK wykazała aż 77,8% zgodności, lecz grupa chorych była bardzo nieliczna (n=9).
- Wykrywanie klastrow CTCs również wykazało wysoką zgodność, 79,1% u chorych z mRGK i 100% u chorych z pRGK analizowanych dwoma protokołami.

9. DYSKUSJA

9.1 Nowatorskie rozwiązania wykorzystane w przeprowadzonych badaniach

Płynne biopsje pozwalają zgłębić proces rozsiewu komórek nowotworowych, a w przyszłości mogą dostarczyć również rozwiązań diagnostycznych. W niniejszej pracy określano obecność i liczbę CTCs we krwi chorych na mRGK i pRGK. Obecność i liczba, a także charakterystyka CTCs są czynnikami o wartości klinicznej, pozwalającymi na określenie rokowania chorych oraz monitorowanie postępu choroby i jej odpowiedzi na terapię⁶⁵. Jednakże, z uwagi na niewielką liczbę wykrywanych CTCs w krwi chorych we wczesnym stadium choroby nowotworowej, są one niezwykle trudnym obiektem badań. W niniejszej pracy wprowadzono dwa udoskonalenia badania CTCs – oprócz standardowo stosowanej krwi obwodowej izolowane komórki pochodziły ze śródoperacyjnie pobieranej krwi z żyły drenującej guz i były analizowane z użyciem imFC, narzędzia dopiero od niedawna implementowanego w obszarze płynnej biopsji, również dzięki staraniom naszego Zespołu^{53-54,63}.

W porównaniu z dostępnymi na rynku technologiami, imFC wyróżnia się wieloma zaletami, wśród których należy podkreślić możliwość wykrywania kilku (a nie standardowo 2-3) wybranych markerów molekularnych, wystandaryzowane analizy i wykonanie w wysokiej rozdzielczości fotografii każdego przepływającego obiektu. W porównaniu z metodą CellSearch®, uznawaną za złoty standard w analizie CTCs, imFC umożliwia zastosowanie większej liczby markerów do detekcji CTCs (9 w imFC vs 3 w CellSearch®). Co więcej, jakość zdjęć uzyskiwanych podczas analizy przy użyciu platformy CellSearch® (powiększenie 10x) nie pozwala na analizę szczegółowej morfologii CTCs, informując jedynie o liczbie CTCs o uprzednio zdefiniowanym fenotypie (K8/18/19+/DAPI+/CD45-). Zgodnie z moją wiedzą, w literaturze nie opisano dotychczas wyników analizy obecności i liczby CTCs od chorych na RGK przy użyciu imFC, natomiast w przypadku innych nowotworów analizowane grupy chorych były niewielkie, licząc po 6 chorych z rakiem jajnika, tarczycy i przełyku⁶⁰, 16 chorych na raka jelita

grubego⁶² i 69 chorych na raka wątroby⁶¹. Analiza CTCs od chorych na RGK przeprowadzona w ramach rozprawy doktorskiej oraz wcześniejsze badania Naszego Zespołu, pozwoliły zbadać morfologię i przeprowadzić fenotypowanie sumarycznie ponad 4000 CTCs zidentyfikowanych u chorych na raka piersi (n=210), płuc (n=29), jajnika (n=24) i mZRGK (n=33), powiększając analizy CTCs z użyciem imFC o duże grupy chorych^{54,63}.

Jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej było porównanie występowania CTCs o różnych fenotypach w krwi pobranej z żyły drenującej guz od chorych na mZRGK. Opisana w pracy procedura pozyskania materiału (krwi z TDVB) została dotychczas opisana w niewielu typach nowotworów^{27,29,47,61-62,66-69} ze względu na czysto anatomiczne, a zatem techniczne trudności jej pozyskania, a także relatywnie małą objętość krwi możliwą do pobrania (mediana 2,5 ml, zakres 1-9,5 ml) oraz częste występowanie w próbce skrzepów utrudniających dalszą analizę. Mimo tych niedogodności, ocena obecności CTCs w TDVB może potencjalnie umożliwiać uzyskanie bardziej wiarygodnej informacji na temat rozsiewu komórek nowotworowych i oceny sytuacji klinicznej, a przede wszystkim zrozumienia biologii rozsiewu nowotworów, ponieważ analizowany materiał pobierany jest bezpośrednio z naczynia drenującego guz i zawiera CTCs o natywnym fenotypie, niezmienionym jeszcze w odpowiedzi na warunki stresowe, na które narażone są komórki nowotworowe, które dostały się do krwioobiegu⁷⁰⁻⁷¹. Dodatkowo, TDVB jest potencjalnym źródłem materiału bogatego w CTCs dobrej jakości, charakteryzującymi się zazwyczaj brakiem zmian morfologicznych świadczących o apoptozie. W porównaniu do CTCs z PB, które często odznaczały się sfałdowaną błoną komórkową i mniej regularnym kształtem, CTCs z TDVB wydają się być również komórkami o mniejszym stopniu uszkodzenia. Większa liczba CTCs zidentyfikowana w TDVB sugeruje dodatkowo potencjalnie większe prawdopodobieństwo pozyskania komórek do dalszej, bardziej szczegółowej analizy np. charakterystyki transkryptomicznej czy genomicznej⁷². Należy dodać, że przeprowadzona w ramach pracy doktorskiej analiza obecności i liczby CTCs w TDVB od chorych na mZRGK z wykorzystaniem imFC nie została dotychczas opisana w literaturze, dlatego stanowi cenne źródło wiedzy na temat pierwszych sekund rozsiewu RGK.

We wspomnianych wyżej badaniach oraz analizach opisanych w literaturze dotyczących innych nowotworów ocenianych w TDVB, potwierdzono, że pojedyncze CTCs i/lub klastry CTCs występowały w większej liczbie w krwi pobranej z żyły zlokalizowanej w pobliżu guza (w porównaniu do krwi obwodowej)^{26-27,29}, a niniejsza praca po raz pierwszy potwierdza i rozszerza te wyniki o RGK.

Metoda imFC, stosowana w ramach niniejszej pracy doktorskiej jest jeszcze stosunkowo nowym narzędziem⁵⁵, jeszcze sporadycznie stosowanym w płynnej biopsji⁶⁰. Częściej dotychczas stosowana w kontekście analizy CTCs standardowa cytometria przepływowa nie sprawdziła się w tym zastosowaniu, głównie ze względu na brak możliwości weryfikacji wykrytych obiektów. Dzięki możliwości przeprowadzania wieloparametrycznych i wysokoprzepustowych analiz próbek klinicznych oraz szczegółowego weryfikowania zidentyfikowanych obiektów na zarchiwizowanych zdjęciach, badanie CTCs z użyciem imFC ma większe szanse na wdrożenie do rutynowej diagnostyki klinicznej⁵³. Podejście to umożliwia jednocześnie standaryzację i wysokoprzepustowość, co zwyczajowo stanowi jeszcze dość duże wyzwanie dla mikroskopii fluorescencyjnej w tego typu analizach. Dzięki temu, że każda analiza z użyciem imFC jest przeprowadzona w jednakowych warunkach (tj. szybkość przepływu, moc laserów, liczba analizowanych obiektów, macierze kompensacyjne) możliwe jest rzetelne porównanie obecności i liczby CTCs w różnych próbkach pobranych od różnych chorych, a docelowo możliwa jest również ocena poziomu intensywności fluorescencji różnych antygenów w celu zróżnicowania ich wpływu na rozwój choroby w zależności od poziomu ich występowania. Oprogramowanie Ideas® dedykowane do obsługi cytometru Amnis® Image Stream Mk II umożliwia także archiwizację wyników analizy, dzięki czemu można opracowywać je w późniejszym czasie i poddawać konsultacjom, rozwijając również spektrum analizowanych parametrów w późniejszych projektach (np. dodając analizę cech morfologicznych jak zostało to wykonane w pracy⁵⁴). Ponadto, generowane fotografie charakteryzują się wysoką rozdzielczością przy dużym powiększeniu (20, 40 i 60x), co pozwala na uwidocznienie szczegółów niezbędnych do analizy cech CTCs, takich

jak wielkość oraz kształt komórki i jądra komórkowego, czy stechiometria klastrów⁵⁴.

W wyniku wieloparametrycznej analizy CTCs z użyciem imFC pozyskano wiele cennych informacji nie zawsze możliwych do uzyskania przy użyciu standardowych metod (np. CellSearch®). Określono fenotyp pojedynczej komórki, bądź tworzących klaster, a także zwizualizowano potencjalne interakcje CTCs z komórkami krwi, a także dokonano szczegółowej analizy morfologii CTCs pozwalając uzyskać wiele cennych informacji o stanie CTCs i ich ewentualnym wpływie na rozwój choroby. W kolejnych projektach badawczych, będących kontynuacją zagadnień analizowanych w ramach pracy doktorskiej, pozyskane zdjęcia z próbek krwi chorych na mRGK i pRGK mogą być wykorzystane do szczegółowego badania kolejnych parametrów czy obiektów potencjalnie ważnych z punktu widzenia rozwoju choroby nowotworowej np. zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (ang. *neutrophil extracellular traps*, NETs) czy komórki o fenotypie K+CD45+ (w trakcie oceny). Zalety i szerokie zastosowanie imFC ewidentnie będą wpływać na zwiększenie popularności tej metody do analizy CTCs, niemniej zastosowanie jej w praktyce klinicznej wymaga przeprowadzenia dalszych szczególnie wielośrodkowych badań oraz prób klinicznych, potwierdzających wartość kliniczną CTCs wykrywanych z użyciem tego narzędzia.

9.2 Biologiczne i kliniczne znaczenie CTCs uzyskanych protokołem K/V

W niniejszej rozprawie doktorskiej z użyciem imFC scharakteryzowano CTCs występujące w PB i TDVB, pobranych od chorych na mRGK. CTCs oceniono pod względem ich obecności i liczby, z uwzględnieniem podziału na fenotypy, heterogenność fenotypową występującą u indywidualnego chorego, a także interakcji z innymi CTCs lub elementami morfotycznymi krwi. Uzyskane dane skorelowano z czasem wolnym do wystąpienia BR, charakterystyką guzów pierwotnych oraz poziomem cytokin wydzielanych

przez płytki krwi w osoczu, a także porównano do sytuacji występującej u chorych z pRGK.

W procesie projektowania i optymalizacji protokołu umożliwiającego zbadanie ogólnego rozsiewu CTCs (protokół K/V) wykorzystano markery pozwalające na wykrycie CTCs w szerokim spektrum fenotypów: epitelialnego, epitelialno-mezenchymalnego i mezenchymalnego. Białka wykorzystane jako markery do detekcji potencjalnych CTCs - keratyna i wimentyna, budują filamenty cytoszkieletu, a jednocześnie odzwierciedlają status EMT w CTCs. W celu identyfikacji fałszywie-pozytywnych CTCs, w analizie wzięto pod uwagę aż 4 markery wykluczające (markery fibroblastów – α SMA i CD29, marker komórek hematopoetycznych - CD45, marker komórek śródbłonna - CD31), a także morfologię komórki oraz kształt i wielkość jądra komórkowego⁷³, dzięki czemu zidentyfikowano również komórki o fenotypie K-V-CD45-CD31- α SMA-CD29- i wielkości przypominającej duże CTCs o fenotypie epitelialnym, co potencjalnie może klasyfikować te komórki jako kolejną klasę CTCs (rozwińcie tego tematu znajduje się w dalszej sekcji Dyskusji opisującej fenotypy potencjalnych CTC).

9.2.1 Wykrywalność CTCs w TDVB i PB

Zgodnie z oczekiwaniami, w niniejszej pracy potwierdzono, że TDVB jest doskonałym źródłem CTCs uwalnianych do krwiobiegu bezpośrednio z guza pierwotnego. Z użyciem protokołu K/V, CTCs wykryto w 52% (35/68) TDVB i 19% (20/106) PB pochodzących od chorych na mRGK (**Wyniki 8.2.3**), natomiast u chorych z pRGK CTCs wykryto w 88% (14/16) PB (**Wyniki 8.2.5**). Dotychczas opublikowane dane z analiz metodą CellSearch® opisują niższy wskaźnik pozytywności CTCs z mRGK (12%, n=10/85) i (58%, n=11/19) chorych z pRGK badanych w PB⁷⁴. Natomiast stosując markery K i AR, aby zidentyfikować także komórki K-negatywne, u chorych na mCRPC zidentyfikowano CTCs u wszystkich chorych (n=41)⁷⁵. W kontekście mRGK, wyższy procent CTCs-pozytywnych chorych zidentyfikowanych w ramach pracy doktorskiej może być skutkiem użycia szerszego panelu markerów i wyższej czułości imFC. Mimo, że w protokole CellSearch® potencjalne CTCs są bardziej zagęszczone dzięki pozytywnej selekcji komórek EpCAM-

pozytywnych (analiza z 7,5 ml krwi), to analiza komórek z wykorzystaniem imFC nie posiadająca tego etapu, również umożliwia wykrywalność CTCs, szczególnie tych o fenotypie innym niż epitelialny. Literaturowe wyniki z mCRPC (n=41)⁷⁵ i analizowanych chorych z pRGK (n=16) w niniejszej pracy, mimo grup o dość niskiej liczebności wydają się zbieżne.

Dodatkowo, część próbek TDVB i PB (n=55) przeanalizowana w niniejszej pracy doktorskiej była sparowana, co pozwoliło na porównanie ich potencjału w praktyce klinicznej oraz obserwację zmian w liczbie lub rozkładzie cech CTCs wydostających się z guza i obecnych w krążeniu. W TDVB nie tylko częściej obserwowano pojedyncze CTCs (52 % vs 19%), ale również klastry CTCs (31% vs 10%) w porównaniu do PB od chorych z mRGK (**Wyniki 8.2.4**). Podobne znaczne różnice zidentyfikowano w grupie chorych na raka jelita grubego (96% vs 54%, n=26)²⁹ i raka piersi (81% vs 58%, n=36)²⁷, co potwierdza, że mimo trudności w pozyskaniu tego materiału może być on cennym źródłem CTCs uzupełniających wiedzę o biologii przerzutowania.

Ze względu na wysokie zróżnicowanie fenotypów CTCs u poszczególnych chorych, określono dominujący fenotyp wykrytych CTCs (**Wyniki 8.2.3**). W TDVB dominującym fenotypem u chorych na mRGK był fenotyp epitelialny (40%, n=27/68), natomiast w PB – fenotyp związany z EMT (tj. epitelialno-mezenchymalny, mezenchymalny i podwójnie-negatywny; 9%, n=10/106), co pozwala przypuszczać, że CTCs w PB charakteryzują się wyższym stopniem zaawansowania EMT i/lub wyższą przeżywalnością takich komórek w krwioobieg. Dodatkowo, CTCs związane z EMT mogą pochodzić nie z guza pierwotnego, ale już z jego mikrop przerzutów rozwijających się równolegle z guzem pierwotnym. Dane literaturowe wskazują, że mezenchymalne CTCs charakteryzują się bardziej agresywnym fenotypem, związanym z gorszym rokowaniem w różnych typach nowotworów pochodzenia epitelialnego^{37,76-78}. U analizowanych chorych na mRGK obecność mezenchymalnych CTCs w TDVB lub/i PB wiązała się z krótszym czasem do wystąpienia BR (p=0,008), natomiast w TDVB jedynie obecność podwójnie-negatywnych CTCs korelowała z krótszym czasem do wystąpienia BR (p=0,007) (**Wyniki 8.4**).

9.2.2 Fenotypy potencjalnych CTCs w RGK

CTCs w RGK identyfikowane są różnymi metodami, głównie bazującymi na immunofluorescencji (CellSearch®, Parsortix®) i ich modyfikacjach (np. ulepszona metoda HDSCA3.0, służąca do detekcji rzadkich komórek; ang. *high-definition single-cell assay*). Dotychczas najszerszej stosowano markery epitelialne (EpCAM, K8/18/19), mezenchymalne (wimentynę i czynnik transkrypcyjny Twist), a także markery specyficzne dla tego nowotworu, tj. PSMA, PSA, EGFR, ARv7 i kinaze serynowo-treoninową PIM1⁷⁹. CTCs w RGK najczęściej klasyfikowano więc jako epitelialne, mezenchymalne i epitelialno-mezenchymalne (lub bifenotypowe), ale nazewnictwo fenotypów CTCs nie jest ujednolicone³⁷. Przykładowo, Løppke i in.⁸⁰ w pRGK z wykorzystaniem systemu Parsortix®, zidentyfikowali CTCs o fenotypie K+CD45- u 67% (n=8/12), ale warto dodać, że nie zastosowano także żadnego markera mezenchymalnego, a ta metoda faworyzuje wykrywanie większych CTCs, gubiąc te o wielkości zbliżonej do BMCs⁸⁰. Z kolei, Chai i in.³⁶ w przerzutowym CRPC zidentyfikowali CTCs, o fenotypie K+ u 83,3% (n=57/68) i CTCs o fenotypie K+V+ u 26,5% (n=18/68) chorych, przy zastosowaniu barwienia immunofluorescencyjnego poprzedzającego wielowymiarową analizę HDSCA 3.0³⁶. W przypadku chorych oligometastatycznych z hormonozależnym RGK zidentyfikowano epitelialne CTCs (EpCAM+/K8/18/19+) u 56%, mezenchymalne (V+/Twist+) u 67% i epitelialno-mezenchymalne CTCs aż u 85% badanych chorych, z wykorzystaniem metody hybrydyzacji RNA in situ³⁷. Natomiast w niniejszej pracy zidentyfikowano epitelialne CTCs u 36%, epitelialno-mezenchymalne u 21%, mezenchymalne u 36% i podwójnie negatywne u 50% chorych z pRGK (**Wyniki 8.2.5**). Częstości występowania CTCs w niniejszej pracy są niższe niż w pracy Yang i in.³⁷, co może wynikać z różnic w metodologii. Jednak w obu badaniach wystąpiła zbliżona proporcja CTCs o fenotypach epi i mes. Fenotyp epitelialno-mezenchymalny przeważał u chorych oligometastatycznych badanych przez grupę Yang i in.³⁷, a u chorych pRGK badanych w niniejszej pracy - fenotyp podwójnie-negatywny. Detekcja konkretnych fenotypów CTCs wydaje się zależeć od stosowanej metody i wybranych markerów molekularnych, ale może być też związana ze stopniem zaawansowania choroby.

U analizowanych chorych na mżRGK w niniejszej pracy wykryto CTCs o 4 fenotypach: epitelialnym, epitelialno-mezenchymalnym, mezenchymalnym, a także nie opisane wcześniej potencjalne CTCs o fenotypie podwójnie-negatywnym (K-V-)(**Wyniki 8.2**). Są to unikalne komórki o dużym rozmiarze, które nie ekspresowały markerów włączających (tj. K i V) ani żadnego z 4 markerów wykluczających (αSMA, CD29, CD45, CD31). Należy podkreślić, że w próbkach pochodzących od zdrowych mężczyzn (n=20) nie wykryto obecności CTCs, w tym również komórek o fenotypie K-V-, ani K-V+ (**Wyniki 8.1**). Nowotworowy charakter komórek o wymienionych fenotypach w przyszłości należałoby potwierdzić z użyciem dodatkowych, specyficznych markerów dla CTCs. Z uwagi, że utrata markerów epitelialnych może być następstwem EMT, komórki te zostały zakwalifikowane jako potencjalne CTCs związane z EMT. Co więcej, komórki K-V- zidentyfikowano równolegle w raku piersi, jajnika i płuca^{54,63} przy zastosowaniu protokołu K/V opisanego w niniejszej pracy doktorskiej. Doniesienia o CTCs negatywnych na wszystkie stosowane markery, (tj. EpCAM, K, specyficzne markery raka wątroby: alfafetoproteine (AFP) i glipikan-3 (GPC3) oraz CD45), pojawiły się również w pracy opisującej chorych na raka wątroby, analizowanych z wykorzystaniem zdolności imFC do identyfikacji komórek o większej średnicy⁶¹. Co więcej, CTCs o tak sklasyfikowanym fenotypie negatywnym zidentyfikowano u 28% (19/69) chorych na ten nowotwór⁶¹. W mCRPC z wykorzystaniem immunofluorescencji również zidentyfikowano CTCs o fenotypie K-/CD45- u 83% (n=34/41) chorych. Warto podkreślić, że w tym badaniu nie stosowano markerów mezenchymalnych, więc mogą to być zarówno hipotetycznie komórki o fenotypie związanym z EMT (tj. mezenchymalne, bądź podwójnie negatywne)⁷⁵. Fakt, że obecność komórek nowotworowych o fenotypie K-V- w niniejszej pracy ma wartość kliniczną, obserwowana jest nie tylko na poziomie CTCs, ale też w guzach pierwotnych (**Wyniki 8.5.**), przerzutach (**Wyniki 8.2.5 i 8.2.6**) i biopsjach formalnych chorych na pRGK (dane nie zaprezentowane), dodatkowo wskazuje na ich potencjalnie nowotworowe pochodzenie i znaczenie w kontekście progresji RGK. Niniejsze dane podkreślają potrzebę poszukiwania alternatywnych markerów CTCs,

które pozwalałyby na ich jednoznaczną identyfikację, potwierdzającą pochodzenie nowotworowe.

9.2.3 Heterogenność RGK na poziomie CTCs

RGK jest znany z wysokiej heterogenności histologicznej i molekularnej w obrębie zarówno guza pierwotnego, jak i ognisk metastatycznych⁸¹, a wyniki prezentowane w pracy doktorskiej potwierdzają tę obserwację również na poziomie CTCs (**Wyniki 8.2.3 i 8.2.5**). Udział CTCs o różnych fenotypach EMT był bardzo zróżnicowany wśród chorych na RGK. W TDVB u większości chorych CTCs-pozytywnych występował więcej niż jeden fenotyp CTCs (83%), podobnie jak w PB, gdzie więcej niż jeden fenotyp CTCs zaobserwowano u 75% CTCs-pozytywnych chorych, a w przypadku pRGK heterogenność fenotypowa obserwowano u 36% CTCs-pozytywnych chorych. Jednocześnie wyniki te mogą wskazywać na obniżenie heterogenności fenotypów CTCs w PB w porównaniu do TDVB. Można zatem przypuszczać, że z ognisk guza uwalniane są różne populacje CTCs, a w krążeniu można zidentyfikować jedynie te, które są najbardziej odporne na stres związany z krążeniem. Alternatywnie można założyć, że mniejsza heterogenność CTCs w PB jest skutkiem uprzedniego już osiedlania się części CTCs o określonych fenotypach w innych organach. Z kolei wyniki przedstawione przez Tashireva i in.⁸² wskazują, że interpersonalna heterogenność fenotypów CTCs jest bardzo wysoka w raku piersi, a u żadnej chorej nie występował identyczny zestaw fenotypów CTCs. Heterogenność fenotypową można tłumaczyć ewolucją klonalną i plastycznością CTCs⁸³. Wskutek tych procesów w komórkach nowotworowych mogą zachodzić zmiany genetyczne i epigenetyczne, które modyfikują adaptacyjny i metastatyczny potencjał CTCs⁸⁴. Mimo wysokiej heterogenności genotypowej i fenotypowej CTCs, tylko niektóre z nich są zdolne do przetrwania w krwioobiegu i utworzenia przerzutów, a ich identyfikacja daje nadzieję na opracowanie skutecznych strategii terapeutycznych ograniczających powstawanie przerzutów⁸⁵.

9.2.4 Klastry CTCs w mżRGK

W danych literaturowych klastry CTCs pojawiają się w ujęciach homo- i heterotypowym, które wyróżniają klastry składające się tylko z CTCs oraz z CTCs i komórek krwi (głównie neutrofili) lub cCAFs⁸⁶⁻⁸⁷. Na potrzeby analiz w niniejszej pracy doktorskiej klastrami nazywano struktury składające się jedynie z CTCs (**Wyniki 8.2.4 i 8.2.6**), a CTCs w połączeniu z elementami morfotycznymi krwi, nazywano CTCs w interakcji z płytkami/erytrocytami/leukocytami (**Wyniki 8.3**).

Klastry CTCs zidentyfikowano w 31% (n=21/68) TDVB i w 10% (11/106) PB od chorych z mżRGK. Z kolei w PB od 31% (n=5/16) chorych z pRGK zidentyfikowano klastry składające się głównie z mezenchymalnych i podwójnie-negatywnych CTCs. Odsetek ten był znacznie niższy niż w przypadku danych literaturowych; Boya i in.⁸⁸ zidentyfikowali klastry CTCs u 75% (n=6/8) chorych z pRGK w PB zagęszczanej metodą mikrofiltracji przepływowej. Rozbieżności te mogą być konsekwencją bardziej zaawansowanego stadium choroby u chorych zrekrutowanych do badania Boya i in.⁸⁸ oraz zastosowania innej metody izolacji. Zbliżony wynik uzyskano w przypadku izolacji klastrów CTCs od chorych z przerzutowym RGK (67%, n=8/12), gdy detekcja CTCs była oparta jedynie o obecność keratyny 5 (K5) oraz EpCAM⁸⁹. Literatura wskazuje na korelację obecności klastrów CTCs we krwi chorych na mżRGK z krótszym OS⁹⁰. W niniejszej pracy doktorskiej obecność klastrów CTCs okazała się być jednak pozytywnym czynnikiem rokowniczym w kontekście wystąpienia BR u chorych w analizie wieloczynnikowej uwzględniającej wiek, stężenie PSA, status pT, pN, stopień zaawansowania w skali Gleasona, obecność różnych fenotypów pojedynczych CTCs i ich klastrów (**Wyniki 8.4**). Ponadto jedynie obecność pojedynczych CTCs korelowała z krótszym czasem do BR (p=0,007 CTCs K-/V- w TDVB oraz p=0,008 CTCs K-/V+ w całej grupie TDVB i/lub PB, **Wyniki 8.4**). CTCs występujące pojedynczo i w klastrach u chorych na raka wątroby i prostaty zidentyfikowali także Sun i in.⁹¹, jednakże podobnie jak w niniejszej pracy jedynie obecność pojedynczych CTCs korelowała w ich pracy z krótszym OS. Wspomniane wyniki mogą sugerować inny potencjał metastatyczny i znaczenie kliniczne występowania klastrów w zależności od badanego typu nowotworu. Można przypuszczać, że w RGK klastry CTCs

mogą mieć mniejszy potencjał do ekstrawazacji z naczyń krwionośnych do tkanek w porównaniu z pojedynczymi komórkami, jednak techniki zastosowane w pracy doktorskiej nie umożliwiają weryfikacji tej hipotezy.

Dotychczas mało wiadomo o kompozycji klastrow. W badanej grupie chorych na mZRGK zidentyfikowano klastry CTCs składające się z komórek o tym samym, bądź różnych fenotypach (**Wyniki 8.2.4**). Chai i in.³⁶ wskazują, że klastry składające się z CTCs o tym samym fenotypie mogły powstać w wyniku podziału jednej komórki lub agregacji CTCs o tym samym fenotypie, zaś klastry składające się z CTCs o różnych fenotypach – jedynie wskutek agregacji CTCs³⁶. Różnice fenotypowe CTCs wchodzących w skład klastrow mogą być także spowodowane różną plastycznością tych komórek i stopniem zaawansowania EMT³⁶. Poza pracami Naszego Zespołu^{53,63}, tylko jedna pozycja literaturowa⁶¹ ukazuje fotografie klastrow CTCs o zróżnicowanych fenotypach (tj. EpCAM+/CD45- i EpCAM-/K-/AFP-) oraz interakcje EpCAM-pozytywnych CTCs z komórkami krwi (CD45+) z użyciem imFC⁶¹. Analiza CTCs w klastrach jest skomplikowana nawet w przypadku dostępności fotografii wysokiej jakości, których wykonanie umożliwia używana technologia imFC, a jednocześnie praktycznie niemożliwa na takim poziomie szczegółowości z użyciem innych metod. Przez to, że klastry stanowią trójwymiarowe struktury, nie każda komórka w klastrze jest widoczna w dostatecznej ostrości, co znacznie utrudnia analizę. W niniejszej pracy po raz pierwszy tak szczegółowo przeanalizowano kompozycje klastrow, ukazującą ich zróżnicowanie fenotypowe, nawet na poziomie jednego klastra i przeanalizowano ich interakcje z normalnymi komórkami. Co pokazuje potrzebę dalszych badań w tej dziedzinie i określenia ich wpływu na progresję RGK w większej grupie chorych.

9.2.5 Potencjalne interakcje CTCs z elementami morfotycznymi krwi

W badanych próbkach po raz pierwszy szczegółowo przeanalizowano również interakcje CTCs z komórkami krwi, tj. leukocytami/krążącymi komórkami śródbłona (CD45/CD31-pozytywne), płytkami krwi

(analizowane w jasnym polu) i erytrocytami (analizowane w jasnym polu) (**Wyniki 8.3**).

Według mojej wiedzy, fotografie ukazujące interakcje CTCs z erytrocytami nie zostały dotychczas zaprezentowane w literaturze. Erytrocyty były identyfikowane jedynie na podstawie charakterystyki morfologicznej (w postaci dwuwklęsłych dysków), podobnie jak to było już analizowane przez Pinto et al.⁹². W niniejszej pracy zaobserwowano, że obecność pojedynczych CTCs łączących się z erytrocytami w TDVB i/lub PB (protokół K/V) jest skorelowana z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych u chorych z mZRGK ($p=0,041$), zaś obecność CTCs^{ERYTRO} w PB korelowała z krótszym czasem do wystąpienia BR ($p=0,022$) (**Wyniki 8.4**). Liczba chorych u których zaobserwowano takie interakcje jest niewielka, dlatego do tego wyniku trzeba podejść z ostrożnością, niemniej może to sugerować, że wykrywanie interakcji CTC z erytrocytami pozwoliłoby na dokładniejszą ocenę prognozy chorych na RGK. Komórki nowotworowe rzeczywiście mogą się łączyć z erytrocytami poprzez galektynę-4⁹³, a ekspresja galektyny-4 w RGK koreluje z gorszym przeżyciem chorych oraz częstszą wznową choroby, co może być konsekwencją jej wiązania do receptorów kinaz tyrozynowych i indukcji ścieżek sygnalizacyjnych związanych z EMT, inwazyjnością i przerzutowaniem⁹⁴. Dodatkowo, dwa niezależne badania wykazały, że w raku piersi i niedrobnokomórkowym raku płuc, skład białek błonowych erytrocytów może ulegać zmianie⁹⁵⁻⁹⁶. Zmiany zachodzące w zarówno w komórkach nowotworowych jak i samych erytrocytach mogłyby zatem promować tworzenie interakcji CTCs^{ERYTRO} potencjalnie także w RGK, wpływając tym samym na gorsze rokowanie chorych.

Spośród wszystkich interakcji CTCs z normalnymi komórkami, wykrywanymi w niniejszej pracy, klastry CTCs z leukocytami zostały dotychczas opisane najbardziej obszernie w literaturze, choć w niektórych pracach klasyfikowane są jako klastry CTCs heterotypowe, a w innych jako potencjalne interakcje leukocytów z CTCs^{90,97} wykazali, że obecność klastrow CTC^{LEUKO} była negatywnym czynnikiem prognostycznym w nowotworach litych. Szczerba i in.⁹⁸ skorelowali u chorych na przerzutowego raka piersi obecność minimum 1 CTC w interakcji z neutrofilami w porównaniu do obecności co najmniej 5 CTCs (bez interakcji z leukocytami) z krótszym

czasem przeżycia wolnego od progresji ($p=0,006$) i zwiększonym potencjałem metastatycznym, sugerując tym samym, że neutrofile wspomagają przetrwanie CTCs w krwioobiegu i chronią je przed komórkami układu immunologicznego. Schuster i in.⁸⁷ wykazali z kolei, że chore na przerzutowego raka piersi, u których występowały CTCs w interakcji z leukocytami, miały krótszy OS po zastosowanej terapii niż chore, u których nie występowały CTC^{LEUKO}. Natomiast w niniejszej pracy CTCs^{LEUKO} nie wykazały znaczenia prognostycznego w analizie wieloczynnikowej w kontekście wystąpienia BR (**Wyniki 8.4**), choć analiza ta może być obciążona błędem spowodowanym ciągle niewielką liczbą chorych z CTCs^{LEUKO}.

Płytki krwi były obecne na powierzchni aż 78,9% i 45,0% wszystkich CTCs zidentyfikowanych odpowiednio w TDVB i PB u CTCs-pozytywnych chorych z mZRGK (**Wyniki 8.3**). Płytki krwi mogą opłaszczać CTCs, uniemożliwiając ich identyfikację przez komórki układu immunologicznego i potencjalnie ułatwiając ich przetrwanie w krwioobiegu, ochraniając CTCs np. przed stresem związanym z przepływem⁹⁹⁻¹⁰⁰. W wyniku interakcji płytki-komórki nowotworowe w krwioobiegu może dochodzić do zwiększenia wydzielania TGF- β i PDGF przez płytki, co z kolei może promować indukcję EMT w komórkach nowotworowych²². W niniejszej pracy doktorskiej obserwowano opłaszczane płytkami CTCs głównie o fenotypie epitelialnym, co mogłoby sugerować, że zmniejszenie występowania CTCs o tym fenotypie w PB może wynikać z interakcji CTCs z płytkami i ich wpływu na zmianę fenotypu CTCs (**Wyniki 8.6**). Obserwowano także słabą pozytywną korelację pomiędzy obecnością pojedynczych epitelialnych CTCs (K+/V-) oraz epitelialnych CTCs opłaszczonych płytkami (K+/V-^{PLT}) ze stężeniem TGF- β w TDVB oraz z przedoperacyjnym poziomem płytek. Może to wskazywać, że to epitelialne CTCs są w jakiś sposób predysponowane do interakcji z płytkami, które mogą wydzielać TGF- β , wpływający m.in. na zmianę fenotypu EMT, co sugerowałoby płytko-zależną plastyczność CTCs w krwioobiegu obserwowaną między TDVB i PB. Niestety, ze względu na małą liczbę chorych, dla których był przebadany jednocześnie guz pierwotny i wykryte CTC zarówno w TDVB i PB niemożliwe jest dokładne prześledzenie i udowodnienie zmiany fenotypu zależnej

od płytek. W przyszłości potrzebne jest rozbudowanie kohorty chorych w celu kontynuacji badań w tej materii.

9.2.6 Fenotyp guzów pierwotnych a CTCs

W niniejszej pracy przeanalizowano także guzy pierwotne w celu określenia tempa ich proliferacji, stopnia unaczynienia i fenotypu (K/V) (**Wyniki 8.5**) i potencjalnego związku tych cech guza pierwotnego z rozsiewem komórek nowotworowych.

Zidentyfikowano komórki nowotworowe o 4 fenotypach: K+/V-; K+/V+; K-/V+ i K-/V-, identyfikowanych także na poziomie CTCs. Najczęściej obserwowano komórki nowotworowe o fenotypie epitelialnym (K+/V-, 75,9%, n=44), a ich obecność w guzie korelowała z częstszym występowaniem CTCs. Powyższe dane mogą wskazywać, że to właśnie z ognisk nowotworowych o epitelialnym fenotypie CTCs są częściej uwalniane do krwioobiegu i dopiero tam ulegają potencjalnej transformacji do innych fenotypów, choć nie można wykluczyć też rozsiewu komórek nowotworowych z innych ognisk guza pierwotnego. Badania w tej kwestii są niejednoznaczne. Schmidt i in. wykazali, że w RGK CTCs mogą być uwalniane z różnych, nawet mniejszych ognisk guza pierwotnego³⁹. Co ciekawe bardzo małe ogniska mogą dostarczać większej ilości CTCs niż większe skupiska komórek nowotworowych (n=6/20)³⁹. Natomiast w przypadku raka piersi stwierdzono, występowanie komórek nowotworowych o fenotypie epitelialnym, mezenchymalnym, ale także małej frakcji komórek epitelialno-mezenchymalnych w guzach pierwotnych i węzłach limfatycznych¹⁰¹, a CTCs również odzwierciedlały całe spektrum fenotypów EMT. Podczas progresji choroby obserwowano większy odsetek CTCs o fenotypie mezenchymalnym, który malał u chorych odpowiadających na stosowaną terapię¹⁰¹. W dodatku badania na mysim modelu RGK sugerują, że to właśnie populacja mezenchymalnych komórek nowotworowych w guzie odpowiada za progresję RGK i zróżnicowanie fenotypowe¹⁰².

Większość guzów charakteryzowała się wysokim odsetkiem komórek nowotworowych Ki-67-pozytywnych, niemniej to u chorych z guzami o niskim

potencjale proliferacyjnym częściej występowały EMT-CTCs w TDVB ($p=0,044$), co może wskazywać na rozsiew CTCs o potencjalnie bardziej agresywnym fenotypie przez guzy wolno proliferujące. Komórki o niskim potencjale proliferacyjnym mogą mieć bardziej odróżnicowany fenotyp, potencjalnie nawet cechy komórek macierzystych, co pokrywa się często z indukcją EMT.

Guzy pierwotne u 44,4% chorych ($n=40/90$) były bogato unaczynione, u tych chorych częściej obserwowano także EMT-CTCs w TDVB ($p=0,026$), co może wiązać się z łatwiejszym dostępem do naczyń krwionośnych i tym samym ułatwionym rozsiewem komórek nowotworowych. Co ciekawe, nasze wcześniejsze badania, przeprowadzone na dużej grupie chorych na mżRGK ($n=1200$) wskazały, że to ubogo unaczynione guzy mogą być związane z gorszym przeżyciem chorych. Można to to wytłumaczyć potencjalnie wyższą agresywnością komórek nowotworowych, indukowaną przez hipoksję prawdopodobnie występującą w fragmentach guzów o niskim unaczynieniu⁶⁴. Niemniej można zakładać, że w guzie zjawiska w guzach współwystępują dwa zupełnie różne efekty biologiczno-kliniczne wpływu liczby i dostępności naczyń na progresję choroby.

9.2.7 Identyfikacja cCAFs

Przedstawiony w pracy doktorskiej protokół K/V umożliwia jednoczesną analizę CTCs oraz innych komórek w krążeniu (**Wyniki 8.2.7**). W próbkach klinicznych od 2 chorych zaobserwowano cCAFs o fenotypach (K-/αSMA+/DAPI+/V+/CD45-&CD31- lub K-/αSMA+/DAPI+/V-/CD45-&CD31-). Jones i in.¹⁰³ z użyciem CellSearch® po raz pierwszy zidentyfikowali komórki o fenotypie K8/18/19-/DAPI+/CD45-/V+ we krwi chorych pRGK, nazywając je komórkami podobnymi do fibroblastów, choć kryteria identyfikacji tych komórek wskazują również, że mogły to być mezenchymalne CTCs¹⁰³. Z kolei Muchlińska i in. zidentyfikowali cCAFs o fenotypie αSMA+/K-/DAPI+/V±/CD45-/CD31- w nieprzerzutowym raku piersi⁶³, zaś Ao i in.¹⁰⁴ – cCAFs o fenotypie FAP+/αSMA+/CK-/CD45- w przerzutowym raku piersi. Z użyciem protokołu K/V w badaniach do pracy doktorskiej zidentyfikowano cCAFs współwystępujące z CTCs^{63,104}.

9.3 Biologiczne i kliniczne znaczenie CTCs uzyskanych protokołem AR/EGFR

Protokół AR/EGFR, pozwalający na identyfikację CTCs o potencjalnie bardziej agresywnym fenotypie, został zaprojektowany w oparciu o wcześniej opublikowane dane, w tym dane naszego Zespołu, wskazujące na potencjalną rolę EGFR w przerzutowaniu do kości u chorych z RGK^{47,105}. Ze względu na potencjalną użyteczność terapeutyczną oraz badania wstępne naszego Zespołu, wskazujące na szczególnie agresywny przebieg choroby w przypadku występowania fenotypu EGFR+/AR- w guzach pierwotnych i CTCs, z użyciem tego protokołu oceniono również ekspresję i lokalizację AR w CTCs, jednakże z powodu awarii urządzenia grupa badana tym protokołem była mniejsza i należy traktować je jako wyniki wstępne¹⁰⁶.

9.3.1 Fenotypy pojedynczych CTCs i klastrów

CTCs zidentyfikowano u 30% chorych mZRGK (n=22/74, **Wyniki 8.8**). Wyróżniono CTCs o fenotypach K-pozytywnym (K+/AR+/DAPI+/EGFR+; K+/AR-/DAPI+/EGFR+; K+/AR-/DAPI+/EGFR-; K-/AR-/DAPI+/EGFR+) i K-negatywnym (K-/AR-/DAPI+/EGFR-; K-/AR+/DAPI+/EGFR). Warto dodać, że CTCs AR+ o negatywnej/słabej ekspresji K wykryto wcześniej u chorych na RGK opornego na kastrację¹⁰⁷. Z użyciem protokołu AR/EGFR wykryto również klastry CTCs, które podobnie jak w przypadku protokołu K/V wykazywały znaczną heterogenność fenotypową. Bardzo zbliżona była także ich wykrywalność; klastry CTCs wystąpiły w PB od 13% chorych z mZRGK analizowanych protokołem AR/EGFR (**Wyniki 8.8**) oraz od 10% chorych analizowanych protokołem K/V (**Wyniki 8.2.4**).

Przyglądając się ekspresji AR w CTCs, jedynie obecność AR-pozytywnych CTCs korelowała z krótszym czasem do BR (p<0,001, **Wyniki 8.9**). Heterogenną ekspresję AR w pojedynczych CTCs stwierdzono już wcześniej w przypadku CRPC¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. AR pełni fundamentalną rolę w utrzymaniu funkcji

gruczołu krokowego, ale także w patogenezie RGK¹⁰⁹. Po związaniu z testosteronem AR ulega dimeryzacji i przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego, aktywując transkrypcję genów odpowiedzialnych za proliferację, migrację i progresję choroby¹¹⁰. We krwi wolna i dostępna dla komórek forma testosteronu stanowi jedynie 2% wszystkich jego form¹¹¹. Z tego powodu, spodziewano się, że cytoplazmatyczna lokalizacja AR będzie dominować w CTCs. Otrzymane w pracy wyniki wskazują, że w przypadku aż 61% AR-pozytywnych CTCs sygnał od AR był zlokalizowany cytoplazmatycznie, w 35% – jądrowo, zaś w 4% CTCs obserwowano jednocześnie cytoplazmatyczny i jądrowy sygnał AR (**Wyniki 8.8**). Podobne wyniki uzyskał Krawczyk i in.¹¹² w przerzutowym raku piersi (n=16): cytoplazmatyczna lokalizacja AR wystąpiła u 63% chorych CTC-pozytywnych, jądrowa u 31%, zaś współwystępowanie lokalizacji jądrowej i cytoplazmatycznej stwierdzono u 7% chorych. W przypadku mCRPC, McDaniel i in.⁷⁵ identyfikowali CTCs na podstawie ekspresji K, AR i markera wykluczającego CD45. U wszystkich badanych chorych (n=41) stwierdzono obecność CTCs o fenotypie K+/CD45-, a dodatkowo identyfikowano klastry K+/CD45- i mniej "klasyczne" CTCs o fenotypie K-AR+CD45-⁷⁵. Autorzy nie rozróżniali lokalizacji AR w poszczególnych CTCs, lecz na zaprezentowanych fotografiach można było zauważyć, że również w tym badaniu lokalizowano CTCs z jądrową i cytoplazmatyczną ekspresją⁷⁵. Natomiast w grupie chorych analizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, zarówno jądrowa, jak i cytoplazmatyczna lokalizacja tego receptora w CTCs miała znaczenie kliniczne i korelowała z krótszym czasem do wystąpienia BR (odpowiednio p=0,018 i p=0,014, **Wyniki 8.9**). Mimo niewielkiej liczebności badanej grupy chorych, wyniki zdają się potwierdzać, że jedynie w jednej trzeciej chorych AR-pozytywnych, ten receptor aktywnie pełni rolę regulatora transkrypcji albo może sugerować mutacje AR-V7 (lokalizacja jądrowa). W 30% (22/74) PB od chorych na mZRGK zidentyfikowano AR/EGFR-pozytywne CTCs, a ich obecność korelowała z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych (p=0,042). Hipotetycznie identyfikacja AR-pozytywnych CTCs dodatkowo może pozwolić na monitorowanie stanu zdrowia danego chorego podczas

stosowania terapii anty-androgenowej, jednak badania te trzeba przeprowadzić w kohorcie chorych leczonych w ten sposób.

Wbrew przewidywaniom, wyniki w niniejszej pracy nie wykazały znaczenia klinicznego ekspresji EGFR w CTCs, jednak liczba wykrytych CTCs o tym fenotypie była niewielka i należałoby ją prawdopodobnie odnieść do częstości występowania przerzutów po operacji. Pomimo, że obecność CTCs EGFR-pozytywnych i EGFR-negatywnych była związana z krótszym czasem do wystąpienia BR (odpowiednio $p=0,019$ i $p=0,008$), to badana grupa była zbyt mała, by otrzymać jednoznaczne wyniki efektu działania EGFR na częstość występowania BR u chorych. Obserwacje te są w zgodzie z wynikami uzyskanymi w poprzednich badaniach Naszego Zespołu, gdzie analizy tkanek ($n=1039$) i próbek krwi ($n=39$) od chorych na RGK sugerowały rolę EGFR w przerzutowaniu do kości⁴⁷.

Obecność zarówno K-pozytywnych, jak i K-negatywnych CTCs korelowała z krótszym czasem do wystąpienia BR (odpowiednio $p=0,002$ i $p=0,026$, **Wyniki 8.9**), tak samo jak obecność EGFR-pozytywnych i EGFR-negatywnych CTCs (odpowiednio, $p=0,019$ i $p=0,008$), co może wskazywać, że to sama obecność CTCs może być związana z występowaniem BR, niemniej te przypuszczenia powinny zostać potwierdzone na większej grupie chorych. Ponadto, analizy wieloczynnikowe wykazały, że obecność CTCs o fenotypie K-/AR-/EGFR- ($p=0,040$) i K-/AR+/EGFR- ($p<0,001$), a także CTCs K-pozytywne ($p=0,024$) były niezależnymi czynnikami związanymi z gorszą prognozą u chorych z mzRGK. Jednakże, fenotypy CTCs zidentyfikowane z użyciem protokołu AR/EGFR były tak zróżnicowane, że wyodrębnienie tych o największym znaczeniu klinicznym wymagałoby zastosowania bardziej zaawansowanych metod statystycznych i/lub analiz przeprowadzonych na większej grupie chorych.

9.3.2 Potencjalne interakcje CTCs z elementami morfotycznymi krwi

Z użyciem protokołu AR/EGFR przeanalizowano również związek obecności CTCs w interakcjach z normalnymi komórkami krwi (CTCs^{LEUKO}, CTCs^{ERYTRO},

CTCs^{PLT}) z przeżyciem wolnym od BR (**Wyniki 8.9**). Obecność pojedynczych CTCs^{PLT} i klastrow CTCs^{PLT} korelowała z krótszym czasem do wystąpienia BR w porównaniu do obecności samych CTCs bez płytek ($p=0,005$). Jednakże, ten wynik nie okazał się znamienny statystycznie w analizie wieloczynnikowej.

9.3.3 Porównanie identyfikacji CTCs z użyciem protokołu K/V i AR/EGFR

Porównując oba protokoły zastosowane w niniejszej pracy - K/V (badający ogólny rozsiew CTCs) i AR/EGFR (badający rozsiew CTCs w kontekście terapii anty-androgenowej i przerzutów do kości), bazowano na obecności CTCs K-pozytywnych bądź K-negatywnych (jedyny wspólny marker wykorzystywany w obu protokołach). Uzyskano wysoką zgodność wykrywania CTCs w zakresie określania statusu obecności CTCs u badanych chorych (CTCs-pozytywni/CTCs-negatywni) w obu analizach – odpowiednio 63% i 78% chorych z mRGK i pRGK (**Wyniki 8.10**). W taki sam sposób porównano też zgodność wyników dotyczących identyfikacji klastrow CTCs w próbkach, uzyskując zgodność odpowiednio 79% i 100% u chorych z mRGK i pRGK. Otrzymane wyniki wskazują, że techniczne różnice w przeprowadzaniu barwienia fluorescencyjnego, takie jak różna liczba wirowań i czas barwienia (protokół jedno- lub dwudniowy), nie wpłynęły znacznie na skuteczność identyfikacji CTCs. Ewentualne różnice mogą też wynikać z mniejszej ilości analizowanych komórek w bramce DAPI+ w protokole AR/EGFR, których część mogła zostać utracona podczas większej liczby wirowań w protokole obejmującym całonocne barwienie. W dodatku, identyczne wyniki obecności lub braku klastrow CTCs u tych samych chorych (protokół K/V i AR/EGFR), potwierdza to, że nie powstają one jako techniczny artefakt, lecz mogą rzeczywiście współwystępować z pojedynczymi CTCs we krwi. Wyzwaniem w takich analizach jest również sama natura płynnych biopsji, które poddają analizie jedynie bardzo małą objętość krwi chorego. Należy pamiętać, że komórki krwi oraz CTCs są tracone na każdym etapie późniejszego procesowania próbki, a każda badana próbka pofrakcjonowanej krwi może mieć różną (przypadkową) zawartość

poszukiwanych populacji komórek. Biorąc pod uwagę rzadkość występowania CTCs i jednak stosunkowo niewielką liczbę utrwalanych BMCs przypadających na chorego, uzyskane wyniki wydają się bardzo spójne.

10. PODSUMOWANIE

Prezentowane w pracy dane potwierdzają, że płynne biopsje są bardzo kompleksową dziedziną, która daje ogromne możliwości analiz, pozwalających wejść w biologię nowotworów, a także zidentyfikować podtypy CTCs o znaczeniu klinicznym.

Nawiązując do pierwszego celu szczegółowego, w niniejszej pracy doktorskiej wprowadzono dwa udoskonalenia w stosunku do standardowych płynnych biopsji w postaci analizy, w której po raz pierwszy zastosowano TDVB w RGK i nowoczesną technologię imFC w płynnych biopsjach, również stosowaną pierwszy raz, w tym typie nowotworu. Przeprowadzone badania umożliwiły pionierskie i niezwykle szczegółowe analizy porównujące obecność, liczbę i fenotypy CTCs w dwóch typach próbek klinicznych – PB i TDVB u chorych na mżRGK i PB u chorych z pRGK, pozwalając prześledzić proces rozsiewu komórek nowotworach. Co więcej, zastosowana technologia (imFC) w porównaniu do klinicznie zatwierdzonego systemu CellSearch® pozwoliła na zidentyfikowanie nowych fenotypów CTCs, niemożliwych do wykrycia wspomnianą wcześniej metodą (K-/V+ i K-/V-). Technologia imFC umożliwiła ocenę różnych parametrów i szczegółów morfologicznych w CTCs, stanowiących ogromny zbiór unikalnych danych, takich jak potencjalne interakcje z innymi komórkami krwi jak i dokładną ocenę klastrow CTCs. Pozyskane fotografie mogą również posłużyć do analizy wielu innych cech, które dotychczas zaobserwowaliśmy, np. kształt i elongacja CTCs, stosunek jądra do cytoplazmy, średnica CTCs poszczególnych fenotypów, występowanie mikrojąder. W przyszłości, zostaną zastosowane dodatkowe markery pozwalające na jeszcze dokładniejszą charakterystykę kolejnych cech CTCs i potwierdzenie pochodzenia komórek o fenotypie mezenchymalnym i podwójnie-negatywnym, a także poszukiwania nowych, specyficznych markerów umożliwiających charakteryzację wszystkich subpopulacji CTCs różniących się pod względem fenotypu i ich roli w progresji RGK. Jednak trzeba być świadomym, że tak duża ilość danych

może także utrudniać wyodrębnienie z analiz tych czynników, które tak naprawdę będą miały znaczenie w praktyce klinicznej.

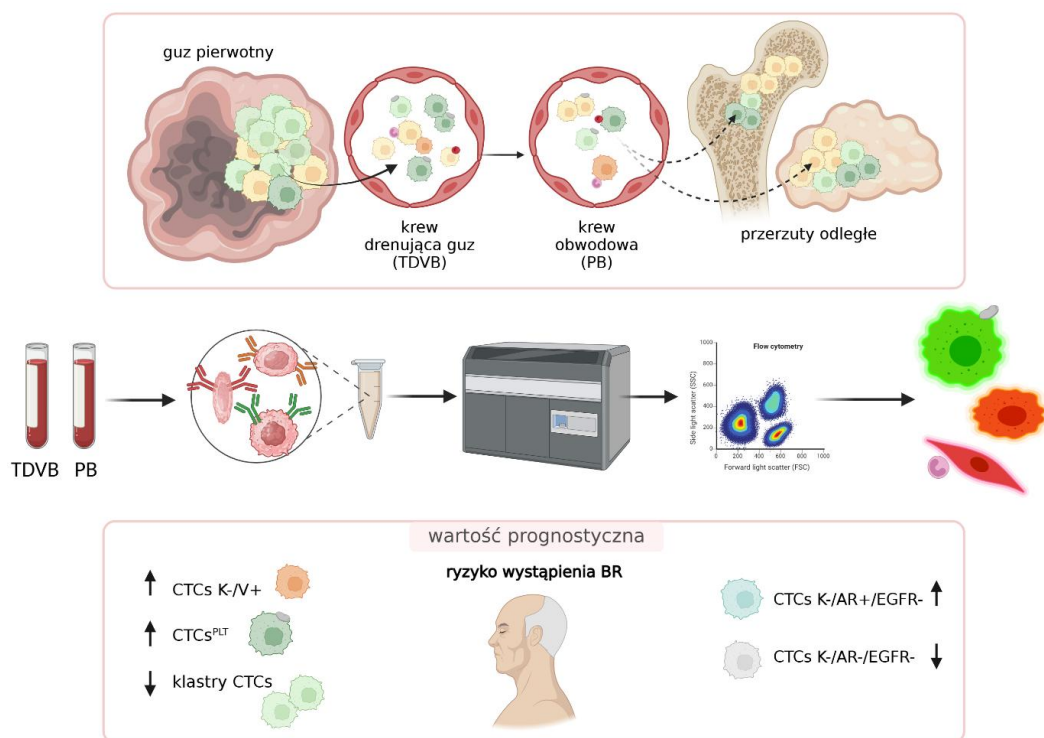
W ramach realizacji drugiego i trzeciego celu szczegółowego wykazano, że u chorych z mZRGK identyfikowano istotnie częściej i w większej liczbie CTCs w TDVB niż w PB. Ten wynik potwierdza, że żyła drenująca guz jest obiecującym obiektem badawczym w płynnych biopsjach, gdyż ukazuje CTCs w stanie jeszcze niezmienionym przez przepływ krwi w krążeniu. Podczas analiz, zidentyfikowano wspomniane interakcje CTCs z leukocytami/komórkami śródbłonna, erytrocytami i płytkami krwi. Co więcej, analiza przeżycia chorych w kontekście analizowanych populacji CTC wykazała, że obecność CTCs w interakcji z erytrocytami była związana z krótszym czasem do wystąpienia BR. Z kolei, analizy wieloczynnikowe wskazały, że to obecność mezenchymalnych CTCs i CTCs w interakcji z płytkami była negatywnym czynnikiem rokowniczym w kontekście BR.

Realizując czwarty cel szczegółowy, zidentyfikowano 7 fenotypów CTCs z użyciem protokołu AR/EGFR. W przypadku lokalizacji receptora AR, dominowała lokalizacja cytoplazmatyczna, co potencjalnie może wskazywać na brak aktywnego udziału w regulacji transkrypcji. Co ciekawe, obecność CTCs o jakimkolwiek fenotypie oraz CTCs EGFR-negatywne oraz CTCs AR-pozytywne korelowały z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych u chorych na mZRGK. Natomiast analizy wieloczynnikowe wykazały, że CTCs o fenotypie K-/AR+/EGFR- były negatywnym czynnikiem prognostycznym, a CTCs o fenotypie K-/AR-/EGFR- była pozytywnym czynnikiem w kontekście wystąpienia BR.

Nawiązując do piątego celu szczegółowego, porównano dwa protokoły w kontekście skuteczności identyfikacji CTCs. Porównywano obecność K- pozytywnych i K-negatywnych CTCs ze względu na to, że K była jednym wspólnym markerem badanym w obu analizach. Otrzymano wysoką zgodność wykrywania pojedynczych CTCs, która wyniosła 63% w mZRGK, oraz 78% w pZRGK oraz klastrów, odpowiednio 79% i 100%, co potwierdza powtarzalność analiz z wykorzystaniem imFC w płynnych biopsjach.

Podsumowując, opisane cele pozwoliły na pogłębienie wiedzy o CTCs w TDVB i PB u chorych z mZRGK, a także pZRGK, przy wykorzystaniu

nowoczesnej technologii, wykrywającej szerokie spektrum fenotypów. Uzyskane wyniki potencjalnie mogą zostać w przyszłości wykorzystane do wspierania decyzji terapeutycznych u chorych na RGK.



Rycina 51. Graficzne podsumowanie wyników opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Panel górny – schemat pokazuje komórki nowotworowe, które wydostały się z guza pierwotnego do krążenia, w pierwszych sekundach znajdują się w TDVB, a następnie trafiają do PB, gdzie przy sprzyjających warunkach mogą tworzyć (mikro)przerzuty odległe. Panel środkowy – schemat analiz zastosowany w niniejszej pracy: wyizolowanie komórek BMCs i potencjalnych CTCs od chorych na RGK z TDVB i/lub PB, wyznakowanie fluorescencyjne komórek i ich analiza z użyciem technologii imFC. Panel dolny – wartość prognostyczna wybranych populacji CTC badanych w niniejszej pracy. Zidentyfikowane CTCs z użyciem dwóch protokołów (K/V i AR/EGFR) wykazały wartość prognostyczną. CTCs o fenotypie K-/V+, K-/AR+/EGFR- i pojedyncze CTCs^{PLT} korelowały z krótszym czasem do wystąpienia BR. Natomiast, klastry CTCs i CTCs o fenotypie K-/AR-/EGFR- były istotnie związane z mniejszym ryzykiem wystąpienia BR u chorych na RGK. PB – krew obwodowa, TDVB – krew drenująca guz, CTCs – krążące komórki nowotworowe, BR – wznova biochemiczna, K – keratyna, V – wimentyna, CTCs^{PLT} – krążące komórki nowotworowe w interakcji z płytkami, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu.

11. TABELE UZUPEŁNIAJĄCE

Tabela U1. Analiza wieloczynnikowa według metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa obejmująca wiek chorych, parametry kliniczne guza, fenotypy i klastry CTCs oznaczane w protokole K/V. PSA – stężenie antygenu sterczowego, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, K+V- - CTCs o fenotypie epitelialnym, K+V+ - CTCs o fenotypie epitelialno-mezenchymalnym, K-V+ - CTCs o fenotypie mezenchymalnym, K-V- - CTCs o fenotypie podwójnie-negatywnym, HR – hazard względny, CI – przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

		wartość p	HR	CI 95%	
				Dolny	Górny
Krok 1.	wiek >65 vs. <65	0,598	0,815	0,380	1,746
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,813	1,112	0,462	2,675
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,087	2,184	0,892	5,348
	status pN poz vs. neg	0,001	7,005	2,247	21,841
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,033	2,506	1,077	5,831
	K+V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,470	1,659	0,419	6,565
	K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,222	2,518	0,572	11,090
	K+V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,325	2,146	0,469	9,827
	K-V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,157	3,837	0,597	24,658
Krok 2.	klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,008	0,069	0,010	0,492
	wiek >65 vs. <65	0,609	0,820	0,383	1,754
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,077	2,222	0,917	5,386
	status pN poz vs. neg	0,001	6,885	2,236	21,200
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,014	2,613	1,213	5,632
	K+V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,446	1,695	0,436	6,586
	K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,196	2,611	0,610	11,175
	K+V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,327	2,146	0,466	9,891
	K-V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,150	3,527	0,635	19,598
Krok 3.	klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,008	0,070	0,010	0,495
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,086	2,163	0,897	5,216
	status pN poz vs. neg	0,001	6,692	2,189	20,456
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,012	2,683	1,247	5,772
	K+V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,488	1,623	0,413	6,376
	K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,167	2,797	0,650	12,039
	K+V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,359	2,045	0,444	9,422
	K-V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,168	3,277	0,606	17,714
Krok 4.	klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,008	0,075	0,011	0,502
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,103	2,029	0,868	4,746
	status pN poz vs. neg	0,001	6,798	2,222	20,798
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,011	2,703	1,255	5,822
	K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,119	3,177	0,744	13,578
	K+V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,344	2,123	0,447	10,083
	K-V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,159	3,538	0,610	20,521
Krok 5.	klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,012	0,097	0,016	0,595
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,149	1,817	0,808	4,087
	status pN poz vs. neg	0,001	7,136	2,318	21,974
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,005	2,930	1,381	6,215
	K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,003	5,122	1,760	14,910
	K-V- CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,233	3,110	0,481	20,096
Krok 6.	klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,028	0,150	0,028	0,812
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,164	1,775	0,791	3,980
	status pN poz vs. neg	0,001	6,687	2,166	20,638
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,004	3,011	1,420	6,385
	K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,000	6,644	2,650	16,656
Krok 7.	klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,030	0,320	0,115	0,895
	status pN poz vs. neg	0,000	8,691	2,940	25,687
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,002	3,280	1,562	6,889
	K-V+ CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,000	6,700	2,708	16,577
Krok 7.	klastry CTCs w TDVB/PB poz vs. neg	0,035	0,334	0,121	0,927

Tabela U2. Analiza wieloczynnikowa według metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa obejmująca wiek chorych, parametry kliniczne guza, interakcje pojedynczych CTCs i klastrow oznaczane w protokole K/V. Pt – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, K+V+ - CTCs o fenotypie epithelialnym, K+V- - CTCs o fenotypie epithelialno-mezenchymalnym, K-V+ - CTCs o fenotypie mezenchymalnym, K-V- - CTCs o fenotypie podwójnie-negatywnym, CTCs^{LEUKO} – CTCs w interakcji z leukocytami/komórkami śródbłonna, CTCs^{ERYTRO} – CTCs w interakcji z erytrocytami, CTCs^{PLT} – CTCs w interakcji z płytkami, HR – hazard względny, CI – przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

		wartość p	HR	CI 95%	
				Dolny	Górny
Krok 1.	wiek >65 vs. <65	0,942	1,028	0,486	2,173
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,200	1,679	0,761	3,709
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,041	2,374	1,037	5,431
	status pN poz vs. neg	0,002	6,487	1,986	21,194
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,034	2,535	1,075	5,981
	klastry CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,082	0,106	0,008	1,330
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,230	2,777	0,524	14,719
	klastry CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,066	11,235	0,850	148,464
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,127	0,270	0,050	1,450
	klastry CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,438	0,582	0,148	2,286
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,003	4,313	1,660	11,207
Krok 2.	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,199	1,681	0,761	3,713
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,037	2,385	1,053	5,400
	status pN poz vs. neg	0,002	6,525	2,018	21,097
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,032	2,521	1,084	5,862
	klastry CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,082	0,106	0,009	1,330
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,229	2,783	0,525	14,742
	klastry CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,065	11,091	0,859	143,217
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,126	0,269	0,050	1,444
	klastry CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,440	0,584	0,149	2,286
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,003	4,302	1,659	11,156
Krok 3.	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,176	1,724	0,783	3,797
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,034	2,424	1,068	5,505
	status pN poz vs. neg	0,002	6,334	1,931	20,780
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,032	2,537	1,085	5,929
	klastry CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,055	0,088	0,007	1,048
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,289	2,324	0,489	11,039
	klastry CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,069	10,857	0,833	141,516
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,035	0,199	0,044	0,890
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,004	3,598	1,497	8,651
Krok 4.	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,173	1,717	0,789	3,736
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,039	2,335	1,042	5,230
	status pN poz vs. neg	0,003	6,368	1,915	21,176
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,031	2,533	1,090	5,885
	klastry CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,094	0,161	0,019	1,364
	klastry CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,098	8,031	0,680	94,839
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,051	0,240	0,057	1,004
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,002	3,931	1,687	9,162
Krok 5.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,040	2,296	1,037	5,081
	status pN poz vs. neg	0,003	6,046	1,870	19,544
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,004	3,123	1,430	6,819
	klastry CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,124	0,188	0,022	1,584
	klastry CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,115	7,079	0,622	80,614
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,051	0,249	0,061	1,007
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,003	3,727	1,583	8,774
Krok 6.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,054	2,142	0,988	4,646
	status pN poz vs. neg	0,004	5,410	1,698	17,232
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,006	2,929	1,363	6,291
	klastry CTCs ^{LEUKO} w TDVB/PB poz vs. Neg	0,130	0,194	0,023	1,624
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,091	0,342	0,099	1,186
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,003	3,643	1,565	8,480

Tabela U3. Analiza wieloczynnikowa według metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa obejmująca wiek chorych, parametry kliniczne guza, fenotypy CTCs oznaczane w protokole AR/EGFR. PSA – stężenie antygenu sterczowego, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, PB – krew obwodowa, CTCs – krążące komórki nowotworowe, K- keratyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu, HR – hazard względny, CI – przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

		wartość p	HR	CI 95%	
				Dolny	Górny
Krok 1.	wiek >65 vs. <65	0,390	1,661	0,522	5,293
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,705	0,805	0,261	2,476
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,182	2,101	0,707	6,246
	status pN poz vs. neg	0,025	3,962	1,192	13,168
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,160	2,215	0,731	6,708
	K+AR+EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,488	1,788	0,346	9,232
	K+AR-EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,192	5,710	0,417	78,221
	K+AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,780	0,694	0,053	9,017
	K+AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,623	1,664	0,219	12,659
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,147	0,220	0,028	1,705
Krok 2.	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,019	8,589	1,432	51,513
	wiek >65 vs. <65	0,391	1,656	0,523	5,248
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,751	0,839	0,284	2,481
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,175	2,121	0,715	6,285
	status pN poz vs. neg	0,022	4,010	1,219	13,190
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,169	2,128	0,726	6,239
	K+AR+EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,455	1,849	0,368	9,284
	K+AR-EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,199	5,467	0,409	73,086
	K+AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,695	1,376	0,279	6,782
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,043	0,184	0,036	0,947
Krok 3.	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,016	8,919	1,508	52,741
	wiek >65 vs. <65	0,377	1,681	0,531	5,323
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,138	2,223	0,774	6,390
	status pN poz vs. neg	0,023	3,832	1,206	12,176
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,171	1,982	0,744	5,280
	K+AR+EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,500	1,697	0,364	7,911
	K+AR-EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,207	4,641	0,427	50,429
	K+AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,705	1,366	0,271	6,879
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,043	0,188	0,037	0,951
	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,013	9,349	1,589	54,994
Krok 4.	wiek >65 vs. <65	0,328	1,761	0,566	5,476
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,151	2,111	0,761	5,857
	status pN poz vs. neg	0,017	3,976	1,276	12,385
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,166	1,993	0,751	5,291
	K+AR+EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,415	1,848	0,423	8,073
	K+AR-EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,180	5,029	0,475	53,192
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,040	0,210	0,048	0,930
	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,003	10,964	2,292	52,452
Krok 5.	wiek >65 vs. <65	0,320	1,751	0,580	5,286
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,141	2,134	0,778	5,853
	status pN poz vs. neg	0,022	3,736	1,206	11,573
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,251	1,714	0,683	4,302
	K+AR+EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,222	4,220	0,418	42,663
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,043	0,219	0,051	0,951
	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,001	12,690	2,757	58,415
Krok 6.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,112	2,271	0,826	6,238
	status pN poz vs. neg	0,010	4,255	1,408	12,861
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,183	1,843	0,750	4,529
	K+AR+EGFR+ CTCs w PB poz vs. neg	0,254	3,818	0,383	38,084
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,043	0,217	0,049	0,956
	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,001	8,687	2,314	32,607
Krok 7.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,104	2,301	0,843	6,280
	status pN poz vs. neg	0,013	4,045	1,349	12,131
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,153	1,906	0,787	4,619
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,058	0,259	0,064	1,046
Krok 8.	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,001	8,329	2,267	30,595
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,054	2,642	0,984	7,093
	status pN poz vs. neg	0,022	3,509	1,199	10,271
	K-AR-EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	0,040	0,237	0,060	0,938
	K-AR+EGFR- CTCs w PB poz vs. neg	<0,001	11,290	3,338	38,182

Tabela U4. Analiza wieloczynnikowa według metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa obejmująca wiek chorych, parametry kliniczne guza, interakcje pojedynczych CTCs i klastrów oznaczane w protokole AR/EGFR. PSA – stężenie antygenu sterczowego, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, PB – krew obwodowa, CTCs^{LEUKO} – krążące komórki nowotworowe w interakcji z leukocytami/komórkami śródbłonna, CTCs^{ERYTRO} – krążące komórki nowotworowe w interakcji z erytrocytami, CTCs^{PLT} – krążące komórki nowotworowe w interakcji z płytkami, K- keratyna, AR – receptor androgenowy, EGFR – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu, HR – hazard względny, CI – przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

		wartość p	HR	CI 95%	
				Dolny	Górny
Krok 1.	wiek >65 vs. <65	0,934	1,048	0,347	3,161
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,351	0,620	0,227	1,694
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,287	1,814	0,605	5,438
	status pN poz vs. neg	0,021	3,692	1,219	11,185
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,007	3,467	1,400	8,590
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w PB poz vs. neg	0,332	9,699	0,098	955,267
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w PB poz vs. neg	0,385	0,169	0,003	9,347
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w PB poz vs. neg	0,173	2,263	0,699	7,329
	klastry CTCs ^{ERYTRO} w PB poz vs. neg	0,995	0,987	0,021	46,385
	klastry CTCs ^{PLT} w PB poz vs. neg	0,809	1,252	0,203	7,720
Krok 2.	wiek >65 vs. <65	0,933	1,048	0,350	3,139
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,347	0,620	0,229	1,679
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,287	1,814	0,606	5,430
	status pN poz vs. neg	0,021	3,693	1,220	11,178
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,007	3,468	1,402	8,578
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w PB poz vs. neg	0,142	9,809	0,465	206,993
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w PB poz vs. neg	0,155	0,167	0,014	1,967
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w PB poz vs. neg	0,173	2,263	0,699	7,328
	klastry CTCs ^{PLT} w PB poz vs. neg	0,809	1,252	0,203	7,708
Krok 3.	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,348	0,621	0,229	1,681
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,241	1,845	0,663	5,138
	status pN poz vs. neg	0,019	3,720	1,244	11,119
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,007	3,473	1,404	8,588
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w PB poz vs. neg	0,142	9,681	0,466	201,090
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w PB poz vs. neg	0,155	0,169	0,015	1,957
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w PB poz vs. neg	0,171	2,270	0,702	7,337
Krok 4.	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,349	0,622	0,231	1,679
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,245	1,836	0,659	5,115
	status pN poz vs. neg	0,018	3,751	1,259	11,179
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,007	3,425	1,402	8,366
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w PB poz vs. neg	0,142	9,694	0,466	201,483
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w PB poz vs. neg	0,148	0,190	0,020	1,807
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w PB poz vs. neg	0,073	2,443	0,919	6,496
Krok 5.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,196	1,959	0,707	5,427
	status pN poz vs. neg	0,023	3,495	1,190	10,264
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,012	2,941	1,266	6,832
	pojedyncze CTCs ^{LEUKO} w PB poz vs. neg	0,223	5,886	0,340	101,752
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w PB poz vs. neg	0,207	0,240	0,026	2,200
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w PB poz vs. neg	0,082	2,384	0,895	6,348
Krok 6.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,169	2,029	0,740	5,561
	status pN poz vs. neg	0,026	3,374	1,156	9,852
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,013	2,890	1,246	6,703
	pojedyncze CTCs ^{ERYTRO} w TDVB/PB poz vs. neg	0,323	0,422	0,076	2,334
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,090	2,323	0,877	6,151
Krok 7.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,141	2,116	0,780	5,746
	status pN poz vs. neg	0,021	3,527	1,211	10,274
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,029	2,416	1,096	5,326
	pojedyncze CTCs ^{PLT} w TDVB/PB poz vs. neg	0,189	1,798	0,748	4,322
Krok 8.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,059	2,506	0,965	6,509
	status pN poz vs. neg	0,028	3,209	1,132	9,098
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,022	2,508	1,143	5,506

Tabela U5. Analiza wieloczynnikowa według metody krokowej regresji proporcjonalnego hazardu Coxa obejmująca wiek chorych, parametry kliniczne guza, różne fenotypy CTCs oznaczane w protokole AR/EGFR. PSA – stężenie antygenu sterczowego, pT – wielkość guza pierwotnego, pN – stopień zajęcia węzłów chłonnych, PB – krew obwodowa, CTCs AR-/AR+ – krążące komórki nowotworowe negatywne/pozytywne pod kątem receptora androgenowego, CTCs K-/K+ – krążące komórki nowotworowe negatywne/pozytywne pod kątem keratyny, CTCs EGFR-/EGFR+ – krążące komórki nowotworowe negatywne/pozytywne pod kątem receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu, HR – hazard względny, CI – przedział ufności, poz – pozytywne, neg – negatywne.

		wartość p	HR	CI 95%	
				Dolny	Górny
Krok 1.	wiek >65 vs. <65	0,661	1,266	0,441	3,633
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,674	0,780	0,246	2,479
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,268	1,866	0,619	5,622
	status pN poz vs. neg	0,017	4,294	1,297	14,220
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,040	2,972	1,052	8,399
	CTCs AR- w PB poz vs. neg	0,212	0,232	0,023	2,300
	CTCs AR+ w PB poz vs. neg	0,976	0,944	0,021	41,220
	CTCs EGFR- w PB poz vs. neg	0,889	1,218	0,076	19,484
	CTCs EGFR+ w PB poz vs. neg	0,426	2,085	0,342	12,727
	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,656	2,062	0,085	49,920
	CTCs K- w PB poz vs. neg	0,391	3,444	0,205	57,928
Krok 2.	wiek >65 vs. <65	0,649	1,270	0,454	3,557
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,648	0,787	0,281	2,201
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,257	1,859	0,636	5,434
	status pN poz vs. neg	0,017	4,297	1,299	14,216
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,029	2,956	1,116	7,824
	CTCs AR- w PB poz vs. neg	0,098	0,237	0,043	1,303
	CTCs EGFR- w PB poz vs. neg	0,890	1,198	0,093	15,378
	CTCs EGFR+ w PB poz vs. neg	0,420	2,074	0,352	12,214
	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,460	1,980	0,323	12,147
	CTCs K- w PB poz vs. neg	0,362	3,389	0,246	46,781
Krok 3.	wiek >65 vs. <65	0,642	1,276	0,457	3,565
	stężenie PSA >10 vs. <10 ng/ml	0,650	0,788	0,281	2,208
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	2,470	1,874	0,646	5,434
	status pN poz vs. neg	0,017	4,290	1,302	14,136
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,028	2,919	1,119	7,610
	CTCs AR- w PB poz vs. neg	0,098	0,235	0,042	1,304
	CTCs EGFR+ w PB poz vs. neg	0,428	2,017	0,355	11,456
	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,362	2,105	0,425	10,420
	CTCs K- w PB poz vs. neg	0,105	3,923	0,750	20,527
Krok 4.	wiek >65 vs. <65	0,660	1,258	0,452	3,499
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,192	1,997	0,706	5,647
	status pN poz vs. neg	0,019	4,007	1,255	12,788
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,027	2,669	1,117	6,376
	CTCs AR- w PB poz vs. neg	0,097	0,235	0,043	1,301
	CTCs EGFR+ w PB poz vs. neg	0,504	1,723	0,349	8,514
	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,279	2,335	0,503	10,837
	CTCs K- w PB poz vs. neg	0,115	3,764	0,725	19,534
Krok 5.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,146	2,118	0,770	5,822
	status pN poz vs. neg	0,015	4,162	1,324	13,082
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,028	2,650	1,111	6,321
	CTCs AR- w PB poz vs. neg	0,102	0,239	0,043	1,327
	CTCs EGFR+ w PB poz vs. neg	0,513	1,695	0,348	8,256
	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,293	2,305	0,486	10,934
	CTCs K- w PB poz vs. neg	0,128	3,314	0,709	15,496
Krok 6.	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,130	2,170	0,797	5,914
	status pN poz vs. neg	0,021	3,742	1,225	11,429
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,038	2,440	1,051	5,663
	CTCs AR- w PB poz vs. neg	0,078	0,214	0,038	1,192
	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,084	3,072	0,858	10,992
Krok 7.	CTCs K- w PB poz vs. neg	0,124	3,397	0,716	16,118
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,132	2,140	0,795	5,760
	status pN poz vs. neg	0,023	3,583	1,194	10,758
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,018	2,710	1,186	6,192
	CTCs AR- w PB poz vs. neg	0,362	0,516	0,124	2,140
Krok 8.	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,04	3,836	1,061	13,870
	status pT 3a-3c vs. 2a-2b	0,163	2,017	0,754	5,397
	status pN poz vs. neg	0,013	3,945	1,337	11,645
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,024	2,557	1,135	5,763
Krok 9.	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,052	2,444	0,991	6,030
	status pN poz vs. neg	0,002	5,270	1,875	14,815
	skala Gleasona >7 vs. 7	0,014	2,751	1,229	6,159
	CTCs K+ w PB poz vs. neg	0,024	2,799	1,144	6,850

12. PIŚMIENNICTWO

1. Bergengren O, Pekala KR, Matsoukas K, Fainberg J, Mungovan SF, Bratt O, Bray F, Brawley O, Luckenbaugh AN, Mucci L, Morgan TM, Carlsson SV. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review. *Eur Urol*. 2023 Aug;84(2):191-206.
2. Cancer Today [Internet], cytowanie z 25.02.2025, <https://gco.iarc.fr/>
3. Kensler KH, Rebbeck TR. Cancer Progress and Priorities: Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2020 Feb;29(2):267-277.
4. Lee JT, Lehmann BD, Terrian DM, Chappell WH, Stivala F, Libra M, Martelli AM, Steelman LS, McCubrey JA. Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle*. 2008 Jun 15;7(12):1745-62.
5. McHugh J, Saunders EJ, Dadaev T, McGrowder E, Bancroft E, Kote-Jarai Z, Eeles R. Prostate cancer risk in men of differing genetic ancestry and approaches to disease screening and management in these groups. *Br J Cancer*. 2022 Jun;126(10):1366-1373.
6. Shore ND, Moul JW, Pienta KJ, Czernin J, King MT, Freedland SJ. Biochemical recurrence in patients with prostate cancer after primary definitive therapy: treatment based on risk stratification. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2023 Sep 7.
7. Zhu M, Liang Z, Feng T, Mai Z, Jin S, Wu L, Zhou H, Chen Y, Yan W. Up-to-Date Imaging and Diagnostic Techniques for Prostate Cancer: A Literature Review. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Jul 5;13(13):2283.
8. Chen Z, Li C, Zhou Y, Yao Y, Liu J, Wu M, Su J. Liquid biopsies for cancer: From bench to clinic. *MedComm (2020)*. 2023 Jul 23;4(4):e329.
9. Serefoglu EC, Altinova S, Ugras NS, Akincioglu E, Asil E, Balbay MD. How reliable is 12-core prostate biopsy procedure in the detection of prostate cancer? *Can Urol Assoc J*. 2013 May-Jun;7(5-6):E293-8.
10. Moul JW, Shore ND, Pienta KJ, Czernin J, King MT, Freedland SJ. Application of next-generation imaging in biochemically recurrent prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2023 Sep 7.
11. Sciarra A, Santarelli V, Salciccia S, Moriconi M, Basile G, Santodirocco L, Carino D, Frisenda M, Di Pierro G, Del Giudice F, Gentilucci A, Bevilacqua G. How the Management of Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Will Be Modified by the Concept of Anticipation and Incrementation of Therapy. *Cancers (Basel)*. 2024 Feb 13;16(4):764.
12. Stensland KD, Caram MEV, Herr DJ, Burns JA, Sparks JB, Elliott DA, Shin C, Morgan TM, Zaslavsky A, Hollenbeck BK, Tsodikov A, Skolarus TA. National Long-term Survival Estimates After Radical Prostatectomy for Prostate Cancer. *Urology*. 2024 Feb;184:135-141.

13. Nini A, Gandaglia G, Fossati N, Suardi N, Cucchiara V, Dell'Oglio P, Cazzaniga W, Luzzago S, Montorsi F, Briganti A. Patterns of Clinical Recurrence of Node-positive Prostate Cancer and Impact on Long-term Survival. *Eur Urol*. 2015 Nov;68(5):777-84.
14. Zumsteg ZS, Spratt DE, Romesser PB, Pei X, Zhang Z, Kollmeier M, McBride S, Yamada Y, Zelefsky MJ. Anatomical Patterns of Recurrence Following Biochemical Relapse in the Dose Escalation Era of External Beam Radiotherapy for Prostate Cancer. *J Urol*. 2015 Dec;194(6):1624-30.
15. Magri V, Marino L, De Renzi G, De Meo M, Salvatori F, Buccilli D, Bianco V, Santini D, Nicolazzo C, Gazzaniga P. Early Detection of Disease Progression in Metastatic Cancers: Could CTCs Improve RECIST Criteria? *Biomedicines*. 2024 Feb 7;12(2):388.
16. Ozmen E, Demir TD, Ozcan G. Cancer-associated fibroblasts: protagonists of the tumor microenvironment in gastric cancer. *Front Mol Biosci*. 2024 Mar 18;11:1340124.
17. Theil G, Fornara P, Bialek J. Position of Circulating Tumor Cells in the Clinical Routine in Prostate Cancer and Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 15;12(12):3782.
18. Goldkorn A, Tangen C, Plets M, Bsteh D, Xu T, Pinski JK, Ingles S, Triche TJ, MacVicar GR, Vaena DA, Crispino AW, McConkey DJ, Lara PN Jr, Hussain MHA, Quinn DI, Dorff TB, Lerner SP, Thompson I Jr, Agarwal N. Circulating Tumor Cell Count and Overall Survival in Patients With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *JAMA Netw Open*. 2024 Oct 1;7(10):e2437871.
19. Ma X, Xiao Z, Li X, Wang F, Zhang J, Zhou R, Wang J, Liu L. Prognostic role of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014 Jun;35(6):5551-60.
20. Welsch E, Bonstingl L, Holzer B, et al. Multi-marker analysis of circulating tumor cells in localized intermediate/high-risk and metastatic prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2024;41(1):937-945.
21. Ring A, Nguyen-Sträuli BD, Wicki A, Aceto N. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2023 Feb;23(2):95-111.
22. Zhan Q, Liu B, Situ X, Luo Y, Fu T, Wang Y, Xie Z, Ren L, Zhu Y, He W, Ke Z. New insights into the correlations between circulating tumor cells and target organ metastasis. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Dec 21;8(1):465.
23. Smit DJ, Pantel K. Circulating tumor cells as liquid biopsy markers in cancer patients. *Mol Aspects Med*. 2024 Apr;96:101258.
24. Schochter F, Friedl TWP, deGregorio A, Krause S, Huober J, Rack B, Janni W. Are Circulating Tumor Cells (CTCs) Ready for Clinical Use in Breast Cancer? An Overview of Completed and Ongoing Trials Using CTCs for Clinical Treatment Decisions. *Cells*. 2019 Nov 8;8(11):1412.

25. Ashworth, T.R. (1869) A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *Med J Australia*, 14, 146-147.
26. Tamrazi A, Sundaresan S, Gulati A, Tan FJ, Wadhwa V, Bartlett BR, Diaz LAJ. Endovascular image-guided sampling of tumor-draining veins provides an enriched source of oncological biomarkers. *Front Oncol*. 2023 Mar 17;13:916196.
27. Hattori M, Nakanishi H, Yoshimura M, Iwase M, Yoshimura A, Adachi Y, Gondo N, Kotani H, Sawaki M, Fujita N, Yatabe Y, Iwata H. Circulating tumor cells detection in tumor draining vein of breast cancer patients. *Sci Rep*. 2019 Dec 3;9(1):18195.
28. Rehulkova A, Chudacek J, Prokopova A, Vidlarova M, Stranska J, Drabek J, Potockova J, Trojanec R, Vrbkova J, Skarda J, Bohanes T, Szkorupa M, Tolmaci B, Klein J, Srovnal J, Hajduch M. Clinical and prognostic significance of detecting CEA, EGFR, LunX, c-met and EpCAM mRNA-positive cells in the peripheral blood, tumor-draining blood and bone marrow of non-small cell lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res*. 2023 May 31;12(5):1034-1050.
29. Tsutsuyama M, Nakanishi H, Yoshimura M, Oshiro T, Kinoshita T, Komori K, Shimizu Y, Ichinosawa Y, Kinuta S, Wajima K, Sakakibara Y, Yatabe Y, Ito S, Kodera Y. Detection of circulating tumor cells in drainage venous blood from colorectal cancer patients using a new filtration and cytology-based automated platform. *PLoS One*. 2019 Feb 27;14(2):e0212221.
30. Topa J, Grešner P, Żaczek AJ, Markiewicz A. Breast cancer circulating tumor cells with mesenchymal features-an unreachable target? *Cell Mol Life Sci*. 2022 Jan 20;79(2):81.
31. Truini A, Alama A, Dal Bello MG, Coco S, Vanni I, Rijavec E, Genova C, Barletta G, Biello F, Grossi F. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System. *Front Oncol*. 2014 Sep 4;4:242.
32. Lawrence R, Watters M, Davies CR, Pantel K, Lu YJ. Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023 Jul;20(7):487-500.
33. Franken A, Kraemer A, Sicking A, Watolla M, Rivandi M, Yang L, Warfsmann J, Polzer BM, Friedl TWP, Meier-Stiegen F, Stoecklein NH, Dayan D, Riethdorf S, Mueller V, Pantel K, Koch A, Hartkopf AD, Krawczyk N, Ruckhaeberle E, Niederacher D, Fehm T, Neubauer H. Comparative analysis of EpCAM high-expressing and low-expressing circulating tumour cells with regard to their clonal relationship and clinical value. *Br J Cancer*. 2023 May;128(9):1742-1752.
34. Lou XL, Sun J, Gong SQ, Yu XF, Gong R, Deng H. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res*. 2015 Oct;27(5):450-60.
35. Kuburich NA, den Hollander P, Castaneda M, Pietilä M, Tang X, Batra H, Martínez-Peña F, Visal TH, Zhou T, Demestichas BR, Dontula RV, Liu JY, Maddela JJ, Padmanabhan RS, Phil LTH, Rosolen MJ, Sabapathy T, Kumar D, Giancotti FG, Lairson LL, Raso MG, Soundararajan

- R, Mani SA. Stabilizing vimentin phosphorylation inhibits stem-like cell properties and metastasis of hybrid epithelial/mesenchymal carcinomas. *Cell Rep.* 2023 Dec 26;42(12):113470.
36. Chai S, Ruiz-Velasco C, Naghdloo A, Pore M, Singh M, Matsumoto N, Kolatkar A, Xu L, Shishido S, Aparicio A, Zurita AJ, Hicks J, Kuhn P. Identification of epithelial and mesenchymal circulating tumor cells in clonal lineage of an aggressive prostate cancer case. *NPJ Precis Oncol.* 2022 Jun 21;6(1):41.
 37. Yang G, Xie J, Zhang S, Gu W, Yuan J, Wang R, Guo C, Ye L, Peng B, Yao X, Yang B. Clinical Significance of Mesenchymal Circulating Tumor Cells in Patients With Oligometastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer Who Underwent Cyto-reductive Radical Prostatectomy. *Front Oncol.* 2022 Jan 20;11:812549.
 38. Dianat-Moghadam H, Azizi M, Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Heidarifard M, Nouri M, Alix-Panabières C. The Role of Circulating Tumor Cells in the Metastatic Cascade: Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. *Cancers (Basel).* 2020 Apr 3;12(4):867.
 39. Schmidt H, DeAngelis G, Eltze E, Gockel I, Semjonow A, Brandt B. Asynchronous growth of prostate cancer is reflected by circulating tumor cells delivered from distinct, even small foci, harboring loss of heterozygosity of the PTEN gene. *Cancer Res.* 2006 Sep 15;66(18):8959-65.
 40. Gupta S, Halabi S, Kemeny G, Anand M, Giannakakou P, Nanus DM, George DJ, Gregory SG, Armstrong AJ. Circulating Tumor Cell Genomic Evolution and Hormone Therapy Outcomes in Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Mol Cancer Res.* 2021 Jun;19(6):1040-1050.
 41. Nakamura S, Nagata M, Nagaya N, Ashizawa T, Hirano H, Lu Y, Ide H, Horie S. The Detection and Negative Reversion of Circulating Tumor Cells as Prognostic Biomarkers for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with Bone Metastases Treated by Enzalutamide. *Cancers (Basel).* 2024 Feb 13;16(4):772.
 42. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, Zhu F, Zhou D, Zheng S, Chen Y, Zhou J. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Nov 22;6(1):404.
 43. Akhmetkaliyev A, Alibrahim N, Shafiee D, Tulchinsky E. EMT/MET plasticity in cancer and Go-or-Grow decisions in quiescence: the two sides of the same coin? *Mol Cancer.* 2023 May 31;22(1):90.
 44. Lambros MB, Seed G, Sumanasuriya S, Gil V, Crespo M, Fontes M, Chandler R, Mehra N, Fowler G, Ebbs B, Flohr P, Miranda S, Yuan W, Mackay A, Ferreira A, Pereira R, Bertan C, Figueiredo I, Riisnaes R, Rodrigues DN, Sharp A, Goodall J, Boysen G, Carreira S, Bianchini D, Rescigno P, Zafeiriou Z, Hunt J, Moloney D, Hamilton L, Neves RP, Swennenhuis J, Andree K, Stoecklein NH, Terstappen LWMM, de Bono JS. Single-Cell Analyses of Prostate Cancer Liquid Biopsies Acquired by Apheresis. *Clin Cancer Res.* 2018 Nov 15;24(22):5635-5644.

45. Yap TA, Lorente D, Omlin A, Olmos D, de Bono JS. Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker. *Clin Cancer Res.* 2014 May 15;20(10):2553-68.
46. Banys-Paluchowski M, Witzel I, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer EF, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Fehm T, Müller V. Evaluation of serum epidermal growth factor receptor (EGFR) in correlation to circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Sci Rep.* 2017 Jun 12;7(1):3369.
47. Nastafy P, Stoupiec S, Popęda M, Smentoch J, Schlomm T, Morrissey C, Żaczek AJ, Beyer B, Tennstedt P, Graefen M, Eltze E, Maiuri P, Semjonow A, Pantel K, Brandt B, Bednarz-Knoll N. EGFR as a stable marker of prostate cancer dissemination to bones. *Br J Cancer.* 2020 Dec;123(12):1767-1774.
48. Scharpenseel H, Hanssen A, Loges S, Mohme M, Bernreuther C, Peine S, Lamszus K, Goy Y, Petersen C, Westphal M, Glatzel M, Riethdorf S, Pantel K, Wikman H. EGFR and HER3 expression in circulating tumor cells and tumor tissue from non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep.* 2019 May 15;9(1):7406.
49. Asim M. Decoding androgen receptor signalling: Genomic vs. non-genomic roles in prostate cancer. *Neoplasia.* 2024 Oct 13;58:101066.
50. Zengin ZB, Henderson NC, Park JJ, et al. Clinical implications of AR alterations in advanced prostate cancer: a multi-institutional collaboration. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2024.
51. Besler K, Węglarz A, Keller L, von Amsberg G, Bednarz-Knoll N, Offermann A, Stoupiec S, Eltze E, Semjonow A, Boettcher L, Schneegans S, Perner S, Hauch S, Todenhöfer T, Peine S, Pantel K, Wikman H, Werner S. Expression Patterns and Corepressor Function of Retinoic Acid-induced 2 in Prostate Cancer. *Clin Chem.* 2022 Jul 3;68(7):973-983.
52. Gudenkauf LM, Li X, Hoogland AI, Oswald LB, Lmanirad I, Permuth JB, Small BJ, Jim HSL, Rodriguez Y, Bryant CA, Zambrano KN, Walters KO, Reblin M, Gonzalez BD. Feasibility and acceptability of C-PRIME: A health promotion intervention for family caregivers of patients with colorectal cancer. *Support Care Cancer.* 2024 Feb 28;32(3):198.
53. Muchlińska A, Smentoch J, Żaczek AJ, Bednarz-Knoll N. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells Using Imaging Flow Cytometry-A Perspective Study. *Cancers (Basel).* 2022 Aug 29;14(17):4178.
54. Wenta R, Richert J, Muchlińska A, Senkus E, Suchodolska G, Łapińska-Szumczyk S, Domżański P, Miszewski K, Matuszewski M, Dziadziuszko R, Supernat A, Żaczek A, Bednarz-Knoll N. Measurable morphological features of single circulating tumor cells in selected solid tumors-A pilot study. *Cytometry A.* 2024 Dec;105(12):883-892.
55. Dimitriadis S, Dova L, Kotsianidis I, Hatzimichael E, Kapsali E, Markopoulos GS. Imaging Flow Cytometry: Development, Present Applications, and Future Challenges. *Methods Protoc.* 2024 Mar 23;7(2):28.

56. Staudte S, Klinghammer K, Jurmeister PS, Jank P, Blohmer JU, Liebs S, Rhein P, Hauser AE, Tinhofer I. Multiparametric Phenotyping of Circulating Tumor Cells for Analysis of Therapeutic Targets, Oncogenic Signaling Pathways and DNA Repair Markers. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 6;14(11):2810.
57. Basiji DA, Ortyn WE, Liang L, Venkatachalam V, Morrissey P. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clin Lab Med*. 2007 Sep;27(3):653-70, viii.
58. Bahnassy AA, Salem SE, Mohanad M, Abulezz NZ, Abdellateif MS, Hussein M, Zekri CAN, Zekri AN, Allahloubi NMA. Prognostic significance of circulating tumor cells (CTCs) in Egyptian non-metastatic colorectal cancer patients: A comparative study for four different techniques of detection (Flowcytometry, CellSearch, Quantitative Real-time PCR and Cytomorphology). *Exp Mol Pathol*. 2019 Feb;106:90-101.
59. Pearl ML, Dong H, Tulley S, Zhao Q, Golightly M, Zucker S, Chen WT. Treatment monitoring of patients with epithelial ovarian cancer using invasive circulating tumor cells (iCTCs). *Gynecol Oncol*. 2015 May;137(2):229-38.
60. Dent BM, Ogle LF, O'Donnell RL, Hayes N, Malik U, Curtin NJ, Boddy AV, Plummer ER, Edmondson RJ, Reeves HL, May FE, Jamieson D. High-resolution imaging for the detection and characterisation of circulating tumour cells from patients with oesophageal, hepatocellular, thyroid and ovarian cancers. *Int J Cancer*. 2016 Jan 1;138(1):206-16.
61. Ogle LF, Orr JG, Willoughby CE, Hutton C, McPherson S, Plummer R, Boddy AV, Curtin NJ, Jamieson D, Reeves HL. Imagestream detection and characterisation of circulating tumour cells - A liquid biopsy for hepatocellular carcinoma? *J Hepatol*. 2016 Aug;65(2):305-13.
62. Ruiz-Rodríguez AJ, Molina-Vallejo MP, Aznar-Peralta I, González Puga C, Cañas García I, González E, Lorente JA, Serrano MJ, Garrido-Navas MC. Deep Phenotypic Characterisation of CTCs by Combination of Microfluidic Isolation (IsoFlux) and Imaging Flow Cytometry (ImageStream). *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 20;13(24):6386.
63. Muchlińska A, Wenta R, Ścińska W, Markiewicz A, Suchodolska G, Senkus E, Żaczek AJ, Bednarz-Knoll N. Improved Characterization of Circulating Tumor Cells and Cancer-Associated Fibroblasts in One-Tube Assay in Breast Cancer Patients Using Imaging Flow Cytometry. *Cancers (Basel)*. 2023 Aug 18;15(16):4169.
64. Smentoch J, Szade J, Żaczek AJ, Eltze E, Semjonow A, Brandt B, Bednarz-Knoll N. Low Numbers of Vascular Vessels Correlate to Progression in Hormone-Naïve Prostate Carcinomas Undergoing Radical Prostatectomy. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 12;11(9):1356.
65. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*. 2010;2010:617421.

66. Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Yang SH, Lin JK, Chen YM, Wu YC, Jiang JK, Lin CH. Interleukin-17A modulates circulating tumor cells in tumor draining vein of colorectal cancers and affects metastases. *Clin Cancer Res*. 2014 Jun 1;20(11):2885-97.
67. Crosbie PA, Shah R, Krysiak P, Zhou C, Morris K, Tugwood J, Booton R, Blackhall F, Dive C. Circulating Tumor Cells Detected in the Tumor-Draining Pulmonary Vein Are Associated with Disease Recurrence after Surgical Resection of NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2016 Oct;11(10):1793-7.
68. Chudasama D, Burnside N, Beeson J, Karteris E, Rice A, Anikin V. Perioperative detection of circulating tumour cells in patients with lung cancer. *Oncol Lett*. 2017 Aug;14(2):1281-1286.
69. Yang X, Bi X, Liu F, Huang J, Zhang Z. Predictive Efficacy of Circulating Tumor Cells in First Drainage Vein Blood from Patients with Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Cancer Invest*. 2022 Oct;40(9):767-776. doi: 10.1080/07357907.2022.2098970. Epub 2022 Jul 15. PMID: 35797354.
70. Xu Z, Li K, Xin Y, Tang K, Yang M, Wang G, Tan Y. Fluid shear stress regulates the survival of circulating tumor cells via nuclear expansion. *J Cell Sci*. 2022 May 15;135(10):jcs259586. Epub 2022 May 26. Erratum in: *J Cell Sci*. 2023 Feb 15;136(4):jcs261030.
71. Xin Y, Li K, Yang M, Tan Y. Fluid Shear Stress Induces EMT of Circulating Tumor Cells via JNK Signaling in Favor of Their Survival during Hematogenous Dissemination. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 30;21(21):8115.
72. Topa J, Żaczek AJ, Markiewicz A. Isolation of Viable Epithelial and Mesenchymal Circulating Tumor Cells from Breast Cancer Patients. *Methods Mol Biol*. 2024;2752:43-52.
73. Carneiro A, Piai P, Matos B, Santos DAR, Palmeira C, Santos LL, Lima L, Diéguez L. Minimizing false positives for CTC identification. *Anal Chim Acta*. 2024 Feb 1;1288:342165.
74. Cieřlikowski WA, Budna-Tukan J, Świerczewska M, Ida A, Hrab M, Jankowiak A, Mazel M, Nowicki M, Milecki P, Pantel K, Alix-Panabières C, Zabel M, Antczak A. Circulating Tumor Cells as a Marker of Disseminated Disease in Patients with Newly Diagnosed High-Risk Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jan 9;12(1):160.
75. McDaniel AS, Ferraldeschi R, Krupa R, Landers M, Graf R, Louw J, Jendrisak A, Bales N, Marinucci D, Zafeiriou Z, Flohr P, Sideris S, Crespo M, Figueiredo I, Mateo J, de Bono JS, Dittamore R, Tomlins SA, Attard G. Phenotypic diversity of circulating tumour cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*. 2017 Nov;120(5B):E30-E44.
76. Okabe T, Togo S, Fujimoto Y, Watanabe J, Sumiyoshi I, Orimo A, Takahashi K. Mesenchymal Characteristics and Predictive Biomarkers on Circulating Tumor Cells for Therapeutic Strategy. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 30;12(12):3588.

77. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Zoli W, Rigaud M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Ann Transl Med*. 2014 Nov;2(11):109.
78. Markiewicz A, Topa J, Nagel A, Skokowski J, Seroczynska B, Stokowy T, Welnicka-Jaskiewicz M, Zaczek AJ. Spectrum of Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Circulating Tumour Cells from Early Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 9;11(1):59.
79. Gu X, Wei S, Lv X. Circulating tumor cells: from new biological insights to clinical practice. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Sep 2;9(1):226.
80. Løppke C, Jørgensen AM, Sand NT, Klitgaard RB, Daugaard G, Agerbæk MØ. Combined microfluidic enrichment and staining workflow for single-cell analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer patients. *Sci Rep*. 2024 Jul 30;14(1):17501.
81. Haffner MC, Zwart W, Roudier MP, True LD, Nelson WG, Epstein JI, De Marzo AM, Nelson PS, Yegnasubramanian S. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2021 Feb;18(2):79-92.
82. Tashireva LA, Savelieva OE, Grigoryeva ES, Nikitin YV, Denisov EV, Vtorushin SV, Zavyalova MV, Cherdyntseva NV, Perelmuter VM. Heterogeneous Manifestations of Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 2;22(5):2504.
83. Messaritakis I, Politaki E, Kotsakis A, Dermitzaki EK, Koinis F, Lagoudaki E, Koutsopoulos A, Kallergi G, Souglakos J, Georgoulas V. Phenotypic characterization of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with small cell lung cancer. *PLoS One*. 2017 Jul 18;12(7):e0181211.
84. Tiwari R, Manzar N, Ateeq B. Dynamics of Cellular Plasticity in Prostate Cancer Progression. *Front Mol Biosci*. 2020 Jul 10;7:130.
85. Menyailo ME, Tretyakova MS, Denisov EV. Heterogeneity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Identifying Metastatic Seeds. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 2;21(5):1696.
86. Aceto N. Bring along your friends: Homotypic and heterotypic circulating tumor cell clustering to accelerate metastasis. *Biomed J*. 2020 Feb;43(1):18-23.
87. Schuster E, Taftaf R, Reduzzi C, Albert MK, Romero-Calvo I, Liu H. Better together: circulating tumor cell clustering in metastatic cancer. *Trends Cancer*. 2021 Nov;7(11):1020-1032.
88. Boya M, Ozkaya-Ahmadov T, Swain BE, Chu CH, Asmare N, Civelekoglu O, Liu R, Lee D, Tobia S, Biliya S, McDonald LD, Nazha B, Kucuk O, Sanda MG, Benigno BB, Moreno CS, Bilen MA, McDonald JF, Sarioglu AF. High throughput, label-free isolation of circulating tumor cell clusters in meshed microwells. *Nat Commun*. 2022 Jun 13;13(1):3385.

89. Magnusson C, Augustsson P, Anand EU, Lenshof A, Josefsson A, Welén K, Bjartell A, Ceder Y, Lilja H, Laurell T. Acoustic enrichment of heterogenous circulating tumor cells and clusters from patients with metastatic prostate cancer. *medRxiv* [Preprint]. 2023 Dec 4:2023.12.04.23299128.
90. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, Brannigan BW, Kapur R, Stott SL, Shioda T, Ramaswamy S, Ting DT, Lin CP, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1110-1122.
91. Sun YF, Guo W, Xu Y, Shi YH, Gong ZJ, Ji Y, et al. Circulating Tumor Cells from Different Vascular Sites Exhibit Spatial Heterogeneity in Epithelial and Mesenchymal Composition and Distinct Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2018 Feb 1;24(3):547–59.
92. Pinto RN, Sebastian JA, Parsons M, Chang TC, Acker JP, Kolios MC. Application of image flow cytometry for the characterization of red blood cell morphology. *Proc. of SPIE*. 2017; Vol. 10076.
93. Pereira-Veiga T, Schneegans S, Pantel K, Wikman H. Circulating tumor cell-blood cell crosstalk: Biology and clinical relevance. *Cell Rep*. 2022 Aug 30;40(9):111298.
94. Tsai CH, Tzeng SF, Chao TK, Tsai CY, Yang YC, Lee MT, Hwang JJ, Chou YC, Tsai MH, Cha TL, Hsiao PW. Metastatic Progression of Prostate Cancer Is Mediated by Autonomous Binding of Galectin-4-O-Glycan to Cancer Cells. *Cancer Res*. 2016 Oct 1;76(19):5756-5767.
95. Helwa R, Heller A, Knappskog S, Bauer AS. Tumor cells interact with red blood cells via galectin-4 - a short report. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017 Aug;40(4):401-409.
96. Hernández-Hernández A, Rodríguez MC, López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Shnyrov V, Llanillo M, Sánchez-Yagüe J. Alterations in erythrocyte membrane protein composition in advanced non-small cell lung cancer. *Blood Cells Mol Dis*. 2006 May-Jun;36(3):355-63.
97. Ju M, Gao Z, Gu G, Huang H, Sun A, Zheng C, Li H, Zhang Y, Li K. Prognostic value of circulating tumor cells associated with white blood cells in solid cancer: a systematic review and meta-analysis of 1471 patients with solid tumors. *BMC Cancer*. 2023 Dec 12;23(1):1224.
98. Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, Krol I, Gkountela S, Landin J, Scheidmann MC, Donato C, Scherrer R, Singer J, Beisel C, Kurzeder C, Heinzelmann-Schwarz V, Rochlitz C, Weber WP, Beerenwinkel N, Aceto N. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*. 2019 Feb;566(7745):553-557.
99. Anvari S, Osei E, Maftoon N. Interactions of platelets with circulating tumor cells contribute to cancer metastasis. *Sci Rep*. 2021 Jul 29;11(1):15477.
100. Liu Y, Zhang Y, Ding Y, Zhuang R. Platelet-mediated tumor metastasis mechanism and the role of cell adhesion molecules. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021 Nov;167:103502.

101. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013 Feb 1;339(6119):580-4.
102. Pakula H, Omar M, Carelli R, Pederzoli F, Fanelli GN, Pannellini T, Socciarelli F, Van Emmenis L, Rodrigues S, Fidalgo-Ribeiro C, Nuzzo PV, Brady NJ, Dinalankara W, Jere M, Valencia I, Saladino C, Stone J, Unkenholz C, Garner R, Alexanderani MK, Khani F, de Almeida FN, Abate-Shen C, Greenblatt MB, Rickman DS, Barbieri CE, Robinson BD, Marchionni L, Loda M. Distinct mesenchymal cell states mediate prostate cancer progression. *Nat Commun*. 2024 Jan 8;15(1):363.
103. Jones ML, Siddiqui J, Pienta KJ, Getzenberg RH. Circulating fibroblast-like cells in men with metastatic prostate cancer. *Prostate*. 2013 Jan;73(2):176-81.
104. Ao Z, Shah SH, Machlin LM, Parajuli R, Miller PC, Rawal S, Williams AJ, Cote RJ, Lippman ME, Datar RH, El-Ashry D. Identification of Cancer-Associated Fibroblasts in Circulating Blood from Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*. 2015 Nov 15;75(22):4681-7.
105. Day KC, Lorenzatti Hiles G, Kozminsky M, Dawsey SJ, Paul A, Brose LJ, Shah R, Kunja LP, Hall C, Palanisamy N, Daignault-Newton S, El-Sawy L, Wilson SJ, Chou A, Ignatoski KW, Keller E, Thomas D, Nagrath S, Morgan T, Day ML. HER2 and EGFR Overexpression Support Metastatic Progression of Prostate Cancer to Bone. *Cancer Res*. 2017 Jan 1;77(1):74-85.
106. Bednarz-Knoll N, Richert J, Wenta R, Popeda M, Szade J, Pastuszek K, Morrissey C, Sowa M, Miszewski K, Matuszewski M, P18 - Platelets regulation of circulating tumor cells phenotype might boost prostate cancer progression, *EU Open Science*. 2023 56, Supplement 1, Page S19.
107. Crespo M, van Dalum G, Ferraldeschi R, Zafeiriou Z, Sideris S, Lorente D, Bianchini D, Rodrigues DN, Riisnaes R, Miranda S, Figueiredo I, Flohr P, Nowakowska K, de Bono JS, Terstappen LW, Attard G. Androgen receptor expression in circulating tumour cells from castration-resistant prostate cancer patients treated with novel endocrine agents. *Br J Cancer*. 2015 Mar 31;112(7):1166-74.
108. Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL, Ting DT, Wittner BS, Ulman M, Smas ME, Lord JB, Brannigan BW, Trautwein J, Bander NH, Wu CL, Sequist LV, Smith MR, Ramaswamy S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer. *Cancer Discov*. 2012 Nov;2(11):995-1003.
109. Safi R, Wardell SE, Watkinson P, Qin X, Lee M, Park S, Krebs T, Dolan EL, Blattler A, Tsuji T, Nayak S, Khafer M, Fontanillo C, Newlin MA, Kirkland ML, Xie Y, Long H, Fink EC, Fanning SW, Runyon S, Brown M, Xu S, Owzar K, Norris JD, McDonnell DP. Androgen receptor

monomers and dimers regulate opposing biological processes in prostate cancer cells. *Nat Commun.* 2024 Sep 3;15(1):7675.

110. Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Verri E, Scarpelli M, Massari F, Cheng L, Santoni M, Montironi R. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells.* 2020 Dec 10;9(12):2653.
111. Tyagi V, Scordo M, Yoon RS, Liporace FA, Greene LW. Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? *Rev Urol.* 2017;19(1):16-24.
112. Krawczyk N, Neubacher M, Meier-Stiegen F, Neubauer H, Niederacher D, Ruckhäberle E, Mohrmann S, Hoffmann J, Kaleta T, Banys-Paluchowski M, Reinecke P, Esposito I, Janni W, Fehm T. Determination of the androgen receptor status of circulating tumour cells in metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2019 Nov 12;19(1):1101.