

Detekcia cirkulujúcich nádorových buniek v periférnej krvi u pacientov s urotelovým karcinómom – pilotná štúdia. Porovnanie so štandardným histologickým vyšetrením

Detection of Circulating Tumor Cells from Peripheral Blood in Patients with Transitional Cell Carcinoma – Pilot Study. Comparison with the Standard Histopathological Staging

Nagy V.¹, Rosocha J.², Židzik J.³, Bohuš P.⁴

¹ Urologická klinika, Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice, Slovenská republika

² Združená tkanivová banka, Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice, Slovenská republika

³ Ústav lekárskej biológie, Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, Košice, Slovenská republika

⁴ Ústav patológie, Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice, Slovenská republika

Súhrn

Východiská: Cieľom pilotnej štúdie bolo zistiť, či expresiu génov pre UP-II a EGFR RT-PCR a imunohistochemicky (IH) na vzorkách odobratých pred a po operácii možno využiť ako potenciálny nádorový marker na detekciu cirkulujúcich nádorových buniek (CNB) v periférnej krvi pacientov s TCC a výsledky porovnať so štandardným histopatologickým vyšetrením. **Materiál a metódy:** 43 pacientov (33 mužov a 10 žien) s TCC o vo veku 37–85 rokov, priemer 65 ± 12 rokov. Z nich 40 (93%) malo TCC močového mechúra, 2 (4,6%) TCC obličkovej panvičky a 1 (2,3%) TCC močového mechúra, močovodu a obličkovej panvičky. V rámci štúdie bolo odobratých 10 ml periférnej krvi pacientov pred a do 1 hod po operácii, imunomagneticky separované CNB a určená expresia génov EGFR a UP-II pomocou RT-PCR. Následne bolo histopatologicky vyšetrené TCC tkanivo, určená endolymfatická, intravaskulárna a perineurálna invázia, expresia CK-7, CK-20, stromelysinu, Ki-67, p 53. IH bola vykonaná aj na vzorkách separovanej krvi pred a po operácii na prítomnosť CNB farbením hematoxylínom-eozínom (HE) a podľa Papanicolaua (PAP), ako aj na prítomnosť exprese CK-7, CK-20. **Výsledky:** EGFR a UP-II boli exprimované u 24 z 35 (68,6%) a u 19 z 35 (54,3%) vzoriek TCC tkaniva. EGFR nebol exprimovaný v žiadnej vzorke krvi ani imuno-separovaných buniek. UP-II bol exprimovaný v 1 z 19 (5,3%) vzoriek imuno-separovaných CNB získaných pred operáciou, ale v žiadnej vzorke imuno-separovaných CNB získaných po operácii ($P < 0,9999$). Expresia UP-II bola detegovaná v 2 z 32 (6,3%) vzoriek krvi odobratých pred operáciou a v 3 z 32 (9,4%) vzoriek krvi odobratých do jednej hodiny po operačnom zákroku ($P < 0,9999$). U 11 zo 43 (25,6%) pacientov sa pri histopatologickom vyšetrení zistila invázia TCC, z toho: u jedného intravaskulárna, u 6 endolymfatická, u jedného intravaskulárna a endolymfatická a u 3 intravaskulárna, endolymfatická a perineurálna. Vyšetrenie separovanej krvi pred a po operácii farbením HE a PAP a na CK-7, CK-20 bolo takmer vo všetkých vzorkách negatívne. Pri IH tkaniva TCC na CK-7, CK-20, stromelysin bola pozitívna v 97,7%, 74,4% a 97,7%. Cytologické vyšetrenie moču bolo pozitívne u 19 (50%) z pacientov a korelovalo s vyšším grade G3 u 20 (46,5%) pacientov. Expresia Ki-67 bola u pacientov s G3 (31,15%) signifikantne vyššia ako u pacientov s G1 (7,53%) ($p < 0,01$). Pri skúmaní TCC tkaniva sa nenašiel signifikantný vzťah medzi grade a expresiou p53 a stromelysinu. **Záver:** Testy neukázali zmeny exprese génov pre EGFR a UP-II v periférnej krvi a v imuno-separovaných bunkách pacientov pred a po operačnom zákroku. Výsledky v tomto súbore pacientov s TCC s prevažne nižším štádiom pTNM nepotvrdili výskyt CNB TCC v periférnej krvi.

Kľúčové slová

urotelové nádory – RT PCR – beta-aktín – uroplakin II – EGFR gen – cytokeratiny – cirkulujúce nádorové bunky – minimálna reziduálna choroba

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



doc. MUDr. Vincent Nagy, PhD.

Urologická klinika
Univerzita P. J. Šafárika
Lekárska fakulta a Univerzitná
nemocnica L. Pasteura
Trieda SNP 1
040 11 Košice
Slovenská republika
e-mail: vincent.nagy@upjs.sk

Obdrženo/Submitted: 7. 7. 2010

Přijato/Accepted: 6. 12. 2010

Summary

Backgrounds: The aim of this pilot study was to investigate whether UP-II and EGFR genes expression detection with RT-PCR and the use of immunohistochemistry methods on patient samples taken before and after surgery could be used as a cancer marker for detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with TCC. Another goal of this study was to identify whether surgery can influence the amount of circulating tumor cells and to correlate the samples with standard histopathological staging. **Materials and Methods:** A total of 43 patients with histologically proven TCC was enrolled in the study. There were 33 men and 10 women in the sample, mean age was 65 ± 12 years (range 37–85 years). Forty (93.0%) patients had TCC of the urinary bladder, 2 (4.6%) had TCC of renal pelvis and 1 (2.3%) had TCC of urinary bladder, urethra, and renal pelvis. A sample of 10 ml of peripheral blood was collected from each patient before and within 1 hour after a surgery. Blood samples were used for immunomagnetic separation of circulating tumor cells and determination of UP-II and EGFR genes expression. Subsequently, cancer tissue was processed, endolymphatic, intravascular and peritoneal invasion determined and CK-7, CK-20, stromelysin, Ki-67 and p53 expression evaluated. Blood samples taken before and after the surgery were also subjected to immunohistochemical analysis using hematoxylin-eosin (HE) staining and staining by Papanicolaus (PAP). CK-7 and CK-20 expression was also evaluated. **Results:** EGFR and UP-II were expressed in 24 of the 35 (68.6%) and in 19 of the 35 (54.3%) cancer tissues samples, respectively. EGFR was expressed neither in blood samples nor in immuno-separated cell samples. UP-II was expressed in 1 of the 19 (5.3%) samples of immuno-separated cells acquired before the surgery and in no sample of immuno-separated cells obtained after the surgery ($P < 0.9999$). Moreover, UP-II was expressed in 2 of the 32 (6.3%) whole blood samples taken before the surgery and in 3 out of 32 (9.4%) whole blood samples taken within an hour after the surgery ($P < 0.9999$). Histopathological examination showed TCC invasion in 11 of the 43 patients: 1 patient with intravascular, 6 with endolymphatic, 1 with intravascular and endolymphatic and 3 with intravascular, endolymphatic and perineural invasion. Immunohistochemical examination of separated blood before and after the surgery by PAP and HE staining, CK-7 and CK-20 expression were negative in nearly all samples. Immunohistochemical examination of TCC tissue showed positive results in 97.7% for CK-7 expression, 74.4% for CK-20 and 97.7% for stromelysin. Cytological examination of urine was positive in 19 (50%) patients and correlated well with higher grade G3 in 20 (46.5%) patients. Ki-67 expression was significantly higher in patients with G3 (31.15%) in comparison to patients with G1 (7.53%) ($p < 0.01$). There was no significant association between grade and expression of p53 and stromelysin in cancer tissue. **Conclusion:** Our preliminary tests did not show any significant change to EGFR and UP-II expression in peripheral blood and in immuno-separated cells before and after a surgery. The results for a group of patients with lower pTNM grade did not confirm the presence of malignant urothelial cells in peripheral blood.

Key words

urothelial cancer - RT PCR - beta-Actin - uroplakin II - EGFR genes - cytokeratins - circulating neoplastic cells - minimal residual disease

Východiská

Detekcia a molekulová charakteristika cirkulujúcich nádorových buniek (CNB) pri nádoroch urogenitálneho systému môže mať využitie v terapii a prognóze [1]. Skúmal sa aj vplyv operácie na rozsev CNB s tým, že chirurgický výkon neovplyvnil rozsev nádorových buniek. CNB sa našli iba u pacientov s metastázami (MTS) [2]. Vo viacerých štúdiách bola pri nádoroch obličiek, prostaty a urotelových nádoroch (TCC) na detekciu CNB použitá metóda RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction) [3,4]. Keďže PCR má mnoho obmedzení, neustále sa vyvíjajú nové

techniky detekcie CNB [5]. Pred analýzou odobratých vzoriek sa používala imunomagnetická separácia intaktných CNB a mikro MTS. Obohatené frakcie separovaných buniek sa potom mohli použiť nielen na RT-PCR detekciu nádorových buniek, ale aj na ich imunohistochemickú či imunocytochemickú analýzu alebo pri rôznych *in situ* hybridizačných technikách. Využitie týchto metód vedie k presnejšej kvantifikácii a molekulovej charakterizácii CNB.

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť, či je možné použiť expresiu génov pre uroplakin-II (UP-II) a receptor epidermálneho rastového faktora (EGFR) ako mar-

kerov pre detekciu CNB v periférnej krvi pacientov s TCC. Detekciu buniek u pacientov s TCC sme uskutočnili v separovaných vzorkách krvi pred a po operácii pomocou RT-PCR a imunohistochemickými metódami a výsledky sme porovnávali s histopatologickým vyšetrením vzoriek biopsického materiálu s určením grade a pTNM štádia, ako aj iných charakteristík, vrátane cytologického vyšetrenia moču.

Materiál a metódy

Do štúdie bolo zahrnutých 43 pacientov (33 mužov a 10 žien) TCC o vo veku 37–85 rokov s priemerom 65 ± 12 rokov.

Tab. 1. pTNM klasifikácia a grade TCC u vyšetrených pacientov (n = 43).

pTNM klasifikácia počet (%)						Grade	Počet (%)
Ta	22 (51,2)	Nx	1 (2,3)	M0	41 (95,3)	G1	14 (32,6)
T1	4 (9,3)	N0	39 (90,7)	M1	2 (4,7)	G2	8 (18,6)
T2	10 (23,3)	N1	2 (4,7)			G3	20 (46,5)
T3	3 (7)	N2	1 (2,3)			Gx	1 (2,3)
T4	4 (9,3)						

Tab. 2. Chirurgická liečba pacientov s TCC (n = 43).

Terapia v čase odberu	Počet (%)
TUR – B	29 (67,4)
nefroureterektómia	3 (7)
cystektómia	4 (9,3)
parciálna cystektómia	3 (7)
chirurgická explorácia	4 (9,3)
TUR-B = transuretrálna resekcia tumoru močového mechúra	

Z nich 40 (93 %) malo TCC močového mechúra, 2 (4,6 %) TCC obličkovej panvičky a 1 (2,3 %) TCC močového mechúra, močovodu a obličkovej panvičky. pTNM klasifikácia je uvedená v tab. 1 a spôsob liečby v tab. 2. Pred operáciou a po jej ukončení do jednej hodiny bola odobraná z periférnej žily krv po 10 ml. Okrem toho bol odobratý z TCC bioptický materiál na histologické vyšetrenie s určením grade, endolymfatickej, intravaskulárnej a perineurálnej invázie. Pri imunohistochemickej analýze bioptického materiálu sa určovala expresia cytokeratínu 7 (CK 7) metódou OV-TL12/30 Biogenex; cytokeratínu 20 (CK 20) pomocou IT-Ks20.8 Biogenex; Ki-67 pomocou MIB-1 DAKO; MMP-11 (Stromelysin 3) SL3.05 NeoMarkers; p53 pomocou CB 11 Biogenex. V separovaných bunkách z odberu krvi pred a po operácii sa okrem expresie EGFR, UP-II imunohistochemicky vyšetrili HE, PAP, CK 7 opäť pomocou OV-TL12/30 a CK 20 testom IT-Ks20.8 Biogenex.

Imunomagnetická separácia buniek

Päť ml periférnej krvi bolo použitých na imunomagnetickú separáciu buniek pomocou CELLection™ Epithelial Enrich kit (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) podľa návodu od výrobcu. Obohatené vzorky boli použité na detekciu epitelových nádorových buniek a imunocytochemické vyšetrenia. 400 µl bunkovej suspenzie bolo centrifugovaných na sklenených doštičkách pokrytých poly-L-lyzínom počas 3 min pri 1 000 otáčkach za minútu. Po odstránení väčšiny supernatantu boli doštičky znova centrifugované počas 1 min pri 2 500 otáčkach za min. Po vyschnutí pri izbovej teplote,

ktoré trvalo 30–60 min, boli doštičky vystavené pôsobeniu konjugovanej protilátky – AE1/AE3. Potom boli nádorové bunky vizualizované v reakcii s alkalickou fosfatázou.

Izolácia RNA

Na genetickú analýzu bolo použitých 2 ml periférnej krvi odobratej pred a do jednej hodiny po operačnom zákroku, imunomagneticky separované bunky a nádorové tkanivo odobraté počas samotného chirurgického zákroku. Krvné vzorky (2 ml), separované bunky (celý výťažok separácie) a nádorové tkanivo (75 mg) boli ihneď použité na izoláciu RNA s pomocou RNeasy® Total RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI, USA) podľa návodu od výrobcu.

RT-PCR

Celková RNA (100 ng) izolovaná z krvi zo separovaných buniek a nádorového tkaniva bola reverzne prepísaná do cDNA s pomocou ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corp. Madison, WI, USA). RT prebiehala v reakčnom objeme 20 µl s nasledovným zložením: 1x ImProm-II™ Reaction Buffer, 0,5 µg Random Primer, 6 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTP, 20 U rekombinantného RNasin® Ribonuclease Inhibitor a 1 µl ImProm-II™ Reverznej Transkriptázy. Na odhalenie prípadnej DNA kontaminácie vzoriek bola pri RT vždy použitá negatívna kontrola bez reverznej transkriptázy.

V získanej cDNA sme kvalitatívne analyzovali expresiu génov pre UP-II a EGFR pomocou metodiky PCR. Expresia prevádzkového génu (housekeeping gene) β-aktínu bola použitá ako interná kontrola úspešnosti prepisu RNA a následnej výťažnosti PCR. PCR prebiehala v reakčnom objeme 50 µl s nasledovným zložením: 1x PCR buffer, 0,2 mM dNTP (Jena Bioscience), 0,1 µM každého priméru a 4 U DyNAzyme II polymerázy (Finnzymes, Espoo, Finland). Na detekciu expresie jednotlivých génov sme použili dvojice primérov, ako boli popísané v práci Gazzaniga et al [6]: (a) β-aktín upstream, 5'-TTAGCTGTGCTCGCTACTCTCTC-3' a β-aktín downstream, 5'-GTGGATTGATGAAACCCAGACACA-3'; (b)

EGFR upstream, 5'-CTTCTTGACGCGA-TACAGCTC-3' a EGFR downstream 5'-ATGCTCCAATAAATTCAGTGC-3'; (c) UP-II upstream 5'-AACATCTCAAGCCTCTCTGGTCTG-3' a UP-II downstream 5'-TGTGGACATTGGGATCTCTCTGCTG-3'. Teplotný profil PCR bol: počiatočná denaturácia 95 °C na 2 min nasledovaná 35 cyklami 94 °C na 1,5 min, 62 °C na 30 s a 72 °C na 2 min. Konečná elongácia bola pri 72 °C predĺžená na 4 min. Produkty PCR boli elektroforeticky analyzované na 2 % agarózovom géli. Veľkosti PCR produktov jednotlivých génov boli nasledovné: β-aktín 168 bp, UP-II 322 bp a EGFR 441 bp.

Štatistická analýza

Demografické údaje sú uvádzané v tvare priemer ± smerodajná odchýlka. Na porovnanie výsledkov expresie jednotlivých génov vo vzorkách pred a po operačnom zákroku sme použili párový test podľa Liddella.

Štatistickým programom na vyhodnotenie bol balík Arcus QuickStat Biomedical Version 1.1, build 137 (StatsDirect Ltd., UK). Za signifikantné bolo považované $P < 0,05$.

Zo 43 pacientov boli 35 pacienti sledovaní v období 2–117 mesiacov s priemerom 30 mesiacov. Ostatní sa nezúčastňovali na kontrolnom vyšetrení na našom pracovisku. Bez recidívy TTC bolo 15 pacientov a recidívu malo 20 pacientov.

Štúdia sa uskutočnila so súhlasom etickej komisie a od každého pacienta bol pred odberom vzoriek, krvi a tkaniva, získaný informovaný súhlas.

Časť biologického materiálu bola znehodnotená transportom, preto bola vyradená z vyšetrenia a z tohto dôvodu sa porovnávali nerovnaké skupiny vzoriek pacientov. Z finančných dôvodov chýbalo použitie pozitívnych a negatívnych kontrol. Metodicky išlo o jednoduché vyhodnotenie daného klinického súboru postupne liečených pacientov s TTC nádormi tak, ako prichádzali na urologickú kliniku.

Výsledky

Expresia β-aktínu bola zistená vo všetkých vyšetrených vzorkách TCC tkaniva s použitím RT-PCR metódy detekcie ex-

Tab. 3. Expresia génov pre EGFR a UP-II.

Gén	Vzorka expresia	Separované bunky		Krv		Tkanivo
		pred OP	po OP	pred OP	po OP	
EGFR	poz.	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	24 (68,6 %)
	neg.	19 (100 %)	19 (100 %)	32 (100 %)	32 (100 %)	11 (31,4 %)
		P*		P*		
UP-II	poz.	1 (5,3 %)	0 (0 %)	2 (6,3 %)	3 (9,4 %)	19 (54,3 %)
	neg.	18 (94,7 %)	19 (100 %)	30 (95,7 %)	29 (90,6 %)	16 (45,7 %)
		P > 0,9999		P > 0,9999		

P* = úplne rovnaká expresia génov pred a po operácii, OP = operácia, EGFR = epidermal growth factor receptor (receptor pre epidermálny rastový faktor), UP-II = uroplakín 2

Tab. 4. Invázia TCC pri histopatologickom vyšetrení (n = 43).

Typ	Počet	(%)
L+V+P	3	(7,0)
L+V	1	(2,3)
L	6	(14,0)
V	1	(2,3)

L = endolymfatická invázia, V = intravaskulárna invázia, P = perineurálna invázia

Tab. 5. Vyšetrenie separovaných buniek z periférnej krvi pred a po operácii farbením HE a podľa PAP a na CK-7, CK-20 (n = 40).

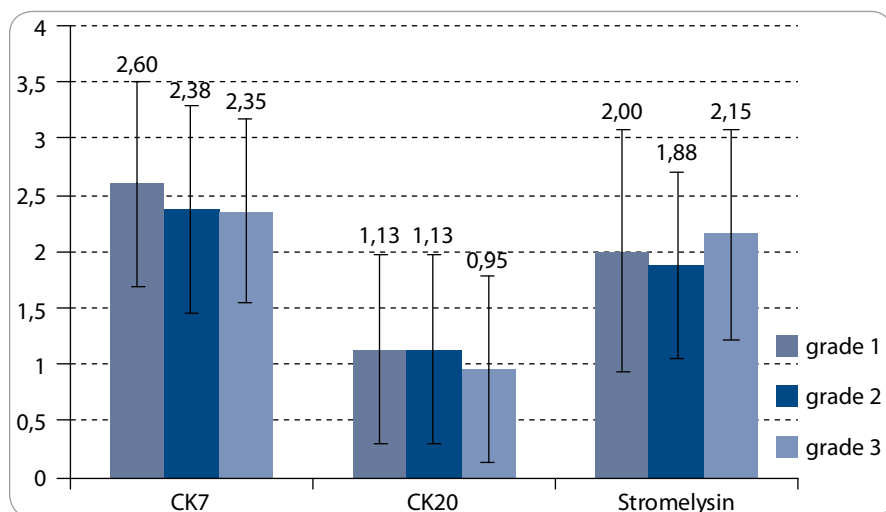
Kategória	Pred operáciou		Po operácii	
	pozitivita	negativita	pozitivita	negativita
HE	0	40	0	40
PAP	0	40	1	39
CK-7	1	39	0	40
CK-20	0	40	0	40

0 = negatívny; 1 = pozitívny, HE = farbenie hematoxylínom-eozínom, PAP = farbenie podľa Papanicolaou, CK-7 = cytokeratín 7, CK-20 = cytokeratín 20

presie génov, čo svedčí o 100% úspešnosti použitej metódy. EGFR a UP-II boli exprimované u 24 z 35 (68,6%), resp. u 19 z 35 (54,3%) vzoriek TCC. V našom prípade testy nepreukázali významné zmeny expresie génov pre EGFR a UP-II v periférnej krvi a v imuno-separovaných bunkách pacientov pred a po operačnom zákroku. EGFR nebol ex-

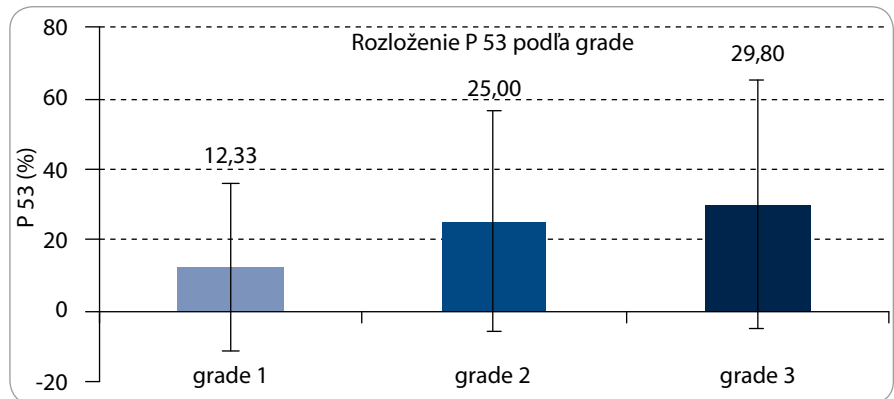
primovaný v žiadnej vzorke krvi ani u imuno-separovaných buniek. UP-II bol exprimovaný v 1 z 19 (5,3%) vzoriek imuno-separovaných buniek získaných pred operáciou, ale v žiadnej vzorke zo vzoriek imuno-separovaných buniek získaných po operácii (P < 0,9999). Expresia UP-II bola detegovaná u 2 z 32 (6,3%) vzoriek krvi odobratých pred opera-

ciou a v 3 z 32 (9,4%) vzoriek krvi odobratých do jednej hodiny po operačnom zákroku (P < 0,9999) (tab. 3). U 11 zo 43 (25,6%) pacientov sa pri histopatologickom vyšetrení zistila invázia TCC, z toho: u 1 intravaskulárna, u 6 endolymfatická, u 1 intravaskulárna a endolymfatická a u 3 intravaskulárna, endolymfatická a perineurálna (tab. 4). Vyšetrenie separovanej krvi pred a po operácii farbením HE a PAP a na CK-7, CK-20 bolo takmer vo všetkých vzorkách negatívne (tab. 5). Signifikantný vzťah medzi grade a expresiou p53 v nádorovom tkanive svedčiacom o agresivite a malígnom potenciáli nádoru sa nenašiel (graf 2). Expresia Ki-67 (graf 3) bola u pacientov s G3 (31,15%) signifikantne vyššia ako u pacientov s G1 (7,53%) (p < 0,01). Tab. 6 dokumentuje vyšetrenie bioptického materiálu pri histopatologickom vyšetrení TCC na CK-7, CK-20 a stromelysin s pozitivitou v 97,7%, 74,4% a 97,7% (graf 1). V tab. 7 je cytologické vyšetrenie moču s pozitívnym alebo suspektým nálezom u 19 z 38 (50%) pacientov, čo koreluje s vyšším grade G3 u 20 zo 43 (46,5%) pacientov.

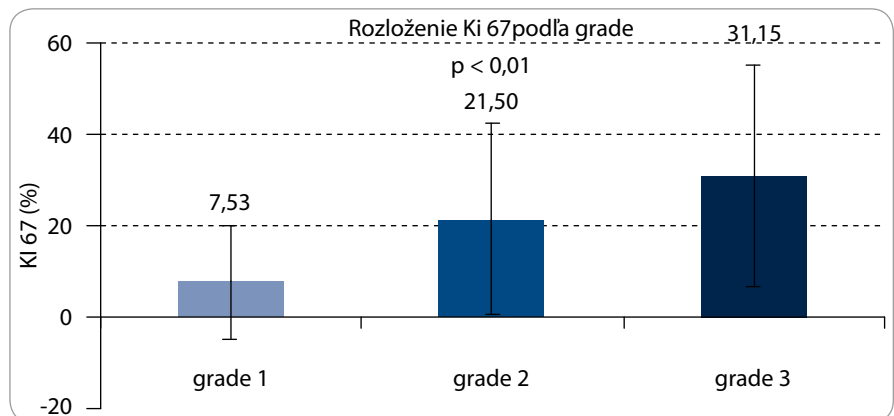

Graf 1. Grafické vyjadrenie vzťahu medzi grade a CK-7, CK-20 a stromelysinom pri imunochemickom vyšetrení bioptického materiálu. Pozitivita v rozsahu 0–3+ (n = 43).

Diskusia

Pretože UP, špecifické transmembránové proteíny, sú prítomné len v bunkách urotelu, detekcia génovej expresie UP v krvi pomocou RT-PCR môže predstavovať dôležitú informáciu pre diagnostiku a terapiu TCC [7,8]. Vďaka tomu, že UP sú vysoko konzervované a dobre exprimované v normálnych aj TCC bunkách, sú vhodným kandidátom pre použitie ako diagnostický marker na detekciu CNB u pacientov s TCC [9–11]. Metódu RT-PCR možno využiť k stanoveniu expresie CK-20 v bunkách separovaných z moču pacientov s TTC močového mechúra [12–14], ako aj z tkaniva tumoru, normálneho urotelu, z výplachu mechúra [15,16] či z periférnej krvi, kostnej drene a lymfatických uzlín [17–19]. Podobne ako u našich pacientov, aj iní autori potvrdili, že detekcia EGFR pozitívnych buniek samotných alebo v kombinácii s UP mala nižšiu hodnotu ako pri kombinácii UP Ia/UP II [20]. Detekcia CNB u pacientov s MTS TCC a non MTS TCC pomocou metódy CellSearch Assay bola u 8 zo 14 (57,1 %) pacientov so vzdialenými MTS, ale u žiadneho z pacientov s non MTS TCC [21]. V inej štúdii pacientov s MTS TCC boli CNB detekované u 14 z 33 (44 %, 95 %, CI od 27–59 %). Väčšia záchytnosť CNB bola pozorovaná u pacientov s väčším počtom MTS. Metóda by mohla byť využitá na monitorovanie odpovede na chemoterapiu [22]. Napriek tomu pozitívny výsledok detekcie CNB u pacientov neznamena automaticky prítomnosť vzdialených MTS, avšak prítomnosť týchto buniek v krvnom obehú môže naznačovať buď nekompletnú eradikáciu nádorového tkaniva, alebo možnú existenciu vzdialených MTS aj u pacientov s klinicky nepreukázaným reziduálnym nádorom [23]. Predpokladali sme, že množstvo CNB v periférnej krvi sa zvyšuje u pacientov s pokročilejším pTNM štádiom, najmä pri infiltrujúcich a MTS nádoroch, pri vyššom stupni dediferenciácie nádorových buniek (grade) s pozitívnou cytológiou v moči alebo pri histopatologicky dokázanej endolymfatickej, intravaskulárnej, perineurálnej invázii, či pri dôkaze niektorých antigénov, ktoré svedčia o malignom potenciáli nádoru. Guzzo et al [24] vyšetrili 43 pacientov s TCC močového



Graf 2. Grafické vyjadrenie vzťahu medzi grade a p53 (%) pri imunohistochemickom vyšetrení biopsického materiálu (n = 43).



Graf 3. Grafické vyjadrenie vzťahu medzi grade a Ki-67 (%) pri imunohistochemickom vyšetrení biopsického materiálu (n = 43).

Tab. 6. Imunohistochemické vyšetrenie biopsického materiálu pri histopatologickom vyšetrení na CK-7, CK-20, stromelysin, Ki 67 (%), p53 (%). Pozitivita v rozsahu 0–3+ (n = 43).

Pozitivita	CK-7 (%)	CK-20 (%)	Stromelysin (%)
0	1 (2,3)	11 (25,6)	1 (2,3)
1+	7 (16,3)	21 (48,8)	15 (34,9)
2+	7 (16,3)	9 (20,9)	8 (18,6)
3+	28 (65,1)	2 (4,7)	19 (44,2)

0 = negatívny nález; 1+ až 3+ : stúpajúca intenzita expresi

mechúra pred radikálnou cystektómiou a detegovali CNB v periférnej krvi iba u 9 (21 %) pacientov. Prítomnosť CNB v periférnej krvi spoľahlivo nepredpovedala extravezikálne šírenie nádoru alebo MTS postihnutie lymfatických uzlín ($\geq$ pT3 alebo +LU: $p = 0,576$) s tým, že senzitivita (27 %), špecifita (88 %) a pozitívna predpovedaná hodnota (78 %) boli nízke. Preto sa CNB nezdali byť klinicky užitočným parametrom pre usmernenie

terapeutického rozhodnutia u pacientov s menej pokročilými TTC nádormi močového mechúra ako cT2 ($\leq$ cT2).

Zistenie, že pacient má pozitívny výsledok analýzy CNB v periférnej krvi pred operáciou môže ovplyvniť rozhodnutie, ktoré sa bude týkať samotného operačného výkonu, jeho modality a výberu a niekedy aj indikácie systémovej chemoterapie. V našej klinickej praxi sme sa stretli s prípadmi, keď u pacienta s pre-

Tab. 7. Cytologické vyšetrenie moču u pacientov, n = 38 (%).

	Počet (%)
negatívne	19 (50)
pozitívne	10 (26,3)
suspektné	9 (23,7)
spolu	38 (100)

doperačne klinicky nepreukázanými MTS sa do šiestich mesiacov objavili vzdialené MTS, pričom rozsiahla operácia nepredĺžila život pacienta. Informácia o prítomnosti či neprítomnosti CNB u pacientov by mohla byť včasným indikátorom systémovej liečby.

V našej štúdii sme mali minimálne 7 pacientov v štádiu pT3-4 a 20 pacientov s grade G3 (tab. 1), s endolymfatickou a intravaskulárnou inváziou (tab. 4) a s dôkazom CK-7, CK-20 a stromelysinu či Ki-67 alebo p53 v nádorovom tkanive, u ktorých sme eventuálnu prítomnosť CNB v periférnej krvi oprávnenne predpokladali. U väčšiny pacientov sme urobili TUR (29–67,4%) tumoru s definitívnym ošetrením a iba u 10 radikálnejší výkon (tab. 2). Analyzovali sme expresiu potenciálnych markerov (UP-II a EGFR) CNB u pacientov s TCC. Skúmali sme, či by chirurgický zákrok so sebou mohol priniesť riziko výsevu nádorových buniek. Preto sme využili analýzu CNB v periférnej krvi pred a po operačnom výkone na zistenie tejto eventuality. V skupine našich pacientov sme však nezistili signifikantné rozdiely v expresii UP-II a EGFR a ani pri ostatných ukazovateľoch pred operáciou a po operácii a ani v imuno-separovaných bunkách, ani v krvných vzorkách. Aj iní autori na menšej skupine vyšetrených pacientov usúdili, že prítomnosť CNB korelovala s pokročilým štádiom ochorenia, ale u žiadneho pacienta, u ktorého nenašli CNB pred ope-

rácii sa CNB neobjavili v priebehu operácie – cystektómie [25]. V našej zostave pacientov s prevažne nižším pTNM štádiom ochorenia sme neboli schopní zachytiť CNB, vrátane pacientov s pT4 a ani chirurgické výkony nevedli k rozsevu nádorových buniek.

Záver

Výsledky našej pilotnej štúdie ukazujú, že u pacientov s nižšou pTNM klasifikáciou bolo praktické použitie monitoringu CNB problematické a využitie detekcie CNB v praxi si vyžaduje ďalšie systematické štúdium v homogénnejšej skupine pacientov.

Literatúra

1. Nezos A, Pissimisi N, Lembessis P et al. Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients. *Cancer Treat Rev* 2009; 35(3): 272–279.
2. Desgrandchamps F, Teren M, Dal Cortivo L et al. The effect of transurethral resection and cystoprostatectomy on dissemination of epithelial cells in the circulation of patients with bladder cancer. *Br J Cancer* 1999; 81(5): 832–834.
3. Ghossein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterization of circulating tumor cells and micrometastases in prostatic, urothelial, and renal cell carcinomas. *Semin Surg Oncol* 2001; 20(4): 304–311.
4. Hirata H, Hisatomi H, Kawakita M et al. Genetic detection for hematogenous micrometastasis in patients with various types of malignant tumor using Uroplakin II derived primers in polymerase chain reaction. *Oncol Rep* 2003; 10(4): 963–966.
5. Kinjo M, Okegawa T, Horie S et al. Detection of circulating MUC7-positive cells by reverse transcription-polymerase chain reaction in bladder cancer patients. *Int J Urol* 2004; 11(1): 38–43.
6. Gazzaniga P, Gandini O, Giuliani L et al. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood: a new marker of circulating neoplastic cells in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7(3): 577–583.
7. Lu JJ, Kakehi Y, Takahashi T et al. Detection of circulating cancer cells by reverse transcription-polymerase chain reaction for uroplakin II in peripheral blood of patients with urothelial cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(8): 3166–3171.
8. Yuasa T, Yoshiki T, Isono T et al. Expression of transitional cell-specific genes, uroplakin Ia and II, in bladder cancer: detection of circulating cancer cells in the peripheral blood of metastatic patients. *Int J Urol* 1999; 6(6): 286–292.
9. Yuasa T, Yoshiki T, Tanaka T et al. Expression of uroplakin Ib and uroplakin III genes in tissues and peripheral blood of patients with transitional cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89(9): 879–882.

10. Yuasa T, Yoshiki T, Isono T et al. Molecular cloning and expression of uroplakins in transitional cell carcinoma. *Adv Exp Med Biol* 2003; 539(Pt A): 33–46.
11. Okegawa T, Kinjo M, Nishihara K et al. Value of reverse transcription polymerase chain assay in peripheral blood of patients with urothelial cancer. *J Urol* 2004; 171(4): 1461–1466.
12. Buchumensky V, Klein A, Zemer R et al. Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma? *J Urol* 1998; 160(6 Pt 1): 1971–1974.
13. Klein A, Zemer R, Buchumensky V et al. Expression of cytokeratin 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma. *Cancer* 1998; 82(2): 349–354.
14. Inoue T, Nakanishi H, Inada K et al. Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction of urinary cytokeratin 20 detects transitional cell carcinoma cells. *J Urol* 2001; 166(6): 2134–2141.
15. Retz M, Lehmann J, Röder C et al. Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients. *Eur Urol* 2001; 39(5): 507–515.
16. Christoph F, Müller M, Schostak M et al. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA expression in bladder carcinoma by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Urology* 2004; 64(1): 157–161.
17. Fujii Y, Kageyama Y, Kawakami S et al. Detection of disseminated urothelial cancer cells in peripheral venous blood by a cytokeratin 20-specific nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(7): 753–757.
18. Gudemann CJ, Weitz J, Kienle P et al. Detection of hematogenous micrometastases in patients with transitional cell carcinoma. *J Urol* 2000; 164(2): 532–536.
19. Ribal MJ, Mengual L, Marín M et al. Molecular staging of bladder cancer with RT-PCR assay for CK 20 in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes: comparison with standard histological staging. *Anticancer Res* 2006; 26(1A): 411–419.
20. Osman I, Kang M, Lee A et al. Detection of circulating cancer cells expressing uroplakins and epidermal growth factor receptor in bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 111(6): 934–939.
21. Naoe M, Ogawa Y, Morita J et al. Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the Cell-Search system. *Cancer* 2007; 109(7): 1439–1445.
22. Gallagher DJ, Milowsky MI, Ishill N et al. Detection of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer. *Ann Oncol* 2009; 20(2): 305–308.
23. Li SM, Zhang ZT, Chan S et al. Detection of circulating uroplakin-positive cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1999; 162(3 Pt 1): 931–935.
24. Guzzo TJ, McNeil BK, Bivalacqua TJ et al. The presence of circulating tumor cells does not predict extravesical disease in bladder cancer patients prior to radical cystectomy. *Urol Oncol*. Epub ahead of print.
25. Karl A, Tritschler S, Hofmann S et al. Perioperative search for circulating tumor cells in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer. *Eur J Med Res* 2009; 14(11): 487–490.