

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Validace metody přímé detekce cirkulujících
nádorových buněk u pacientů s multiformním
glioblastomem.**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Pavel Stejskal
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	MUDr. Alona Řehulková
Supervizor:	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 11. 5. 2020

Bc. Pavel Stejskal

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval MUDr. Aloně Řehulkové za odborné vedení, trpělivý přístup a cenné rady při zpracovávání diplomové práce. Stejně tak děkuji MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. i kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny za poskytnutí zázemí a prostor pro vypracování této práce. Děkuji a vážím si také podpory mých nejbližších.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Pavel Stejskal
Název práce	Validace metody přímé detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů s multifórním glioblastomem.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	MUDr. Alona Řehulková
Supervizor:	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Teoretická část diplomové práce se zabývá multifórním glioblastomem, nejagresivnějším subtypem maligních nádorů centrální nervové soustavy. Cirkulující nádorové buňky jsou buňky primárního tumoru uvolněné do periferní krve ve snaze opustit hypoxické a nekrotické prostředí tumoru. Jejich detekce je nepříznivým faktorem s potenciálem založení vzdálených metastáz, které se vyskytují častěji, než je obecně předpokládáno.

Cílem praktické části diplomové práce je optimalizace stabilizace krevních vzorků a validace detekce cirkulujících nádorových buněk metodou přímé detekce systémem CytoTrack CT11TM. Z odběrových zkumavek CellSave, Streck a běžných zkumavek s obsahem solí kyseliny ethylendiamintetraoctové byla na základě analýzy viability buněk a DNA vybrána zkumavka Streck s nejdelší garancí stabilizace vzorku.

Samotná platforma CytoTrack CT11TM byla validována nejdříve na buněčné linii U87-MG a poté využita k analýze patientských vzorků s použitím markerů GFAP a vimentinu exprimovanými cirkulujícími nádorovými buňkami. U jednoho ze sedmi patientských vzorků byl detekován klastr a samostatná cirkulující nádorová buňka.

Klíčová slova	Multifórní glioblastom, cirkulující nádorové buňky, gliální acidický fibrilární protein, vimentin, CytoTrack
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Pavel Stejskal
Title	Validation of circulating tumor cells direct detection method in patients with glioblastoma multiforme.
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor I	MUDr. Alona Řehulková
Supervisor II	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

The theoretical part of the diploma thesis deals with the glioblastoma multiforme disease, the most aggressive subtype of malignant tumors of the central nervous system. Circulating tumor cells are primary tumor cells released into the peripheral blood in an effort to leave the hypoxic and necrotic environment of the tumor. Their detection is an unfavorable factor with a potential to establish distant metastases that occur more frequently than it is generally thought.

The aim of the experimental part of the diploma thesis is to optimize the stabilization of blood samples and to validate the method of direct detection of circulating tumor cells by the CytoTrack CT11™ system. Based on the cell viability and DNA stability analysis, The Streck tube with the longest guarantee of sample stabilization was selected from CellSave, Streck and conventional tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid salts.

The CytoTrack CT11™ platform was first validated on the U87-MG cell line and then used for analyses of the patient samples using GFAP and vimentin markers. A cluster and a single circulating tumor cell were detected in one of the seven patient samples.

Keywords	Glioblastoma multiforme, glial acidic fibrillar protein, vimentin, CytoTrack
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1.	Úvod	9
2.	Současný stav řešené problematiky	10
2.1	Multiformní glioblastom	10
2.1.1	Obecná charakteristika	10
2.1.2	Molekulárně-genetické rysy onemocnění	11
2.1.2.1	Mutace genů kódujících isocitrátdehydrogenasu a O6–methylguanin-DNA-methyltransferasu	11
2.1.2.1.1	Vliv mutací izoenzymů isocitrátdehydrogenasy na tumorigenezi	12
2.1.2.2	Růstové faktory a jejich receptory	14
2.1.2.3	Protein p53	14
2.1.2.4	Fosfatidylinositol 3-fosfatasa	15
2.1.2.5	Retinoblastomový protein	15
2.2	Progrese onemocnění	16
2.2.1	Šíření buněk primárního tumoru v rámci centrální nervové soustavy	16
2.2.2	Extrakraniální metastázy	17
2.2.2.1	Vliv fyziologie nervové soustavy na rozvoj extrakraniálních metastáz	18
2.2.2.1.1	Mozkové bariéry	18
2.2.2.1.2	Prostředí nervové soustavy	19
2.2.3	Přestup buněk přes hematoencefalickou bariéru	20
2.3	Cirkulující nádorové buňky	23
2.3.1	Oddělení buněk od primárního tumoru	23
2.3.1.1	Transformace buněk primárního tumoru	23
2.3.1.2	Gliálně-mezenchymální tranzice	24
2.3.1.2.1	Regulace gliálně-mezenchymální tranzice	24
2.3.1.2.1.1	Transkripční faktory	24
2.3.1.2.1.2	Významné signální dráhy	25
2.3.1.2.1.3	Nekróza a hypoxie	26
2.3.2	Detekce cirkulujících nádorových buněk	28
2.3.2.1	Markery cirkulujících nádorových buněk	28
2.3.3	Cirkulující nádorové buňky v krevním oběhu	31
2.4	Přehled metod detekce cirkulujících nádorových buněk	32
2.4.1	Vybrané markery cirkulujících nádorových buněk u pacientů s multiformním glioblastomem	34
2.4.1.1	Gliální fibrilární acidický protein	34
2.4.1.2	Vimentin	36
3	Experimentální část	38
3.1	Chemikálie	38

3.2	Materiál a metody	39
3.2.1	Biologický materiál	39
3.2.2	Výběr vhodných zkumavek pro odběr krevních vzorků	40
3.2.2.1	Krevní nátěr	41
3.2.2.2	Izolace krevní plazmy a DNA	41
3.2.2.3	Stanovení koncentrace DNA	42
3.2.3	Validace značení nádorových buněk na buněčné linii U-87 MG	42
3.2.4	Detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™	44
3.2.4.1	Zpracování krevního vzorku	44
3.2.4.2	Aplikace vzorku na CytoDisc™	44
3.2.4.3	Skenování vzorku	45
4	Výsledky	46
4.1	Výběr vhodných zkumavek pro odběr krevních vzorků	46
4.1.1	Krevní nátěry	46
4.1.2	Stabilita DNA	50
4.2	Validace značení nádorových buněk na buněčné linii U-87 MG	52
4.3	Detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™	55
4.3.1	Fyziologický krevní vzorek s buněčnou linií U87-MG	55
4.3.2	Krevní vzorky od pacientů s multifonním glioblastomem	55
5	Diskuze	66
6	Závěr	70
7	Literatura	71
8	Seznam použitých symbolů a zkratk	80

Cíle práce

- Zorientovat se v problematice detekce cirkulujících nádorových buněk, získat teoretické a praktické znalosti technologie přímé detekce s využitím CytoTrack CT11 systému, naučit se pracovat s patřičnými databázemi a softwarem.
- Provést selekci dostupných odběrových zkumavek a jejich validaci pro zabezpečení viability buněčných element v krevním vzorku během transportu z místa odběru k analýze.
- V rámci proof-of-concept studie zoptimalizovat detekci nádorových buněk v periferní krvi u pacientů s multiformním glioblastomem.

1. Úvod

Zhoubné gliomy jsou nejčastější a s vysokou úmrtností spojené primární maligní nádory centrální nervové soustavy. Biologicky nejagresivnějším subtypem je multiforní glioblastom (GBM, glioblastoma multiforme) astrocytárního původu. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO, z anglického termínu „World Health Organization“) jde o astrocytom IV. stupně malignity (Malzkorn *et al.*, 2016), který s sebou nese nízkou míru přežití i přes dostupnost léčebných postupů jako chirurgická resekce, chemoterapie či radiologická léčba. GBM představuje 50 % gliomů a jeho odhalení znamená pro pacienta nepříznivou prognózu, jen méně než 5 % pacientů se dožije více jak 5 let (Ostrom *et al.*, 2015). Fatální je obvykle důsledek lokální recidivy onemocnění pozorované většinou bez vzdálené metastázy. Jsou nicméně popsány i případy extraneurálního metastazování vyskytující se častěji, než je obecně předpokládáno (Rosen *et al.*, 2018). V několika studiích (MacArthur *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 2014; Krol *et al.*, 2018; Bang-Christensen *et al.*, 2019) bylo nedávno zdokumentováno, že buňky GBM mohou být izolovány z krevního oběhu. Vystávají tedy úvahy o hematogenní diseminaci GBM a vyvrácení zažitě představy o omezení GBM jen na centrální nervovou soustavu (CNS). Otázka možné role cirkulujících nádorových buněk (CTCs, z anglického termínu „circulating tumor cells“) ve vztahu k onemocnění však zůstává nadále otevřena pro nutnost jejich přesné charakterizace (Lombard *et al.*, 2015).

CTCs jsou buňky původem z primárního nádoru, jež se mohou přenášet cévním systémem, migrovat skrze konjunktivní tkáň různých orgánů a proliferovat za vzniku metastáz (Hillig *et al.*, 2015). Tyto buňky je možné detekovat na základě jejich molekulárních a genetických charakteristik. Detekce CTCs může sloužit jako indikace nádorové diseminace a může být proto použita pro formulaci prognózy s indikací adjuvantní terapie (Bidard *et al.*, 2013). Pro detekci CTCs byly navrženy různé metody zahrnující magnetickou separaci, filtraci na základě velikosti buněk, imunometody či dielektroforézu. Tyto metody mají společný rys, kterým je předpoklad pre-selekce buněk před vlastní analýzou (Hillig *et al.*, 2014). Předmětem zájmu této diplomové práce je přímá detekce CTCs u pacientů s GBM s využitím CytoTrack CT11TM systému. Jeho principem je značení nádorových buněk specifickými protilátkami spolu s fluorescenční analýzou bez nutnosti předchozí selekce buněk ve vzorku díky vysoké skenovací kapacitě (Gogenur *et al.*, 2017).

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Multifonní glioblastom

2.1.1 Obecná charakteristika

Primární tumory CNS, tedy takové, které vznikají *de novo* přímo v mozku, byly klasifikovány chirurgy a patology na základě jejich umístění a histologického charakteru. Tato klasifikace je důležitá při navrhování léčby konvenčními metodami, mezi které patří chirurgické zákroky, ozáření a chemoterapie, a přispívá ke správnému určení prognózy (Mendelsohn *et al.*, 2014; Villa *et al.*, 2018). Aktualizovaná klasifikace tumorů CNS od WHO z roku 2016 kombinuje histopatologický a molekulární přístup (Malzkorn *et al.*, 2016). Nutno dodat, že WHO klasifikace rozlišuje čtyři prognostické stupně odrážející stupeň malignity. Stupeň I zahrnuje více ohraničené benigní tumory s nízkým proliferacním potenciálem, jež se vyskytují zejména během dětství či u mladých dospělých osob. Tumory spadající do stupně II-IV jsou difuzně infiltrativní se zvýšenými buněčnými abnormalitami a lze je označit jako difuzní. Pro difuzní gliomy (typ tumorů vycházející z nervových podpůrných buněk, resp. gliových buněk) je typická rozsáhlá difuzní infiltrace gliomových buněk do hostitelské mozkové tkáně. Tyto agresivní nádory mozku jsou spojovány se špatnou prognózou, prudkým zhoršením kvality života pacientů a nízkou mírou jejich přežití (Alfonso *et al.*, 2017).

Gliom je jeden z nejagresivnějších a nejběžnějších primárních tumorů CNS. Gliom původem z astrocytů, tedy jedněch ze tří typů gliových buněk, nazýváme astrocytom. Astrocytom IV. stupně malignity dle WHO je znám jako multifonní glioblastom (Ostrom *et al.*, 2015; Malzkorn *et al.*, 2016), který tvoří zhruba 50 % maligních gliomů CNS. Při léčbě GBM jsou využívány již zmíněné chirurgické zákroky, ozáření či chemoterapie. I přes kombinaci těchto metod však ze statistik vyplývá medián přežití po stanovení diagnózy jen kolem 16 měsíců (Ostrom *et al.*, 2015; Karim *et al.*, 2016), protože léčbu této nemoci znesnadňuje několik faktorů. Mezi hlavní patří rozmanitost genetických abnormalit omezující použití terapeutik specifických pro určitou dráhu, dalším faktorem je infiltrativní charakter nádorových buněk znemožňující chirurgické odstranění tumoru a v neposlední řadě také omezení podávání chemoterapeutik na dané buňky vlivem relativně neprostupné hematoencefalické bariéry (Grillone *et al.*, 2018).

Globální incidence GBM se pohybuje okolo 3 případů na 100 tisíc osob (Dolecek *et al.*, 2012) s tím, že Philips *et al.* (2018) ve svém výzkumu zaznamenali

nepřetržitý nárůst incidence GBM mezi lety 1995-2015 napříč pohlavím i věkovými kategoriemi v rámci Velké Británie. Z tohoto výzkumu vyplývá, že vrchol incidence se nachází u osob starších 55 let, které tak tvoří nejohroženější věkovou skupinu.

2.1.2 Molekulárně-genetické rysy onemocnění

Pro multiforní glioblastom je charakteristická dynamicky se vyvíjející síť heterogenních genetických, epigenetických nebo posttranskripčních poruch, které se pravděpodobně akumulují do té míry, že vyústí v samotnou tumorigenezi. Takto vzniklý *de novo* glioblastom označujeme jako primární, sekundární je obvykle u mladších pacientů důsledkem progresu astrocytomu nižšího stupně (Alfonso *et al.*, 2017). Deregulované dráhy lokalizované v buněčném jádře a podílející se na rozvoji i růstu mozkových nádorů zahrnují zejména signalizaci pomocí růstových faktorů a receptorových tyrosinkinás (RTK, EC 2.7.10.1), signalizaci skrze fosfatidylinositol-3-kinasy (EC 2.7.1.) a AKT-kinasy (EC 2.7.11.1). Mutační dysfunkce postihují dále tumor supresorové dráhy proteinu p53 a retinoblastomového proteinu či pro metabolismus nezbytný enzym isocitrátdehydrogenasu (EC 1.1.1.41) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Zinn *et al.*, 2017). Mimo to glioblastom vykazuje hypomethylaci a na specifické oblasti (většinou v dinukleotidových CpG (cytosin-fosfát-guanin) ostrůvkách promotorů tumor supresorových genů) omezenou hypermethylaci genomu. Toto obecně vede ke zvýšení nestability genomu, umlčování některých genů (u glioblastomu zejména tumor supresorových genů *TP53* a *PTEN*) a aktivaci onkogenů (Zhang *et al.*, 2011).

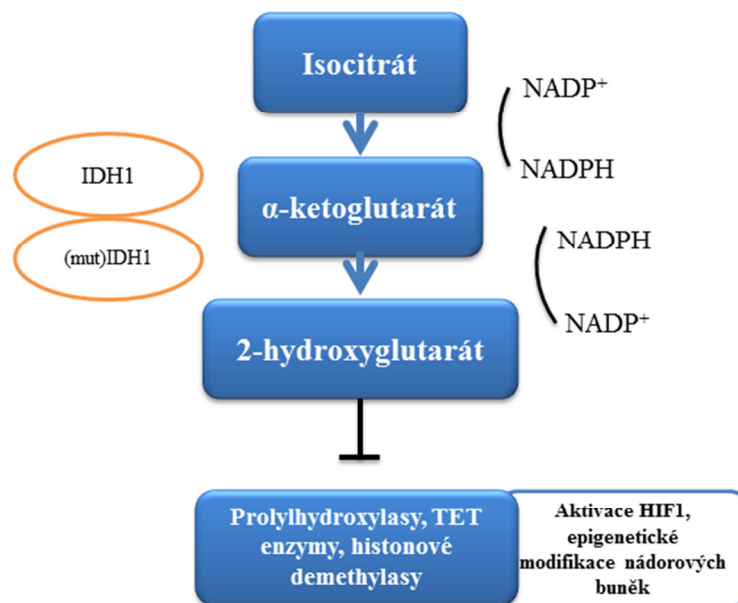
2.1.2.1 Mutace genů kódujících isocitrátdehydrogenasu a O6-methylguanin-DNA-methyltransferasu

Na počátku tumorigeneze pravděpodobně stojí 2 abnormality označované jako možné biomarkery, ačkoliv na tomto označení nepanuje shoda. Tou první je mutace genu kódující významný enzym Krebsova cyklu isocitrátdehydrogenasu (IDH), ve spojitosti s gliomy nižších i vyšších stupňů jde o nejčastěji skloňovanou abnormalitu a zřejmě i jednu z prvotních v rámci tumorigeneze (Jovčevska, 2019). Dle zmíněné klasifikace tumorů WHO z roku 2016 jsou rozlišovány 3 typy GBM, kdy rozlišovacím znakem je identifikace mutací genů kódujících enzym isocitrátdehydrogenasu 1 (IDH1) (Agnihotri *et al.*, 2014). Lidská IDH zahrnuje 3 isoformy – zmíněnou IDH1 vyskytující se v cytoplazmě a peroxisomech (na niž podle Yan *et al.* (2009) připadá 90 % všech mutací IDH), dále isoformy isocitrátdehydrogenasu 2 (IDH2)

a isocitrátdehydrogenasu 3 (IDH3) vyskytující se v mitochondriích. Právě první dvě zmíněné isoformy homodimerního charakteru jsou spojovány se vznikem a progresí tumorů CNS (Zhang *et al.*, 2013). Nejběžnější je mutace R132H pozorovaná až v 90 % abnormalit IDH1 v astrocytických a oligodendroglálních gliomech (Yan *et al.*, 2009). Jde o substituci argininu za histidin na 132. pozici v rámci aktivního místa (Balss *et al.*, 2008), méně často jde o substituci za cystein (mutace s označením R132C), serin (R132S), glycin (R132G) nebo leucin (R132L) (Weller *et al.*, 2011). Typy GBM klasifikované dle právě popsané systematiky jsou tedy následující: IDH-wildtype korespondující s klinicky definovaným primárním glioblastomem a postihující zejména starší pacienty, IDH-mutant korespondující s tzv. sekundárním glioblastomem a postihující zejména mladší pacienty (Ohgaki a Kleihues, 2013) a tumory, u nichž nelze spolehlivě IDH stanovit (Chen *et al.*, 2014).

2.1.2.1.1 Vliv mutací izoenzymů isocitrátdehydrogenasy na tumorigenezi

Pro svoji komplexnost není zcela jednoduché popsat přesný vliv mutací isocitrátdehydrogenasy (IDH) na vznik glioblastomu. Úvodem je však jednoznačně vhodné zmínit, že mutace IDH1/2 v aktivním místě vede k významnému snížení afinity pro substrát tohoto enzymu, jímž je isocitrát. Bylo zjištěno, že mutantní forma IDH1/2 může výrazně inhibovat aktivitu wild-type formy IDH1/2 zformováním heterodimeru (viz Obr. 1). To s sebou přirozeně nese i snížení enzymové funkce a tím i sníženou produkci NADPH a α -ketoglutarátu (Narasimhaiah *et al.*, 2012). Mutantní IDH1/2 mimo to disponují schopností produkovat 2-hydroxyglutarát redukcí α -ketoglutarátu za spotřeby NADPH (Dang *et al.*, 2009). Ačkoliv mechanismus, kterým mutace IDH přispívají k rozvoji rakoviny, nejsou přesně popsány, některé studie naznačují negativní vliv abnormálních hladin 2-hydroxyglutarátu na tumorigenezi. Tento vedlejší produkt aberantní IDH1/2 kompetitivně inhibuje α -ketoglutarát-dependentní dioxygenasy (EC 1.14.11) díky své strukturní podobnosti s α -ketoglutarátem (Shih a Levine, 2012). Mezi tyto enzymy patří mimo jiné prolyl-hydroxylasy (EC 1.14.11.29) inhibující hypoxia-induced factor (HIF1, transkripční faktor indukovaný hypoxií a ovlivňující expresi různých genů). Stabilizace HIF1 vyplývající z inhibičních účinků 2-hydroxyglutarátu má za následek aktivaci řady genů, které mohou podporovat růst nádorových buněk, angiogenezi a metastázy. Snížení meziproductů Krebsova cyklu postihuje také míru makromolekulární biosyntézy a narušuje proliferaci buněk



Obr. 1 Inhibice aktivity wild-type (wt) isocitrátdehydrogenasy (IDH). V důsledku mutace IDH dochází ke spojení s wtIDH a tvorbě heterodimeru. Fyziologická IDH1 převádí isocitrát na α -ketoglutarát za vzniku NADPH a naopak mutantní IDH1 protichůdně konvertuje α -ketoglutarát na 2-hydroxyglutarát za spotřeby NADPH. 2-hydroxyglutarát inhibuje prolylhydroxylasy, rodinu TET enzymů (α -ketoglutarát-dependentní dioxygenasy katalyzující postupnou oxidaci 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin, 5-formylecytosin a 5-karboxylcytosin, což vede k demethylaci DNA) a histonové methylasy (Převzato a upraveno z Agnihotri *et al.*, 2014).

(Zhang *et al.*, 2013). Mimo to bylo prokázáno, že vnesení mutantní IDH1 do lidských astrocytů způsobuje funkční změny specifických histonových marketů narušením histonové demethylace a indukci DNA hypermethylace (Lu *et al.*, 2012).

Druhou primárně vyhledávanou abnormalitou je umlčení genu *MGMT* kódující O6-methylguanin-DNA-methyltransferasu (EC 2.1.1.63) hypermethylací promotoru a/nebo monosomií příslušného chromozomu (10q26). Tato methyltransferasa je DNA opravný enzym katalyzující opravu alkylovaného O6-methylguaninu zpět na guanin. Dysfunkce tohoto reparačního enzymu na jednu stranu zvyšuje potenciál rozvoje rakovinného onemocnění, na druhou stranu však pravděpodobně vede k vyšší účinnosti alkylačních chemoterapeutik (např. temozolomidu). Vlivem těchto terapeutik dochází k alkylaci DNA, přerušení vlákna a navození apoptózy (Ramalho-Carvalho *et al.*, 2013; Jovčevska, 2019).

2.1.2.2 Růstové faktory a jejich receptory

Významné je postižení epidermálního růstového faktoru (EGF, z anglického termínu „epidermal growth factor“) a destičkového růstového faktoru (PDGF, z anglického termínu „platelet-derived growth factor“), resp. jejich receptorů (EGFR a PDGFR). Bylo prokázáno, že alespoň jedna z těchto RTK je pozměněna u 67,3 % studovaných případů GBM, z toho 57,4 % EGFR a 13,1 % PDGFR (Brennan *et al.*, 2013). Tyto růstové faktory jsou klíčové pro gliogenezi skrze aktivaci intracelulární kaskády spřažené s G-proteinem a druhými posli (Zheng *et al.*, 2013). Tyto kaskády mohou být narušené v důsledku nadexprese ligandů nebo receptorů či obou za tvorby autokrinní smyčky. Může jít také o genomickou amplifikaci, alternativní splicing a/nebo mutaci v genu kódující daný receptor vedoucí k jeho aktivaci za současné absence vazby ligandu (Brennan *et al.*, 2013).

2.1.2.3 Protein p53

Tumor supresorový gen *TP53* kóduje protein p53, což je transkripční faktor klíčový v prevenci vzniku nádorů. Zprostředkovává řadu buněčných odpovědí prostřednictvím domény interagující s danou sekvencí DNA a doménami účastnicími se různorodých regulačních drah a regulací transkripční aktivity. Fyziologicky je hladina p53 nízká a regulována ubikvitin ligasami MDM2 (EC 2.3.2.27) a homologem MDM4 skrze ubikvitinylaci a degradaci (Wade *et al.*, 2013). Zvýšení hladiny p53 je pak důsledkem přerušení interakce mezi danou ligasou a p53 v odpovědi na stres, jako je poškození DNA. Funkcí p53 je tedy zpracování stresových signálů a zastavení buněčného cyklu, podpora stárnutí a apoptózy s cílem eliminovat buňky s poškozenou DNA (Kasthuber *et al.*, 2017). Různorodé a početné mutace v *TP53* či genech spřažených s funkcí p53 jsou předmětem zájmu mnohých výzkumů pro jejich relativně vysokou četnost u multifornního glioblastomu, ačkoliv vždy záleží na konkrétním provedení a zaměření dané studie. Jedna z forem disfunkce tumor supresoru p53 je pozorována řádově u 25-30 % případů, při čemž vyšší procento (asi 60-70 %) připadá na sekundární glioblastom. Mutace *TP53* je spojena s progresí onemocnění a dysfunkce p53 pak s více invazivním, proliferativním a kmenovým fenotypem doprovázeným nižší mírou apoptózy (England *et al.*, 2013; Djuzenova *et al.*, 2015; Shajani-Yi *et al.*, 2018; Forte *et al.*, 2019).

2.1.2.4 Fosfatidylinositol 3-fosfatasa

Mimo přímé či nepřímé aberace funkce p53 je nutno zmínit také abnormality u tumor supresorového genu *PTEN* (fosfatasový a tenzinový homolog) kódující fosfatidylinositol-3-fosfatasu (EC 3.1.3.67). Tato fosfatasa negativně reguluje fosfatidylinositol-3-kinasovou signální dráhu. V rámci této signalizace extracelulární antiapoptické, proliferační a růstové faktory (např. EGFR) svojí vazbou na extracelulární domény RTK je aktivují a způsobí tím aktivaci fosfatidylinositol-3-kinasy. Ta fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PI(4,5)P₂) na trifosfát PI(3,4,5)P₃, což je kotva mj. pro proteinkinasu B (označována také jako AKT). AKT je po vazbě na tuto kotvu fosforylována a takto aktivní předává signál dále do buňky např. aktivací mTOR proteinu či regulací dalších kinas a transkripčních faktorů. *PTEN* fosfatasa negativně reguluje tuto kaskádu inaktivací PI(3,4,5)P₃ zpět na difosfát (Carico *et al.*, 2012; Alberts *et al.*, 2015), avšak její funkce je mnohdy narušena v důsledku ztráty heterozygosity genu či jeho mutace s následným onkogenním potenciálem. V případě multifornního glioblastomu jde o výskyt mezi 5-40 % případů, kdy v 60 až 80 % jde o ztrátu heterozygosity (Koul, 2008; Srividya *et al.*, 2011).

2.1.2.5 Retinoblastomový protein

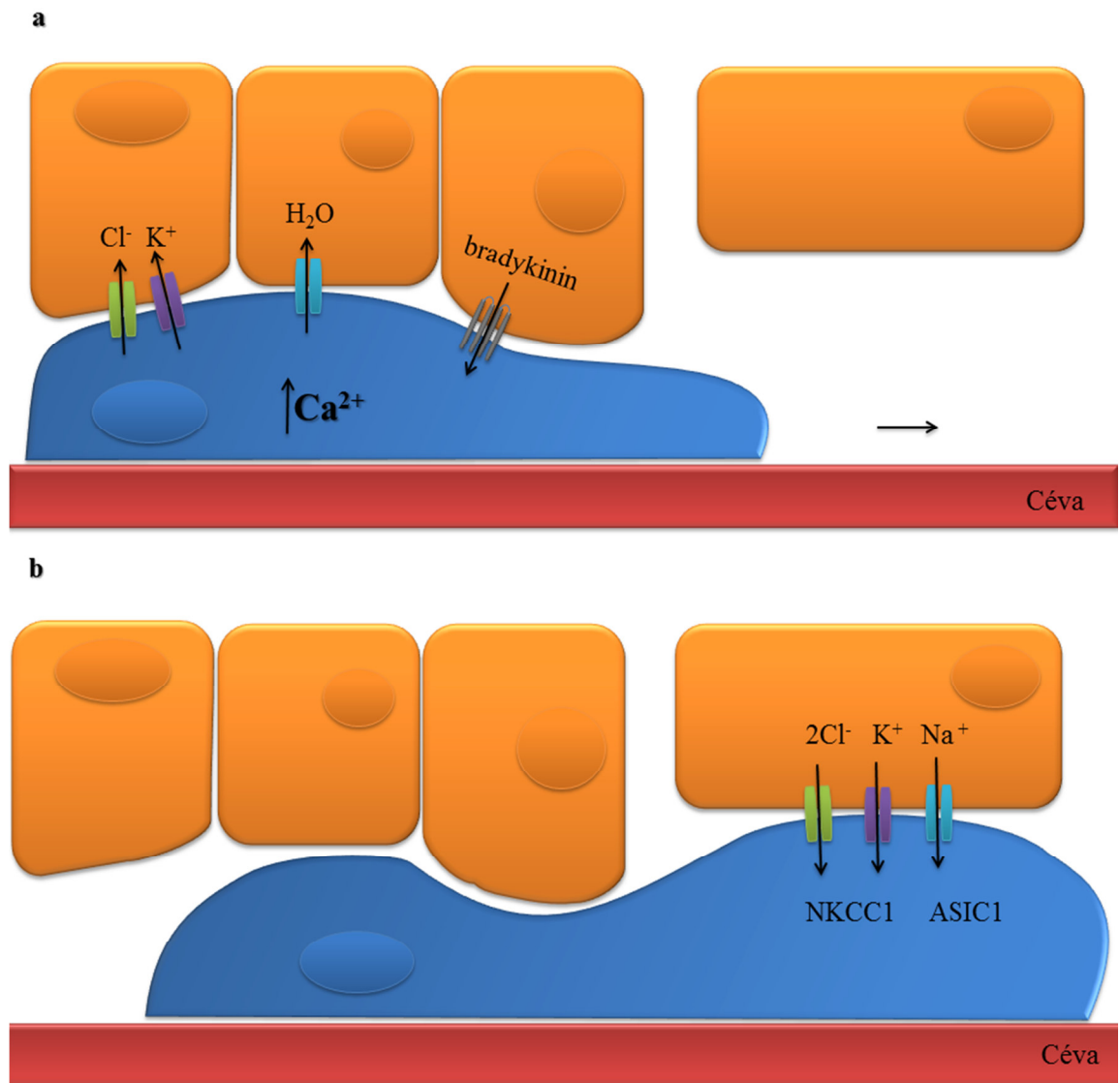
Tumorsupresorový gen, resp. retinoblastomový (RB) protein, který kóduje, je významný regulátor buněčného cyklu negativní regulací transkripčních faktorů E2F. Tento jaderný transkripční faktor RB usměřňuje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu tak, že ve své nefosforylované formě se váže na E2F, čímž je inhibuje a vzniklý komplex potlačuje transkripci např. cyklinu D a E. Fosforylace RB proteinu cyklin-dependentními kinasami (CDK, EC 2.7.11.22) jej vyvazuje z vazby s E2F v důsledku interakce růstových faktorů s příslušnými receptory s následným vznikem komplexu CDK s příslušnými kofaktory cykliny (Alberts *et al.*, 2015). Inaktivace RB kaskády přerušením vazby RB-E2F může nastat v důsledku mutace RB-kódujícího genu, nízké exprese RB nebo inaktivace fosforylací CDK/cyklin komplexy kvůli disbalanci kompetice mezi CDK inhibitory rodiny proteinů Ink4 a D-cykliny. Alterace této dráhy byla pozorována asi u 40-70 % případů glioblastomu (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Ohgaki a Kleihues, 2009).

2.2 Progrese onemocnění

2.2.1 Šíření buněk primárního tumoru v rámci centrální nervové soustavy

Multiformní glioblastom je znám pro schopnost buněk primárního tumoru difúzně se šířit do okolní mozkové tkáně a formovat zde satelitní tumory. Děje se tak většinou jednotlivými buňkami než klastry, a to je významná komplikace jak pro moderní zobrazovací metody, tak pro ty léčebné (Hatoum *et al.*, 2019; Cunha a Madaun, 2019). I přes radikální chirurgické resekce je v důsledku rozptýlení nádorových buněk v mozkové tkáni častý relaps onemocnění. Chirurgický zákrok totiž nezaručuje jejich kompletní odstranění a chemoterapie je vzhledem k nedostatečné prostupnosti hematoencefalické bariéry pro léčiva a vlastně i k samotné povaze buněk (viz dále) účinná jen omezeně (Manini *et al.*, 2018).

Gliomové buňky mají zachovanou část svého neurobiologického původu a sdílí tedy některé rysy s fyziologickými buňkami CNS. Kromě citlivosti na neurotransmitery a neuropeptidy spolu s interakcemi s extracelulární matrix jde hlavně o migraci podél existujících mozkových struktur (nervových svazků, mozkových cév a plen) jako v případě mozkových buněk při embryonálním vývoji či zralých kmenových buněk mozku (Cuddapah *et al.*, 2014). V kontextu této kapitoly je také významné, že glioblastomové buňky jsou chemotaxí přitahovány směrem k cévám a migrují podél nich (Montana a Sontheimer, 2011), uvolňují nadměrné množství glutamátu sloužícího jako autokrinní a parakrinní ligand podporující růst a invazi buněk aktivací Ca^{2+} dostupných receptorů α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny (AMPA) v excitačních synapsích CNS. Interakce glutamátu s těmito receptory má za následek vstup Ca^{2+} iontů do buňky, čímž se podporuje buněčná migrace a proliferace skrze aktivaci proteinkinasy B (Corsi *et al.*, 2019), obecně známé kinasy fosforylující proteiny regulující právě proliferaci, buněčný cyklus a apoptózu. Vlivem Ca^{2+} iontů dochází také k aktivaci K^+ kanálů $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ a Cl^- kanálů ClC3 , které jsou významné v řízení buněčného cyklu a hlavně pak esenciální pro buněčnou migraci v rámci mozkové tkáně. Otevření zmíněných kanálů vede k hypoosmotickému intracelulárnímu prostředí, resp. eflux Cl^- a K^+ iontů ven z buňky k efluxu vody skrze akvaporiny za současného snížení buněčného objemu. Svůj objem buňky mohou získat influxem iontů skrze $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ kotransportér 1 (NKCC1) nebo iontovým kanálem pro detekci kyseliny (ASIC1, z anglického termínu „acid-sensing channel 1“). Tento hydrodynamický model mechanismu pohybu buňky (Obr. 2) spočívá ve snižování



Obr. 2 Hydrodynamický model pohybu glioblastomové buňky a překonání překážky. (a) Buňka (modře) omezená v pohybu (například jinými buňkami – oranžově) zmenšuje svůj objem za účelem překonání překážky. Příslušný stimul vede ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} a následné aktivaci a otevření iontových kanálů a tím k efluxu Cl^- a K^+ a toku vody po osmotickém gradientu ven. Influx iontů skrze Na^+ - K^+ - Cl^- kontransportér 1 (NKCC1) a iontový kanál ASIC 1 a opětovné zvětšení buňky (Vytvořeno podle Cuddapah *et al.*, 2014 a Hatoum *et al.*, 2019).

a zvyšování objemu různých částí buňky v důsledku přítoku nebo odtoku elektrolytů (Cuddapah *et al.*, 2014, Klumpp *et al.*, 2018; Hatoum *et al.*, 2019).

2.2.2 Extrakraniální metastázy

Extrakraniální metastázy (ECMs, z anglického termínu „extracranial metastases“) se vyskytují velmi vzácně, resp. u méně než 2 % všech diagnostikovaných glioblastomů s mediánem přežití asi 1,5 měsíce (Ray *et al.*, 2015). ECMs se nejčastěji vyskytují v lokálních mízních uzlinách (typicky krčních), plicích, játrech a kostech (Lun *et al.*, 2011). Se stále se vyvíjejícími metodami léčby jak na straně paliativní péče,

chirurgie či chemoterapie, tak na straně komplexních léčebných terapií lze však očekávat rostoucí trend výskytu ECMs. Mimo to je tato diagnóza pro pacienty většinou v konečném důsledku stále fatální, o nutnosti výzkumu v této oblasti tedy nemůže být pochyby (Cunha a Madaun, 2019).

Přesný a ucelený mechanismus šíření buněk primárního tumoru mimo centrální nervovou soustavu s následným rozvojem metastáz není znám. Vzácnost výskytu je spojována s velmi krátkým přežitím pacientů, resp. s omezeným časem pro uvolnění dostatečného počtu CTCs a iniciaci vzniku metastáz. Mimo to mají vliv také přirozené biologické překážky bránící nádorovým buňkám rozšíření mimo centrální nervovou soustavu (Lun *et al.*, 2011; Prabhakaran *et al.*, 2019).

2.2.2.1 Vliv fyziologie nervové soustavy na rozvoj extrakraniálních metastáz

2.2.2.1.1 Mozkové bariéry

V první řadě je vhodné zmínit hematoencefalickou bariéru, rozhraní mozkové tkáně a krevního oběhu. Je tvořena vrstvou endotelových buněk, jež v mozkových kapilárách vytvářejí charakteristická těsná a adhezivní spojení (tzv. tight a adherens junctions; mimo ně také gap junctions významné v intercelulární komunikaci), dále bazální membránou z bazální laminy endotelových buněk a dále výběžky astrocytů nasedajících na bazální membránu. Tight junctions tvoří klíčovou komponentu bariéry díky absenci mezibuněčných prostor a jde o komplexní interakci mezi transmembránovými adhezivními proteiny (occludiny, claudiny a spojivé adhezivní molekuly (zkr. JAM, z anglického termínu „junctional adhesion molecule“)) sousedních buněk, cytoplasmatickými proteiny spojující transmembránové proteiny s aktinovými filamenti udílejícími komplexu základní fyzickou podporu. Adherens junctions jsou uspořádány obdobně s transmembránovými proteiny cadheriny zodpovědnými za adhezi mezi buňkami a napojenými na podpůrné cytoplasmatické proteiny cateniny regulující signální procesy (McCrea a Gottardi, 2016).

Popisované rozhraní blokuje intercelulární cestu transportu mezi arteriální krví a nervovou tkání. Jde o strukturální a biochemickou bariéru regulující transport molekul a zachovávající homeostázu (Stamatovic *et al.*, 2016). K výše popsanému je však potřeba uvést také existenci jakéhosi spletitého řečiště štěrbin sloužící k odvodu odpadních látek z mozku mozkomíšní tekutinou (Iloff *et al.*, 2012). Vzhledem k jeho relativně nedávnému objevu není vztah tohoto systému k rovnováze hematoencefalické

bariéry přesněji prozkoumán. Mimo hematoencefalickou bariéru chrání CNS a udržuje vnitřní homeostázu také podobná, ale permeabilnější hematolikvorová bariéra. Skládá se také z tight junctions s occludiny a claudiny (tvořených tentokrát epiteliálními buňkami), bazální membrány a fenestrované vrstvy endotelu kapilár (Louveau *et al.*, 2017).

Jak již bylo předesláno výše, přesný a ucelený mechanismus šíření nádorových buněk mimo CNS, resp. přestupu přes biologické bariéry, není spolehlivě prostudovaný. Nejčastěji zmiňovaná příčina je v této věci chirurgický zásah do CNS spojený s narušením hematoencefalické bariéry a otevřením mozkových cév. ECMs byly však pozorovány i u pacientů bez chirurgické intervence do CNS (Rahmawati *et al.*, 2019).

2.2.2.1.2 Prostředí nervové soustavy

Další pomyslnou překážkou v rozvoji metastáz z CTCs je kromě možného nedostatku potřebných růstových faktorů pro tyto buňky i zřejmě vysoká stromatální rozdílnost mezi CNS a jinými orgány, kdy glioblastomové buňky pravděpodobně přednostně adherují na neurální stroma (Lun *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2015). Jiným předpokladem je přirozená nepříznivost komponent extracelulární matrix CNS pro metastatický proces ve fázi putování buněk do periferní krve. Diseminaci může komplikovat zejména absence proteinů kolagenu, fibrinonektinu či lamininu v extracelulární matrix CNS. Dalším z možných vysvětlení paradoxně nízkého výskytu takto agresivního onemocnění může tedy být absence vhodného prostředí pro multiplikaci metastatických buněk (Rahmawati *et al.*, 2019; Cunha a Madaun, 2019).

V kontextu CNS a následujících řádků je vhodné zmínit zejména kolagen typu I exprimovaný v mnoha jiných orgánech těla. Je důležitý pro strukturní integritu, řízení buněčných funkcí a signalizace interakcemi se širokou škálou proteinů. Kolagen IV je oproti kolagenu I hlavní forma kolagenu v mozku, ačkoliv kolagenu je zde celkově velmi omezené množství (Payne a Huang, 2013). Podle Yu *et al.* (2018) je zmíněný protein fibronectin pro glioblastomové kmenové buňky (zkr. GSCs, z anglického termínu „glioma stem-like cells“) významný pro adhezi, proliferaci a diferenciaci snížením míry apoptózy skrze transkripční faktor p53 a zvýšením exprese P-glykoproteinu s následným zvýšením chemorezistence k chemoterapeutiku carmustinu. ATP-dependentní ATP-binding cassette transportér 1 (ABCB1), označovaný též jako P-glykoprotein, se nachází mimo jiné v membráně endotelových

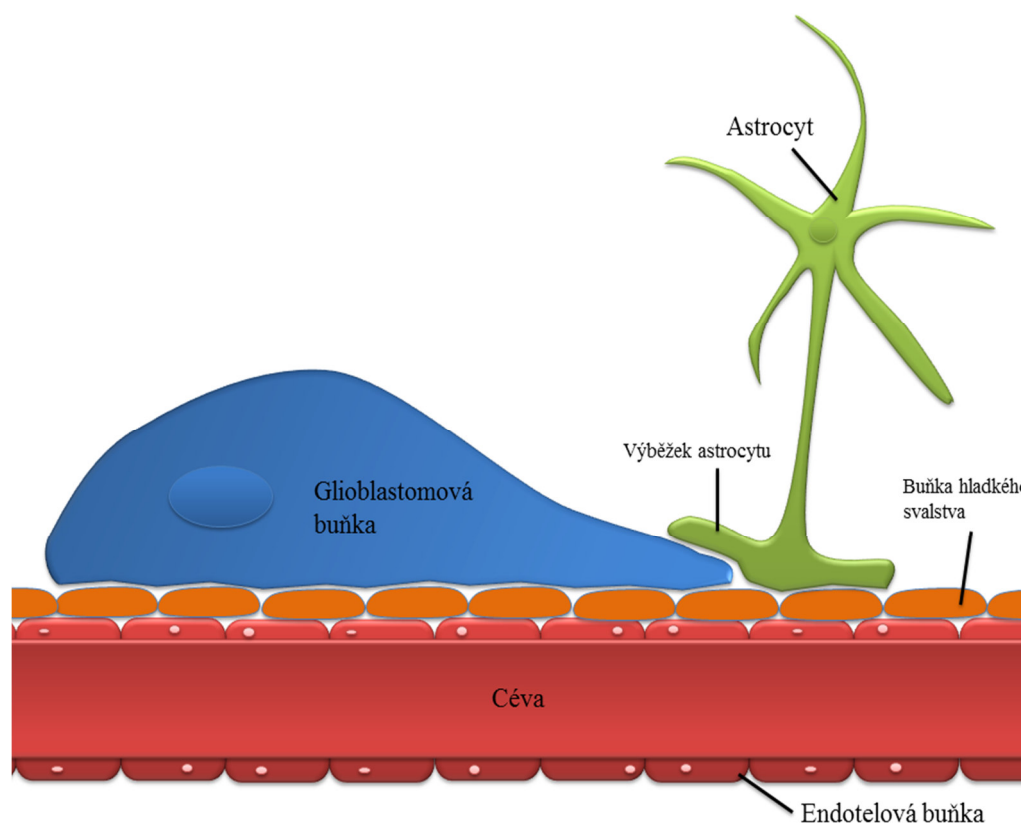
buněk kapilár tvořících hematoencefalickou bariéru a zajišťuje transport xenobiotik z mozkomíšní tekutiny do krve. Podstatou uváděné chemorezistence bylo zvýšení exprese ABCB1 v GSCs.

2.2.3 Přestup buněk přes hematoencefalickou bariéru

Bližší rozbor vlastní diseminace glioblastomových buněk do krevního oběhu souvisí s již zmíněnou schopností migrovat směrem k cévám a podél nich. Není jisté, zda jde o náhodný či sofistikovanější proces, ale pravděpodobně v něm bude hrát roli více faktorů (Hatoum *et al.*, 2019). Jedním z nich je objev sekrece bradykininu endoteliálními buňkami mozkových cév. Tento vasodilatačně působící peptid se váže na BR-2 bradykininový receptor spřažený s G-proteinem na povrchu glioblastomových buněk a aktivuje jej, což má za následek zvýšenou intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů. V konečném důsledku se to odráží v zapojení Ca^{2+} -dependentních iontových kanálů exprimovaných glioblastomovými buňkami ($K_{Ca3.1}$ či $ClC3$) ve změně tvaru a objemu při usnadnění motility těchto buněk podél cév výše popsáním hydrodynamickým mechanismem – viz Obr. 2 (Montana a Sontheimer, 2011; Hatoum *et al.*, 2019).

V kontextu atrakce glioblastomových buněk směrem k extrakraniální diseminaci je dále důležité, že extracelulární protein fibronectin je uvnitř CNS přítomen jen v rámci bazální membrány v hematoencefalické bariéře kolem cév. K cévám atrahované buňky tak mohou být stimulovány k invazivnosti v důsledku interakce s tímto stimulačním proteinem (Quail a Joyce, 2017).

S tím, jak postupují glioblastomové buňky podél povrchu cév, výběžky astrocytů nasedající na bazální membránu v rámci hematoencefalické bariéry pravděpodobně tvoří fyzickou překážku v jejich dalším pohybu. Tyto výběžky jsou proto vytlačovány od povrchu cévy, v důsledku čehož dochází k prvnímu fyzickému porušení celistvosti hematoencefalické bariéry a celkově i rozrušení tzv. neurovaskulární jednotky (viz Obr. 3), jakéhosi komplexu interakcí mezi neurony a non-neurálními buňkami (endoteliální, gliové, pericyty, cirkulující imunitní buňky) představující širší kontext hematoencefalické bariéry. Je také přerušena regulace průtoku krve zprostředkovanou astrocyty v odezvě na neuronovou aktivitu a mimo to transport metabolitů k neuronům s excitotoxickými následky. Naopak glioblastomové buňky s krevním řečištěm na dosah logicky získávají snadný přístup ke kyslíku a nutrientům (Watkins *et al.*, 2014). Vznikají-li v důsledku zmíněných následků místní ischemie, může se to negativně



Obr. 3 Rozrušení hematoencefalické bariéry. Glioblastomová buňka se pohybuje podél cévy a vytlačuje výběžky astrocytů z jejich fyziologického přilnutí k cévě, resp. buňkám hladkého svalstva pokrývajícím cévu. Následkem toho dochází k degradaci spojení mezi endoteliálními buňkami a tím pádem k dysfunkci hematoencefalické bariéry (Převzato a upraveno podle Watkins *et al.*, 2014).

odrazit na celistvosti zmíněných junctions a tedy celé hematoencefalické bariéry například nezdárnými posttranslačními úpravami junction proteinů či jejich proteosomální degradací (Stamatovic *et al.*, 2016; Malara a Donato, 2018).

Významným faktem pro diseminaci glioblastomových buněk do periferní krve ale i pro šíření prostředím CNS je schopnost těchto buněk sekretovat proteolytické enzymy. Bylo zjištěno, že jde o nadprodukcí především těchto proteas: serinová proteasa uPA (EC 3.4.21.73), cysteinová proteasa cathepsin B (EC 3.4.22.1), Zn^{2+} -dependentní matrix metaloproteasy (MMP, z anglického termínu „matrix metalloproteinase“) v čele s MMP1 (EC 3.4.24.7), MMP2 (EC 3.4.24.24) a MMP9 (EC 3.4.24.35), dále povrchové a sekretované proteasy ADAMs (z anglického termínu „a disintegrin and metalloproteinase“, EC 3.4.24.46) (Cuddapah *et al.*, 2014). Proteolýza je významnou interakcí s extracelulární matrix CNS usnadňující motilitu nádorových buněk v důsledku degradace komponent tohoto prostředí. Kromě toho je naprosto

klíčová pro perivaskulární invazi těchto buněk, tedy směrem k cévám a pohybu kolem nich (Hatoum *et al.*, 2019).

Proteolytická degradace extracelulárních domén proteinů tight, adherens a gap junctions metaloproteasami a ADAMs proteasami vedou ke zvýšení permeability těchto spojů. Štěpené fragmenty proteinů jsou většinou inaktivovány a mohou být recyklovány endotheliální buňkou nebo uvolněny do periferní krve jako potenciální indikátor stupně porušenosti mozkové bariéry (Stamatovic *et al.*, 2016). Sevenich *et al.* (2014) ve své práci osvětlili spojitost zvýšené koncentrace cathepsinu S (EC 3.4.22.27) s rozvojem mozkových metastáz kvůli schopnosti této proteasy štěpit kromě E-cadherinu i proteiny rodiny JAM a některé occludiny a claudiny. Aktivátor plasminogenu typu urokinasy uPa (z anglického termínu „urokinase-type plasminogen activator receptor“) spolu se svým receptorem uPAR je pak považována za významnou proteasou v invasi a neovaskularizaci glioblastomu. Kromě pozitivní zpětné vazby s plazminem schopným degradovat mnoho komponent extracelulární matrix může přímo i nepřímo aktivovat některé pro-formy kolagenas (EC EC 3.4.24.34) odpovědných za degradaci komponent resistantních k plasminu (Hatoum *et al.*, 2019).

2.3 Cirkulující nádorové buňky

2.3.1 Oddělení buněk od primárního tumoru

V přechodí kapitole byly shrnuty dostupné poznatky o možném mechanismu progresu onemocnění ve smyslu šíření buněk primárního tumoru v rámci CNS a do periferní krve. Následující odstavce budou věnovány původu samotných CTCs a jejich cestě od primárního tumoru přes krevní řečiště po místo potenciálního vzniku vzdálených metastáz.

Nekontrovaná proliferace a aberantní migrace jsou nepochybně základními rysy rakovinného onemocnění. High-grade gliomy utváří tumory s výrazně proliferativním a nekrotickým buněčným jádrem a vysoce mobilními buňkami v peritumorální oblasti. Není překvapující, že ona rapidní buněčná proliferace způsobuje lokální vyčerpání živin, resp. hypoxii, zánět, nekrotické oblasti a produkci tomu odpovídajících tkáňově specifických transkripčních faktorů a signálních molekul. Důsledkem je pak tzv. pseudopalisádování gliomových buněk na periferii tumoru. Jde o nekrotické zóny ohraničené hustě nasadlými hypoxickými buňkami tumoru exprimující geny spojené s agresivními rysy onemocnění, konkrétně s angiogenezí, degradací extracelulární matrix a migrací. Kromě níže uvedených jde zejm. o geny kódující HIF1, angiogenní faktor IL8 či vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF, z anglického termínu „vascular endothelial growth factor“) (Cooper *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2015).

2.3.1.1 Transformace buněk primárního tumoru

V obecném měřítku je u řady rakovinných onemocnění patrná tendence buněk tumoru čelit vnějším nepříznivým vlivům podstoupením biochemických a morfologických změn. Tím se transformují z proliferativního epiteliálního fenotypu na migrační mesenchymální fenotyp. Ztrácejí při tom apikobazální polarizaci, mezibuněčnou adhezi v důsledku modifikace cytoskeletu a přizpůsobují metabolismus migraci za vhodnějším prostředím (Xie *et al.*, 2014). Ztráta vlastností charakteristických pro epiteliální buňky vede k uvolnění buněk z bazální laminy a rozvolnění těsně přiléhající sítě buněk a ztrátě kontaktní inhibice. Tento proces se nazývá tzv. epiteliálně-mesenchymální tranzice (zkr. EMT, z anglického termínu „epithelial to mesenchymal transition“) zvyšující pohyblivost a invazivnost buněk tumoru (Kahlert *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013; Kaufhold a Bonavida, 2014). Popisovaný mechanismus je charakteristický pro

epiteliální tumory a ve srovnání s alternativním procesem u GBM uvedeného níže stojí je prostudován mnohem podrobněji.

2.3.1.2 Gliálně-mezenchymální tranzice

Ačkoliv je EMT často diskutován v souvislosti s gliálními tumory, kvůli odlišné morfologii CNS se u těchto tumorů v mnohém liší. Nervové buňky zaujímají během vývoje CNS mesenchymální fenotyp z toho epiteliálního typického pro ektodermální buňky, z nichž pochází. Navíc v mozkové tkáni není bazální membrána a exprese E-kadherinu je zde vzácná. Proto se v případě glioblastomu hovoří spíše o tranzici gliálně-mezenchymální (Mahabir *et al.*, 2013).

Tento specifický mechanismus je předmětem zájmu relativně nedlouho a v porovnání s EMT literatura nabízí jen omezené poznatky. Pro bližší porozumění toho, co stojí na počátku zrodu cirkulujících nádorových buněk lze však přesto uvést některá významná fakta a korigovat výše popsany mechanismus EMT s ohledem na gliálně-mezenchymální tranzici a plasticitu epiteliálních a mesenchymálních rysů glioblastomových buněk. Potenciálních buněčných původců stojící na samém počátku gliomogeneze je mnoho, ale jako nejpravděpodobnější se jeví nervové kmenové buňky (NKB) spolu s prekurzory oligodendrocytů (Auvergne *et al.*, 2013; Llaguno *et al.*, 2015). Již zmíněné claudiny významné pro formaci tight-junctions mimo jiné v epiteliálních buňkách jsou exprimovány i u lidského glioblastomu (Karnati *et al.*, 2014). Protože některé transkripční faktory (jako Snail) mohou v nádorových buňkách inhibovat jejich expresi během EMT, je pozorování jejich exprese u buněk glioblastomu důležité, neboť represe napomáhá jejich tranzici (Kahlert *et al.*, 2013). Mimo to bylo prokázáno, že gliomové buňky disponují schopností formovat gap junctions. Tato specializovaná intercelulární spojení propojující cytoplazmu sousedních buněk umožňují prostup látek a elektrických impulzů. Jsou známy pro možnost indukovat proliferaci, nekontrolovatelnou migraci a invazi buněk (Hitomi *et al.*, 2015).

2.3.1.2.1 Regulace gliálně-mezenchymální tranzice

2.3.1.2.1.1 Transkripční faktory

Gliálně-mezenchymální tranzice sdílí s mechanismem a regulací EMT mnoho principů, týká se to zejména zapojení transkripčních faktorů rodiny SNAIL. Na glioblastomových buněčných liniích (KSN42, U87 a U373) byl popsán přímý vliv inhibice exprese Snail

na snížení proliferace, životaschopnosti a migraci glioblastomových buněk. Mimo to bylo pozorováno zvýšení počtu buněk v G1 fázi (Myung *et al.*, 2014). Exprese faktoru Slug podporuje mezenchymální fenotyp glioblastomových buněk, je spojován s invazí a metastázami. Kromě toho zvyšuje expresi faktorů jako IL8 a VEGF uplatňující se mj. při růstu nádorů, při čemž exprese Slug koreluje s expresí posledně zmíněného angiogenního faktoru (Yang *et al.*, 2010).

I transkripční faktor ZEB1 je významným protumorálním proteinem u glioblastomu a negativně souvisí s mírou přežití pacientů. Byl zaznamenán vliv ZEB1 na invazi, tumorogenezi a je přednostně exprimován v invazivních glioblastomových buňkách. Buněčné linie s umlčeným genem kódující ZEB1 vykazovaly při inokulaci myšího mozku nižší invazivnost ve srovnání s buňkami exprimující ZEB1. Nižší exprese tohoto faktoru se navíc projevila ve vyšší citlivosti k temozolomidu (Siebzehnrubl *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2018). Obdobné poznatky platí i pro ZEB2, jehož exprese koreluje s rychlou progresí onemocnění. *In vitro* snížení exprese ZEB2 pomocí siRNA zesílilo expresi E-kadherinu, zatímco inhibovalo β -katenin, vimentin, N-kadherin a Snail s tomu odpovídající supresí proliferace, migrace a invaze. Stejně tak snížená exprese ZEB2 indukovala buněčnou smrt u linií U87 a U251 (Qi *et al.*, 2012).

Při *in vivo* testování nadexprese Twist 1 na schopnost invaze buněk došlo ke zvýšení invazivnosti všech pozorovaných glioblastomových buněk. Mimo to byly v návaznosti na nadexpresi Twist 1 nadexprimovány geny podporující tranzici a invazivnost buněk jako SNAI2 nebo MMP2 (Mikheeva *et al.*, 2010). U glioblastomových kmenových buněk byla také zaznamenána koexprese Twist 1 a Sox2 (marker nervových kmenových buněk) doprovázená významným zvýšením exprese mezenchymálních markerů. Umlčení genu kódující Twist 1 snížilo expresi Sox2 a naopak. Tato provázanost naznačuje významnost obou faktorů v zachování kmenovosti buněk, avšak přesný vztah mezi kmenovostí těchto buněk a metastázami není jasný (Velpula *et al.*, 2011).

2.3.1.2.1.2 Významné signální dráhy

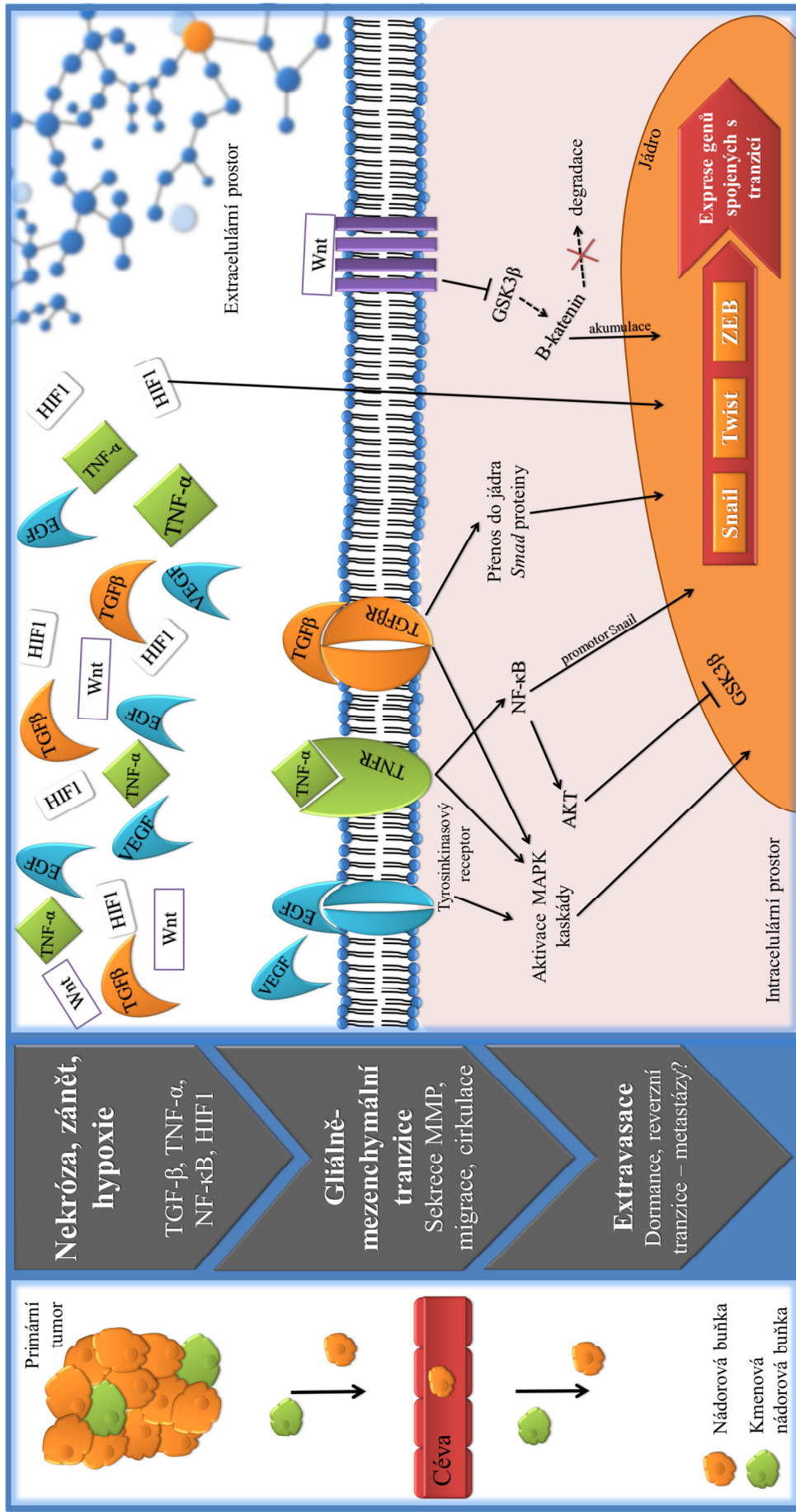
Buňky glioblastomu podle genetických analýz využívají signální dráhy uplatňující se v průběhu fyziologického vývoje nervové soustavy. Na aktivaci buněčné tranzice se podílejí dráhy zprostředkované Wnt/ β -kateninem, TGF β , RTK a SDF/CXCR4 (Chi *et al.*, 2011; Kahlert *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013; Talasila *et al.*, 2013; Joseph *et al.*, 2014).

Aktivace Wnt/ β -kateninové dráhy byla pozorována převážně u buněk v invazivní peritumorální oblasti pacientů s mezenchymálním subtypem glioblastomu. Tato dráha indukovala expresi ZEB1, Twist1 a Slug (Obr. 4), čímž podpořila migrační schopnost buněk tumoru *in vitro* (Kahlert *et al.*, 2013). Byla také popsána schopnost TGF β indukovat ZEB-1-dependentní mezenchymální diferenciaci u vzorků glioblastomu. Inhibice TGF β signalizace spolu s umlčením exprese ZEB-1 utlumila expresi mezenchymálních markerů a morfologických změn. ZEB se tedy jeví jako klíčové transkripční faktory aktivované signalizací TGF β , protože se na rozdíl od Snail, Slug a Twist hromadí v jádře (Joseph *et al.*, 2014). Cytokin CXCL12 a jeho receptor CXCR4 jsou nadexprimovány v mnoha typech karcinomů, což se projevuje nadměrnou proliferací, migrací a invazivností. Různé formy umlčení CXCL12/CXCR4 signalizace vedly ke snížení exprese mezenchymálních markerů a opět k nižší migraci a proliferaci (Zhu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). Tyrosinkinasové receptory cMET (pro růstový faktor hepatocytů) a EGFR aktivují různorodé buněčné dráhy s důsledky v principu obdobnými jako u signalizací výše, tedy zvýšenou proliferací a expresí mezenchymálních faktorů (Chi *et al.*, 2011; Talasila *et al.*, 2013).

2.3.1.2.1.3 Nekróza a hypoxie

TNF- α nadreguluje expresi Snail skrze jaderný faktor NF- κ B, pro který disponuje vazebným místem ve svém promotoru. Snail je dále stabilizován vlivem NF- κ B skrze stimulaci AKT, které inhibuje glykogensynthasovou kinasu-3 β (GSK3 β , EC 2.7.11.26, Obr. 4) (Wang *et al.*, 2013). Úloha Twist 1 jako klíčového regulátora EMT a metastáz je uváděna u nádorů prsu, žaludku, prostaty a mozku včetně glioblastomu (Velpula *et al.*, 2011). Hlavním rysem této regulace je represe E-kadherinu a aktivace mesenchymálního markeru N-kadherinu, tedy vyvolání tzv. kadherin-switch (Mikheeva *et al.*, 2010). V kontextu GBM byla při kombinované inhibici cytokinu TNF- α a EGFR více efektivní ve srovnání s léčbou temozolomidem (a inhibicí samotného EGFR), který je méně efektivní u glioblastomů s nemethylovanou *MGMT*. Kombinovaná inhibice ale byla stejně efektivní jak v případě methylované, tak nemethylované *MGMT* (Guo *et al.*, 2019).

Primární tumor glioblastomu vykazuje v návaznosti na hypoxii zvýšené hodnoty HIF1 mj. v invazivní části tumoru. HIF1 přímo aktivuje Twist vazbou na promotor příslušného genu, tento promotor navíc stabilizuje také indukcí exprese lisyloxydasy. HIF1 také nadreguluje VEGF, který podporuje expresi Snail, Snug a Twist inhibicí



Obr. 4 Schéma shrnující poznatky 3. kapitoly. Aspekty typické pro vzdálení se buňky od primárního tumoru po extravasaci (vytvořeno dle Mehta a Cascio, 2018; Hatoum *et al.*, 2019). NF- κ B, Snail, Twist a ZEB – transkripční faktory, GSK3 β – glykogensynthasová kinasa-3 β , AKT – signální kaskáda indukující přežití a růst, TGF β a TGF β R – růstový faktor a přísl. receptor, TNF- α a TNFR – tumor nekrotizující faktor a přísl. receptor, VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor, HIF1 – hypoxií indukovaný transkripční faktor, EGF – epiteliální růstový faktor, Wnt – signální glykoprotein

GSK3 β . Je také znám pozitivní vliv inhibice HIG1 na léčbu temozolomidem (Yang *et al.*, 2010; Lo Dico *et al.*, 2018).

2.3.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk

S ohledem na odstavce výše lze tedy CTCs charakterizovat jako buňky oddělené z hmoty primárního nádoru. Oddělení indukují nepříznivé podmínky v okolí buňky, kde jsou zvýšené nároky na živiny a kyslík, jejich nedostatek se projevuje hypoxií, zánětem a nekrózami. Tyto buňky transformují svůj fenotyp a migrují za vhodnějším prostředím, typicky za krevním řečištěm, kterého nejenže mohou dosáhnout, ale navíc pravděpodobně exprimují geny umožňující překonání bariér nutných pro vstup do vlastního krevního oběhu s potenciálem založení extrakraniálních metastáz (Cooper *et al.*, 2012; Hillig *et al.*, 2015). Za jejich vznikem pravděpodobně stojí málo početná subpopulace buněk primárního tumoru nazývaná jako kmenové nádorové buňky, navíc je zřejmě třeba podstoupit reverzní buněčnou tranzici na fenotyp umožňující buňkám iniciovat extrakraniální léze (Xie *et al.*, 2014).

Molekulární a genetická charakteristika CTCs je klíčová pro jejich detekci, navíc může tvořit základ pro návrh a monitorování personalizované léčebné strategie (Bidard *et al.*, 2013; Hillig *et al.*, 2015). Vysoká heterogenita charakteristická pro glioblastomy je však limitujícím faktorem pro detekci CTCs. Použití jedné či několika málo protilátek proti vybraným markerům činí detekci citlivou na změny v expresi těchto markerů. Komplexnější směs protilátek proti těmto markerům zvyšuje riziko falešně pozitivních signálů a vysokého pozadí kvůli expresi jednoho či více markerů zdravými buňkami. Nutností je využít markeru pro odlišení zdravých leukocytů (Bang-Christensen *et al.*, 2019).

2.3.2.1 Markery cirkulujících nádorových buněk

Počet výzkumů zabývajících se detekcí CTCs u multiformního glioblastomu je omezený na několik nedávných a různorodost přístupů k experimentům do značné míry ztěžuje jejich komparaci (Chistiakov a Chekhonin, 2018). Navíc i u onkologických pacientů v pokročilé fázi nemoci je výskyt CTCs v periferní krvi relativně nízký, typicky 1 takováto buňka na miliardu fyziologických krevních buněk. Mnoho strategií detekce využívá pozitivní selekce buněk nadexprimující marker epiteliální buněčné adheze EpCAM. Tento marker však nelze uplatnit u buněk glioblastomu, protože jimi není exprimován (Sullivan *et al.*, 2014; MacArthur *et al.*, 2014).

Imunohistochemická detekce využívá pro identifikaci buněk, resp. vizualizaci buněčných jader, zejména všeobecně známé barvivo 6-diamidino-2-fenylyndol (DAPI). Jde o často používané barvivo procházející intaktní buněčnou membránou a použito bylo i řadou níže uvedených studií většinou s protilátkami proti markeru CD45 pro vyloučení falešně pozitivních signálů leukocytů (Müller *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 2014; MacArthur *et al.*, 2014; Chonan *et al.*, 2017).

Z již realizovaných a úspěšných výzkumů zaměřených na detekci buněk glioblastomu v periferní krvi pacientů je často citována práce Müllera *et al.* (2014). CTCs zde byly izolovány s 20,6% úspěšností (u 29 ze 141 GBM pacientů) za využití gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP) jako pozitivního a CD45 jako negativního markeru. Prvně zmíněný protein je jako intermediární filamentum (IF) součástí cytoskeletu a jeho exprese je omezena jen na CNS, ačkoliv jeho koncentrace v krevním séru je předmětem zájmu mnohých studií. Koncentrace GFAP v krevním séru je však stanovována zejména jako marker zvýšený při poranění a degeneraci CNS, jeho koncentrace s věkem stoupá. Společně s vimentinem, desminem a peripherinem jde o hlavní IF typu III v astrocytech (Middeldorp a Hol, 2011; Luoto *et al.*, 2017).

V roce 2014 byla publikována také práce MacArthura *et al.*, ale na podstatně nižším počtu vzorků. Ačkoliv zde byla zvolena poněkud odlišná strategie detekce CTCs a to na základě zvýšené exprese lidské telomerasy v daných buňkách, tento přístup nejenže prokázal zvýšenou expresi u všech nádorových buněk za současného vyloučení všech fyziologických mozkových buněk, ale také byl v souladu s tím imunohistochemickým v rámci stejné práce. Jmenovitě s pozitivním výsledkem na GFAP a Nestin a negativním na EpCAM a celkovou úspěšností v detekci CTCs před radioterapií u 8 z 11 a u 1 z 8 pacientů s GBM po radioterapii.

Sullivan *et al.* (2014) využili pro detekci CTCs magneticky značené protilátky a iChip umožňující odnětí anukleovaných buněk a leukocytů. Pro následnou fluorescenci pak směs protilátek označovanou STEAM cílící na 5 markerů (Tubulin beta-III, EGFR, A2B5, cMET a Sox2). Ze vzorků od celkem 33 pacientů byly CTCs detekovány u 39 % z nich, při čemž množství detekovaných buněk odpovídalo progresi onemocnění. U jednoho ze čtyř pacientů bylo v preoperativně odebraných vzorcích periferní krve detekováno malé množství CTCs. Tubulin beta-III je jedním ze sedmi isotypů B-tubulinu v lidském genomu vyskytující se v přednostně v mladých neuronech

a varlatech, nikoliv však v gliálních buňkách. Exprese tohoto proteinu je narušena v gliálních tumorech včetně GBM. Bylo však zjištěno, že zastoupení buněk pozitivních na tubulin III-beta je v rámci buněk na invazivní straně tumoru jen 10,1 %. Minoritně byly tyto buňky zastoupeny i ve vzdálenějším regionu tumoru, ačkoliv z nezanedbatelných 27,2 % (Chonan *et al.*, 2017). Povrchový marker A2B5 je glykolipid exprimovaný prekurzory již popisovaných oligodendrocytů s charakterem NKB. Protože je i A2B5 u GBM nadexprimován, je nasnadě spojitost s původem nemoci v těchto buňkách. Pro tyto účely bylo A2B5 využito k extrakci gliálních prekurzorových buněk z gliomů vyšších stupňů. Bylo také zjištěno, že A2B5⁺ buňky izolované od těch fyziologických nadregulovaly geny spojené s akvizicí mezenchymálního fenotypu. Nutno dodat, že stejný trend vykazovaly i geny zapojené v motilitě buněk, předpokladem tedy je spojitost daných buněk s progresí malignity a invazí do mozkového parenchymu (Auvergne *et al.*, 2013). Tyrosinkinasový receptor cMET je znám pro jeho nadexprimaci u GBM (Kwak *et al.*, 2015). Transkripční faktor Sox2 zachovává proliferativní potenciál nervových kmenových či prekurzorových buněk a pravděpodobně reguluje expresi genů zahrnutých v malignitě GBM (Berezovsky *et al.*, 2014).

Další protein náležící do rodiny IF typu III, vimentin, zajišťuje buněčnou integritu a ochranu buněk před mechanickým stresem. Je exprimován v širokém spektru buněk jako fibroblasty, endotelové buňky či neuronální prekurzory. Je spojován s progresí malignit CNS jako molekulární marker astrocytomů. Jde také o jeden z markerů EMT a prognostický faktor pro pacienty s GBM neboť byla zaznamenána exprese vimentinu u vyššího počtu pacientů s relapsem onemocnění pod 3 měsíce, než u těch s relapsem po více než 3 měsících (Massagué, 2012; Zhao *et al.*, 2018).

Pro účely detekce CTCs u pacientů s GBM je vhodné zmínit dále nestin, intermediární filamentum typu IV a patrně důležitý marker neuronálních kmenových, resp. progenitorových buněk (i když přesný efekt nestinu na vlastnosti kmenových buněk není zcela prozkoumán). Bylo prokázáno, že nestin může sloužit jako užitečný marker gliomových buněk ve vzorcích periferní krve pacientů. Buňky pozitivní na nestin byly zastoupeny ze 74,5 % na invazivní straně tumoru, ačkoliv srovnatelné bylo zastoupení těchto buněk i dále v tumoru. Pozorována byla také korelace vyšší exprese nestinu u gliomů vyšších stupňů než u gliomů nižších stupňů (Ishiwata *et al.*, 2011; MacArthur *et al.*, 2014; Chonan *et al.*, 2017).

V souvislosti s lidskými NKB je také diskutován povrchový glykoprotein CD133. Bohužel však nelze prozatím jednoznačně spojovat početnost CD133⁺ buněk tumoru s počtem kmenových buněk, protože kromě korelace positivity buněk na CD133 a schopnosti iniciovat vznik tumoru či vyšší aktivity telomerasy jsou známa také protichůdná data. Celková analýza dat z dostupných výzkumů však celkově ukazuje na horší prognózu u pacientů s GBM se zvýšenou expresí CD133 (Zhang *et al.*, 2016). Ten může být mimo to vhodným nástrojem pro bližší specifikaci této jinak heterogenní nemoci u pacientů, protože vzorky mezenchymálního a neurálního subtypu GBM byly v genetické rovině spjaty s tímto markerem ve větší míře, než s klasickým a proneurálním subtypem (Zarkoob *et al.*, 2013).

Jako užitečný povrchový marker se při analýze CTCs ukázal být EGFR popisovaný blíže v kapitole 2.1.2. MacArthur *et al.* (2014) využili imunofluorescenční detekci EGFR u buněk odebraných v rámci resekce tumoru IV. třídy vykazujícího amplifikaci genu a nadexpresi tohoto receptoru pro potvrzení původu izolovaných CTCs v primárním tumoru. Obdobně byla demonstrována amplifikace genu kódujícího EGFR u CTCs ve vzorcích s předem známou amplifikací v primárním tumoru (Sullivan *et al.*, 2014). Müller *et al.* (2014) pozorovali spojitost mezi amplifikací EGFR a uvolněním CTCs do krevního oběhu, což naznačuje uplatnění signalizace skrze tento receptor v extrakraniálním šíření GBM. Toto nejsou jediné práce využívající potenciál EGFR pro diagnostické účely, z pohledu CTCs stojí za zmínku bezesporu také nedávno pozorované klastry těchto buněk s využitím právě EGFR a celkovou úspěšností detekce CTCs u 7 ze 13 pacientů, tedy z 53,8 %. Analýzy genetických aberací klastru CTCs a těch v primárním tumoru naznačují možné překonání mozkových bariér klastrem jako celkem, nicméně tato hypotéza musí být dále otestována na širším základě vzorků (Krol *et al.*, 2018).

2.3.3 Cirkulující nádorové buňky v krevním oběhu

Naplní-li CTCs všechny předpoklady nutné k diseminaci do krevního oběhu, samotná přítomnost v prostředí odlišném od toho v CNS, představuje pro CTCs další zkoušku, jež pro cirkulaci krevním oběhem a případnou iniciací vzdálených metastáz musí překonat. Jde především o hemodynamické síly a rychlost proudu v cévách, CTCs jsou také vystaveny kolizím s krevními elementy a adhezi k leukocytům, trombocytům či mikrofágům s možnou tvorbou různorodých komplexů (Tormoen *et al.*, 2012; Chistiakov a Chekhonin, 2018).

Vztah mezi krevními elementy a CTCs si žádá pozornost většího množství výzkumů, poměrně dlouho je však v povědomí potenciál trombocytů usnadňovat CTCs přítomnost v krevním řečišti jejich párováním skrze glykoprotein IIb-IIIa-fibrinogenové můstky. Glykoprotein IIb-IIIa je receptor pro fibrinogen zajišťující aktivaci trombocytu a popisovanými můstky, resp. obklopením nádorové buňky trombocytu, může sloužit jako ochrana před imunitní odpovědí organismu zprostředkovanou natural killers (NK) lymfocyty. Pro NK je esenciální přímý kontakt s danou buňkou a obklopení nádorové buňky trombocytu je překážka. Trombocytóza je u mnoha rakovinných onemocnění včetně GBM asociována se špatnou prognózou, pacienti také vykazují zvýšené koagulační parametry (Gay a Felding-Habermann, 2011). Podstatné je však to, že byla zaznamenána spojitost mezi buňkami vykazujícími rysy EMT a zvýšenou expresí tkáňových faktorů s důsledkem zvýšené prokoagulační aktivity (vazba na CTC trombocyt aktivuje a ten pak degranuluje) a v kontextu výše tedy i prometastatickým efektem. Exprese těchto tkáňových faktorů navíc významně podléhá regulaci transkripčních faktorů ZEB1 a Snai (Bourcy *et al.*, 2016). Tato zjištění umocňují poznatky uvedené u regulace gliálně-mezenchymální tranzice výše, resp. spojitost mezi ZEB1 a Snail a progresí onemocnění. Obdobný předpoklad lze formulovat v případě TGF- β , protože odvozený z trombocytů byl z velké části zodpovědný za redukcii exprese NKG2D receptorů zajišťujících cytotoxicitu NK lymfocytů. TGF- β je fyziologicky vzato exprimován trombocytu v daleko větší míře ve srovnání s ostatními buňkami a obklopují-li CTCs, mohou být velmi účinnou zbraní při úniku imunitní reakci organismu (Kopp *et al.*, 2009).

2.4 Přehled metod detekce cirkulujících nádorových buněk

V posledních letech je patrné velké úsilí zoptimalizovat co možná nejspecifičtější metody detekce CTCs napříč různými typy rakovinných onemocnění. Tato snaha však bohužel stále do jisté míry čelí buněčně, molekulární a genetické heterogenitě CTCs ztěžující jejich zavedení. I přesto lze však uvést pestrou paletu více či méně uplatnitelných metod a systémů pro detekci CTCs. Nepřímé metody zahrnují detekci specifických genů amplifikací pomocí PCR. Výhodou je vyšší citlivost, ale mohou být spojeny s neuspokojivou specifitou a reprodukovatelností. Přímé metody poskytují morfologické potvrzení přítomnosti CTCs, jejich kvantitativní analýzu a případnou izolaci pro další analýzu (Tanaka *et al.*, 2010).

Významná část přímých metod je založena na imunoafinitě, resp. použití specifických protilátek proti markerům exprimovaných buňkou. V rámci pozitivní selekce dochází k zachycení buněk díky těmto markerům, zatímco negativní selekce vylučuje hematopoetické buňky na pozadí použitím protilátek proti CD45 (tyrosinofosfatase regulující antigen-receptorové signalizace T- a B-buněk). Tento princip využívají systémy různorodého uspořádání, předně je vhodně zmínit platformu CellSearch[®], která je jako jediná schválená pro diagnostické účely americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Ahn *et al.*, 2020). CellSearch[®] však využívá pro imunomagnetickou detekci epiteliální marker EpCAM (konjugovaný k magnetické částici), což jej pro účely detekce mezenchymálních CTCs (včetně GBM) vylučuje (viz kapitola 2.3.2.1). Detekci je vhodné potvrdit FISH analýzou pro odhalení specifických genových rysů nádorových buněk. Dále jsou využívány technologie na bázi průtokové cytometrie či ve formě mikročipů různých uspořádání (Alix-Panabières a Pantel, 2014; Ahn *et al.*, 2020).

Jiné přístupy jsou založeny na možnosti odlišit buňku od ostatních na základě biofyzikálních vlastností buňky jako velikost, hustota, mechanická plasticita či elektrický náboj. Mikrofiltrace využívá většího, rigidnějšího fenotypu buněk a výhodou je schopnost rychle zpracovat krevní vzorek. Mikrofiltrační systémy však trpí ucpáváním a rizikem pro dosažení vysoké čistoty je překryv velikostí mezi CTCs a leukocyty. Centrifugace v hustotním gradientu zase těží ze své zejména finanční nenáročnosti, ale nachází uplatnění spíše v pre-selekci pro jiné metody. Inerciální fokusace pasivně separuje CTCs na základě velikosti za použití setrvačných účinků v mikrofluidních zařízeních (Ferreira *et al.*, 2016; Ahn *et al.*, 2020). Původní představy o tom, že CTCs jsou větší a méně deformovatelné ve srovnání s hematopoetickými buňkami však již díky novým poznatkům už příliš neplatí. Přístupy využívající filtraci či centrifugační síly tedy již vyžadují použití jiných více sofistikovaných metod pro enumeraci nejlépe s molekulární charakterizací pro určení přesného původu buněk. Mezi další biofyzikálně založené metody patří dielektroforéza izolující CTCs na základě odlišného elektrického fenotypu (Alix-Panabières a Pantel, 2014).

Kategorizace zbylých metod se do značné míry liší, většinou se jedná o velmi specifická uspořádání vybočující z výše uvedených kategorií s cílem přímého zobrazení CTCs. Příkladem může být fotoakustická průtoková cytometrie detekující CTCs v reálném čase v žilách pomocí laseru. Jde ale také o funkční testy využívající buněčnou

aktivitu kultivovaných CTCs a s ní spojenou sekreci a značení specifických proteinů či štěpení fluorescenčně značené adhezní matrix (Alix-Panabières a Pantel, 2014; Ahn *et al.*, 2020). Přímou detekci využívá i systém Cytotrack CT11TM (CytoTrack ApS, Lyngby, Dánsko) kombinující značení CTCs specifickými protilátkami a fluorescenční analýzu bez nutnosti předchozí selekce buněk ve vzorku díky vysoké skenovací kapacitě. Ferreira *et al.* (2016) jej staví vedle platformy FASTTM využívající skenování pomocí optických vláken a fotonásobičů s krátkým expozičním časem a větší plochou vyšetřovaného pole. Ačkoliv disponuje vysokou rychlostí skenování (25 milionů buněk/minutu), nevýhodou je snížené rozlišení obrazu s potřebou dalšího ověření potenciálních CTCs jinými zobrazovacími metodami o vysokém rozlišení. Cytotrack skenuje zpracovaný vzorek aplikovaný po speciálním skleněném disku (CytoDiscTM) rychlostí 100 milionů buněk za minutu (Obr. 5). V rámci skenování vyselektuje potenciální pozitivní signály, které je možné dále vyhodnocovat pomocí různých optických filtrů, případně izolovat speciálním pipetovacím systémem (CytoPickerTM). Ze srovnání se systémem CellSearch[®], tedy jedinou dosud schválenou metodou, vyšel CytoTrack srovnatelně. Studie provedené na buněčné linii karcinomu prsu prokázaly účinnost zachycení pro CytoTrack 69 % a pro CellSearch[®] 71 % (Hillig *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2016; Gogenur *et al.*, 2017).

2.4.1 Vybrané markery cirkulujících nádorových buněk u pacientů s multiforním glioblastomem

2.4.1.1 Gliální fibrilární acidický protein

GFAP tvoří IF III. typu, strukturně je podobný dalším neepiteliálním proteinům jako vimentinu, desminu či peripherinu. Filamentum je utvářeno paralelním vinutím dvou monomeů okolo sebe za tvorby dimeru a antiparalelním uspořádáním dimerů do tetramerů a dále do oktamerů (Alberts *et al.*, 2015; van Bodegraven *et al.*, 2019). Jako součást cytoskeletu gliálních buněk participuje na plnění funkcí této buněčné součásti. Kromě těch elementárních jako mechanická odolnost či signalizace jsou diskutovány další specifitější funkce odvíjející se od jednotlivých isoform GFAP. Aktuálně jich je známo 10 a pozorování rozdílné míry jejich exprese dalo vzniku několika subpopulacím astrocytů. Příčinou vzniku isoform je alternativní splicing mRNA, tento jinak konzervovaný protein se liší podobou domény tvořící vlákno na C-konci. Protože jsou důležité pro seskupení filament a vazbu interagujících proteinů, jejich různorodost se

může odrážet v rozdílné struktuře IF a tím i morfologii a funkci astrocytů (Middeldorp a Hol, 2011).

V lidském mozku je obecně zastoupena nejvíce GFAP- α isoforma, vzhledem k níž je



Obr. 5 Celkový pohled na platformu pro přímou detekci cirkulujících nádorových buněk Cytotrack CT11TM (výše) a detail skenovacího zařízení s vloženým diskem CytoDiscTM (níže). Zdroj: <https://www.cytotrack.com/index.php/technology>

relativně vztahována míra exprese GFAP- δ (isoforma znesnadňující tvorbu filament a v rámci zvýšeného poměru GFAP- δ/α související se zvýšenou proliferací a tím vyšší malignitou). Zvýšená exprese jinak málo zastoupeného a na proliferativní buněčné oblasti mozku omezeného GFAP- δ byla zaznamenána u astrocytomů nižších stupňů i glioblastomu s pozitivní korelací ke zvyšující se pozitivitě této isoformy. GFAP- δ se tím zdá být cenným markerem v detekci a hodnocení malignity astrocytomů včetně glioblastomu (Choi *et al.*, 2009; Heo *et al.*, 2012; Brehar *et al.*, 2014; Stassen *et al.*, 2017). Zejména Brehar *et al.* (2014) na širší základně vzorků vztáhli GFAP- δ pozitivitu buněk k invazivnosti za pomoci sledování koexpresi nestinu. Důvodem byl v odborné literatuře diskutovaný fakt, že GFAP- δ^+ buňky vykazují koexpresi markerů neurálních kmenových buněk v čele s nestinem. To je klíčové z pohledu výše popisovaného předpokladu, že onkogeneze gliomů může mít původ právě v populaci s rysy kmenových buněk navíc v tomto případě původem v proliferativních zónách mozku obsahující neurální progenitorové buňky. Nutno dodat, že zmíněný výzkum zaznamenal u nestinu souhlasné trendy jako u GFAP- δ .

GFAP je exprimován u zdravého mozku přednostně v dospělých astrocytech (Middeldorp a Hol, 2011). Vyšší exprese GFAP bývá tedy spojována s více diferencovanými a méně maligními tumory, tento přístup však patrně neplatí v širším měřítku. Důvodem je pozorování exprese také v nevyspělých a nediferencovaných buňkách CNS spolu s astrocyty reagujícími na růst tumoru. Zvýšený výskyt GFAP tedy vzhledem k těmto a ve výše uvedených odstavcích uvedeným faktům podporuje GFAP jako marker spíše více maligních astrocytomů, což v nedávné review shrnují van Bodegraven *et al.* (2019).

2.4.1.2 Vimentin

Vimentin tvoří IF III. typu a je taktéž jedním z hlavních proteinů IF v astrocytech. Vimentin sdílí s GFAP strukturální rysy zmíněné výše a patrně je na něm z funkčního hlediska do určité míry závislý (Middeldorp a Hol, 2011). Byla také zaznamenána koexprese vimentinu a GFAP- δ (van Den Berge *et al.*, 2010).

Vimentin je znám jako marker rakovinných metastáz a jako nedílná součást EMT. Bylo pozorováno, že exprese vimentinových IF koreluje s mezenchymálním rysem buněk a jejich motilitou. Navíc mikroinjekce vimentinu či transfekce příslušné cDNA mělo za následek rychlý přechod epiteliálních buněk k mezenchymálnímu fenotypu (Mendez *et al.*, 2010). Organizace vimentinových vláken je provázána s aktinem

a mikrotubuly skrze různorodé interakce. Jde především o omezení motility vimentinových fragmentů napojením na aktinová vlákna či jejich transport podél mikrotubulů v rámci jejich oddělování či opětovného spojování. Vzniklá síť vimentinových IF je velmi dynamická a jako významná část cytoskeletu ovlivňuje procesy vyžadující změnu tvaru buňky včetně její migrace (Hookway *et al.*, 2015). Proč je exprese vimentinu doprovodným jevem EMT, není přesně známo. Patrně však skrze participaci na strukturní integritě buněk. Costigliola *et al.* (2017) toto specifikují tak, že organizace vimentinových IF řídí vyrovnávání trakčních napětí potřebných pro migraci buňky. Byla totiž pozorována koorientace vimentinových vláken s větvením fibroblastů i směrem pohybu buněk. Navíc orientace vimentinu a mikrotubulů se vzájemně posilovaly ve smyslu celkové polarizace buňky během migrace. Nabízí se tedy úvaha, že vimentin díky výše uvedené provázanosti s aktinem a mikrotubuly integruje polarizační účinek mikrotubulů s aktinomyosinovými silami řídící mezenchymální migraci (Gan *et al.*, 2016; Costigliola *et al.*, 2017).

Jako klíčová se zdají být zjištění spojující již diskutované poznatky o Slug faktorech u glioblastomu s vimentinem. Ten je součástí reciproční regulační interakce s MAPK/ERK kaskádou usnadňující fosforylaci Slug ve specifickém místě umožňující Slug indukovat mimo jiné expresi vimentinu. Ten totiž u tumoru prsu podporuje aktivitu ERK, protože slouží jako scaffold spojující Slug a ERK v cytoplazmě (Virtakoivu *et al.*, 2015).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

6-diamidino-2-fenyindol (Carl Roth GmbH, Německo)

Anti-CD45 myší monoklonální protilátky (HI30), konjugované s allofykocyaninem, eBioscience™ (Invitrogen™, USA)

Anti-GFAP (GA5) myší monoklonální protilátky, konjugované s Alexa Fluor® 488 (Cell Signaling Technology, USA)

Anti-vimentin králičí polyklonální protilátky, konjugované s cyaninem 3 (Bioss Inc, USA)

Diethylpyrokarbonát (DEPC) voda (Invitrogen™, USA)

DMEM médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, USA)

DNA eluční pufr (Roche, Švýcarsko)

Ethanol 80% (Sigma-Aldrich, USA)

Filtrační pufr I (Roche, Švýcarsko)

Filtrační pufr II (Roche, Švýcarsko)

FixoGum® (Marabu, Německo)

Fosfátem pufovaný solný roztok (PBS, z anglického termínu „Phosphate buffered saline,“ katalogové číslo 444057Y, VWR Chemicals, USA)

Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA, z anglického termínu „Bovine Serum Albumin“. Katalogové číslo 44155Y, VWR Chemicals, USA)

Isopropanol (Sigma-Aldrich, USA)

Kultivační lahve (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko)

Lyzační roztok BD FACST™ Lysing Solution 10x Concentrate (BD Biosciences, USA)

May-Grünwaldův roztok (Carl Roth GmbH, Německo)

Mounting Medium (DuoLink®, Velká Británie)

Pufr pro DNA v parafinových blocích (Roche, Švýcarsko)

Roztok Giemsa-Romanovski (Penta, Česká republika)

TrypLE™ Select CTS™ (Gibco, Life Technologies, USA)

Přístrojové vybavení:

Buněčný analyzátor Vi-cell (BeckmanCoulter, USA)

Centrifuga Z323K (Hermle, Německo)

CytoTrack CT11™ (CytoTrack Aps, Dánsko)

Invertovaný skenovací konfokální fluorescenční mikroskop Olympus IX83 (Olympus, Japonsko)

Kamera AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss AG, Německo)

Kamera Zyla sCMOS (Andor Technology Ltd., Severní Irsko)

Konfokální mikroskop ZEISS LSM780, Elyra PS.1 + 355nm laser (Carl Zeiss AG, Německo)

Laminární box Aura 2000 M.A.C. (BioAir, Itálie)

Světelný mikroskop ZEISS Lab.A1 (Carl Zeiss AG, Německo)

Třepačka (Biosan, Litva)

UV/VIS spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., USA)

Příslušenství a pomůcky:

CytoCover™ (CytoTrack Aps, Dánsko)

CytoDics™ (CytoTrack Aps, Dánsko)

Odběrové zkumavky Cell-Free DNA BCT® 10 ml (Streck, Inc., USA)

Odběrové zkumavky CellSave 10 ml (Menarini-Silicon Biosystems, Inc., Itálie)

Odběrové zkumavky VACUETTE® TUBE 10 ml K₂EDTA (Greiner Bio-One, Rakousko)

Pipety (Eppendorf, Německo)

Software:

CytoTrack Software (CytoTrack Aps, Dánsko)

NanoDrop software (Thermo Fisher Scientific, USA)

Olympus CellSens (Olympus, Japonsko)

ZEISS ZEN (Carl Zeiss AG, Německo)

3.2 Materiál a metody

3.2.1 Biologický materiál

Pro účely selekce odběrových zkumavek k odběru krevních vzorků bylo odebráno 9 vzorků periferní krve od každého z 5 zdravých donorů – zaměstnanců Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM). S jejich souhlasem tak byly získány vždy 3 sady 3 vzorků odebraných do zkumavek Streck, CellSave a do běžných odběrových zkumavek s obsahem solí kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, dále jen zkumavky EDTA) bez dalších stabilizačních směsí.

Do validačních experimentů byla použita buněčná linie U-87 MG poskytnutá Laboratoří buněčné biologie ÚMTM a periferní krev zdravého donora – předkladatele diplomové práce. Do experimentů byla dále po podepsání informovaného souhlasu s účastí ve studii zařazena periferní krev sedmi pacientů Neurochirurgické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc s multifonním glioblastomem. Krev byla odebrána preoperativně do předem vybraných odběrových zkumavek (viz dále).

3.2.2 Výběr vhodných zkumavek pro odběr krevních vzorků

V tomto experimentu byl testován vliv vybraných zkumavek na stabilitu krevního vzorku, resp. krevních elementů, DNA a případných CTCs. Protože není vždy možné odebírat biologický materiál v místě zpracování, na stabilitu odebraného vzorku jsou v souvislosti se skladováním a transportem z jiných klinik kladeny vyšší nároky. Níže jsou uvedeny zkumavky použité v tomto experimentu a jejich stručná charakteristika, z níž vyplývá zaměření na stabilitu DNA.

První zkumavkou v experimentu byla běžná komerční zkumavka s di-, resp. tri-draselnou solí EDTA (K_2EDTA , K_3EDTA). Tato zkumavka je v obecné rovině známa pro své antikoagulační účinky díky chelataci mj. Ca^{2+} iontů. Ty hrají významnou roli ve vnější i vnitřní hemokoagulační kaskádě, v první zmíněné kaskádě jsou mj. Ca^{2+} ionty třeba k aktivaci faktoru X podílejícího se dále na aktivaci protrombinu. V druhé zmíněné kaskádě, která nastává při kontaktu krve se smáčivým povrchem (např. sklem), jsou Ca^{2+} ionty třeba k aktivaci faktoru IX, což dále vede opět k aktivaci protrombinu a ve výsledku ke srážení krve (Koolman a Roehm, 2005). Schopnost kyseliny ethylendiamintetraoctové chelatovat dvojmocné kationty, které jsou jako kofaktory nutné pro funkčnost řady degradačních enzymů, je důležitá také v blokaci degradace DNA či RNA (Banfi *et al.*, 2007).

Zkumavky Cell-Free DNA BCT[®] od firmy Streck s obsahem blíže nespécifikované konzervační směsi (jejíž součástí je K_3EDTA) dle výrobce stabilizuje jaderné buňky, což brání uvolnění genomové DNA a zaručuje spolu s cfDNA (cell-free neboli volná DNA) její stabilitu po dobu až 14 dní při teplotě 6 – 37 °C. Cirkulující nádorové buňky jsou stabilní až 7 dní v teplotním rozmezí 15 – 30 °C a je minimalizována jejich degradace. Tyto zkumavky jsou tedy navrženy pro snížení potřeby okamžitého zpracování vzorku a umožnění izolace vysoce kvalitní volné DNA za současné možnosti transportu a dočasného skladování vzorku (Fernando *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2013).

Zkumavky CellSave systému CellSearch[®] firmy Menarini-Silicon Biosystems, Inc. stabilizují cirkulující nádorové buňky až na 96 hodin při pokojové teplotě a zlepšují reprodukovatelnost a spolehlivost analýzy zmíněných buněk (Riethdorf *et al.*, 2007). Existuje také předpoklad pozitivního vlivu stabilizujících látek na ctDNA (cirkulující tumorová DNA), ovšem pro potvrzení této hypotézy je prozatím získáno malé množství dat (Kang *et al.*, 2016).

3.2.2.1 Krevní nátěr

Prvním krokem stabilitního experimentu bylo provedení krevního nátěru na podložní sklo. Již vyschlé krevní nátěry byly dodány k dalšímu zpracování - fixaci a barvení. Sklíčka s krevním vzorkem byla srovnána do vodorovné polohy a zakapána koncentrovaným May-Grünwaldovým roztokem na dobu 30 vteřin. Po uplynutí této doby následovalo zakapání vzorku destilovanou vodou na dobu 2,5 minuty. Následovalo slití barviva a krátký oplach destilovanou vodou. Podložní sklíčko se vzorkem bylo poté vloženo na 20 minut do kyvety s roztokem Giemsa-Romanovski (10 ml roztoku Giemsa-Romanowski na 90 ml destilované vody) a po uplynutí dané doby bylo vytaženo z kyvety se současným slitím barviva. Takto zpracovaný vzorek byl ponechán při laboratorní teplotě k uschnutí.

3.2.2.2 Izolace krevní plazmy a DNA

Zbývající objem krevního vzorku byl přelit do 15 ml falkony se šroubovacím víčkem a centrifugován v předem vychlazené centrifuze při 4 °C a 2000 x g po dobu 10 minut bez použití brzdy (hodnota 1). Po uplynutí doby centrifugace byl do mikrozkušavky odebrán plazmatický supernatant a přenesen do nové 5ml zkumavky k další centrifugaci – 10 minut při 15000 x g při 4 °C a bez brzdy. Plazma byla po další centrifugaci odebrána s ohledem na nenarušení pelety na dně zkumavky a zamražena při -20 °C.

Následovala izolace DNA pomocí soupravy pro manuální izolaci cirkulující DNA (ctDNA a cfDNA) cobas[®] cfDNA Sample Preparation Kit. Krevní plazma byla na ledu nejdříve pozvolna rozmražena a promíchána na vortexu. 2 ml každého vzorku a negativní kontroly (sterilní H₂O) bylo přeneseno do vlastní 15ml zkumavky, přidáno 250 µl proteinasy K (E.C.: 3.4.21.64), 2 ml vazebného pufru pro DNA v parafinových blocích a inkubováno 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace byly vzorky promíchány 3 až 5násobným otočením zkumavek. Dále následoval přídatek 500 µl isopropanolu a promíchání otočením zkumavek (asi 5x). Lyzát byl přenesen do jednotky s nástavcem High Pure (HPEA FT jednotka) a 5 minut centrifugován při

4000 x g. Jednotka byla poté vyjmuta z kónické odběrové zkumavky a vložena do odběrové zkumavky CT. Po zakroucení větší uzavírací svorkou byla vyjmuta ze sestavy, odstraněna menší uzavírací svorka zpod víčka filtrační zkumavky (FT) zatlačením směrem vzhůru do zlomu těsnění. Použitá kapalina z HPEA FT byla zlikvidována do chemického odpadu a do každé FT přidáno 500 µl filtračního pufru I. Na stolní centrifuze byly jednotky FT/CT 1 minutu centrifugovány při 8000 x g, každá FT pak byla vložena do nové CT a použitá kapalina opět zlikvidována stejně jako staré CT. Po přidavku 500 µl filtračního pufru II následoval stejný centrifugační krok a likvidace kapaliny i CT. Jednotky FT/CT byly dále centrifugovány při 16 000 g 1 minutu pro vyschnutí membrány filtru. FT byla vložena do eluční zkumavky a kapalina z CT i staré CT opět zlikvidovány. Do středu membrány bylo bez dotyku s ní přidáno 100 µl DNA elučního pufru a inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě. DNA eluát byl získán centrifugací FT s eluční zkumavkou při 8000 x g po dobu 1 minuty.

DNA z krve byla získána za využití MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit s automatickou izolací přístrojem MagCore HF16. Metoda využívá přednaplněnou kazetu s proteinasou K (E.C.: 3.4.21.64) a hydrochlorid guanidinem k lýzi buněk a degradaci proteinů. 400 µl promíchané plné krve bylo napipetováno do MagCore tuby (se sterilní H₂O jako negativní kontrola), zkumavka umístěna do správné pozice v držáku T-rack, stejně jako eluční tuba a TipPlusHolder dle manuálu.

3.2.2.3 Stanovení koncentrace DNA

Před zamražením daného vzorku DNA byla změřena její koncentrace pomocí UV-VIS spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Nejprve byl vzorek promíchán na vortexu, spektrofotometr vyblankován 1,5 µl sterilní H₂O a po jejím odstranění a očištění čočky buničinou napipetován stejný objem vzorku. Po změření koncentrace vzorku se stejný postup odpipetování vzorku i čištění čočky vždy opakoval. Spolu s koncentrací DNA byla zaznamenána také čistota vzorku vyházející z poměru absorbance při 260 a 280 nm.

3.2.3 Validace značení nádorových buněk na buněčné linii U-87 MG

Buněčná linie U-87 MG a s ní související materiál a chemikálie byly poskytnuty Laboratoří buněčné biologie ÚMTM. Pomocí světelného mikroskopu byla nejprve zhodnocena konfluencia buněk kultivovaných v kultivační lahvi, aby se vyloučila transformace linie, kdy v případném zaplnění povrchu nádoby jsou buňky kontaktně inhibovány a selektují se ty, které ztrácejí tuto kontrolu růstu. Prvním krokem pro

použití buněčné kultury bylo odlití DMEM média z kultivační lahve do odpadu. Následovalo promytí kultury 10 ml 1x PBS pufrem pomocí sterilní dělené pipety sautomatickým pipetovacím nástavcem a odlití pufru do odpadu. Dále bylo provedeno oddělení buněk od povrchu lahve přidavkem 1 ml přípravku TrypLE a ponecháním kultivační lahve na několik minut v inkubátoru (při 37 °C, atmosféře s 5 % CO₂, saturovanou humiditou). Po vyjmutí z inkubátoru a vizuální kontrole pomocí mikroskopu byla lahev jemným poklepáním zbavena zbytku ulpělých buněk a ty resuspendovány v přidavku 1 ml média. 1 ml buněčné suspenze bylo přepipetováno do mikroskopavky a dále analyzována pomocí přístroje Vi-Cell z hlediska počtu a variability buněk. Získána data byla zaznamenána a suspenze dále naředěna na požadovanou koncentraci buněk pomocí PBS. Do takto získané suspenze se přidala předem připravená barvicí směs v objemu 60 µl. Směs obsahovala 7 µl anti-GFAP myší monoklonální protilátky (klon GA5), konjugované s fluoroforem Alexa Fluor[®] 488. Ten má absorpční maximum při 493 nm a emisní maximum při 519 nm, tedy v zelené části spektra. Dále šlo o králičí polyklonální anti-vimentin protilátky konjugované s cyaninem 3 (3 µl). Toto cyaninové barvivo je excitováno při 532 nm a emituje v rozmezí 554–568 nm (ve žlutooranžové části spektra). Bylo také použito 5 µl protilátky anti-CD45 myší monoklonální protilátky (klon HI30) konjugované s allofykocyaninem s excitačním rozmezím 633-647 nm a emisí záření při 660 nm (v červené části spektra). V neposlední řadě byl součástí směsi 6-diamidino-2-fenylindol v objemu 3 µl pro vizualizaci buněčných jader, v nichž se váže na AT bohaté oblasti v DNA. Toto barvivo má excitační maximum při 358 nm a emisní při 461 nm (modrá část spektra).

Dalším krokem byla fixace získaných buněk na podložní sklo – suspenze byla nanášena v objemu asi 0,5 ml a za použití špičky pipety rozprostřena do rovnoměrně tenké vrstvy. Po vyschnutí podložní sklo bylo vloženo přesně na 10 minut do roztoku kyseliny octové s methanolem (1:3). Po této inkubaci bylo podložní sklo ponecháno na asi 30 minut k vysušení ve flowboxu a vyhodnoceno pomocí konfokálního mikroskopu ZEISS LSM780 a software ZEISS ZEN. Totožný postup přípravy buněčné suspenze byl proveden i v případě validačního experimentu s krevním vzorkem analyzovaným přístrojem CytoTrack s tím rozdílem, že suspenze byla přidána do odebrané krve přímo před jejím zpracováním.

3.2.4 Detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™

3.2.4.1 Zpracování krevního vzorku

Prvním krokem pro zpracování vzorku je izolovat tzv. buffy coat, tenkou vrstvu vzorku přímo nad erythrocyty s potenciálem obsahu buněk zájmu, trombocytů a leukocytů. V rámci tohoto kroku se vzorek centrifugoval 15 minut při 2500 x g, s následným odstraněním většiny plazmy vyjma zhruba 0,5 ml nad buffy coatem. Samotný buffy coat byl krouživým pohybem špičky pipety izolován a převeden do 15ml plastové zkumavky - falkony (1-2 ml). Druhým krokem je lýze erythrocytů – k izolovanému buffy coatu byl přidán FACS Lysing Solution do celkového objemu 10 ml, získaný roztok inkubován při pokojové teplotě a na kývačce 15 minut a centrifugován 15 minut při 2500 x g. Po odlití supernatantu do odpadu následoval krok barvení CTCs. Barvicí směs obsahovala stejnou kombinaci i objemy protilátek jako v bodě 3.2.3 opět spolu s DAPI (8 µl anti-GFAP, 3 µl anti-vimentin, 5 µl anti-CD45 a 3 µl DAPI). Směs byla krátce zcentrifugována na minicentrifuze a naředěna v PBS a BSA do objemu 60 µl přidána k peletě vzorku, resp. peleta pomocí tohoto objemu rozsuspendována řádným propipetováním.

Vzorek se dále umístil k inkubaci do tmy na 60 minut. Ve čtvrtém kroku bylo provedeno nejprve promytí přidavkem asi 10 ml vychlazeného 1% BSA v PBS řádným promícháním a 5 minutovou inkubací ve tmě. Po centrifugaci 15 minut při 2500 x g a odlití supernatantu do odpadu se krok opakoval s 0,5% BSA v PBS tentokrát bez inkubace. K získané peletě byl přidán 1 ml dH₂O a řádně promícháno s možností uchování v chladu a tmě až 24 hodin.

3.2.4.2 Aplikace vzorku na CytoDisc™

Suspenze získaná v předchozím postupu byla nanesena na střed CytoDisc™ a pomocí špičky na pipetě krouživými pohyby rovnoměrně rozetřena do co možná nejvíce souvislé vrstvy se zachováním asi 0,5cm prázdného okraje od hrany. Disk byl ponechán ve tmě v laminárním boxu k vysušení minimálně 2 hodiny, zpravidla však do druhého dne. Na vysušený disk se dále přidalo 400 µl Mounting Media do středu tak, aby následné překrytí disku krycím sklem CytoCover po jemném stlačení rovnoměrně rozprostřel medium po celé ploše vzorku na disku. Případné vzduchové bubliny byly vytlačeny a krycí sklo zafixováno po okrajích za použití elastického lepidla FixoGum® tak, aby obsáhlo okraj krycího skla i CytoDisk. Nanesené lepidlo se sušilo při pokojové teplotě minimálně 45 minut (lze ponechat přes noc).

3.2.4.3 Skenování vzorku

CytoDisc se před skenováním očistil pomocí 80% ethanolu a vyleštil ubrousky na optiku. Dále byl umístěn a zajištěn do skenovacího prostoru v CytoTrack přístroji. Samotné skenování probíhalo nejprve v příslušném software zaostřením výchozích bodů na filtru pro DAPI, resp. na zobrazených buněčných jádrech za využití objektivu 20x/0.75. Pro spuštění skenování přístroj naopak využívá objektiv 20x/0.40, ale pro následné vyhodnocování preselektovaných signálů (tzv. hotspotů) využívá opět předchozí objektiv. Před spuštěním skenování je také možné nastavit některé parametry jako výstupní výkon laseru, rychlost skenování či upřesnit intervaly některých numerických filtrů pro selekci vybraných fluorescenčních signálů. Hotspoty byly vyhodnocovány za použití příslušných filtrů optického systému, jejichž libovolná volitelnost umožňuje bez nutnosti opakovaného zaostření a přiblížení buněk vyhodnocovat pozitivitu buněk na příslušné markery. Software také umožňuje pracovní klasifikaci hotspotů podle míry, do jaké vykazují znaky CTCs, k případnému pozdějšímu hodnocení.

4 Výsledky

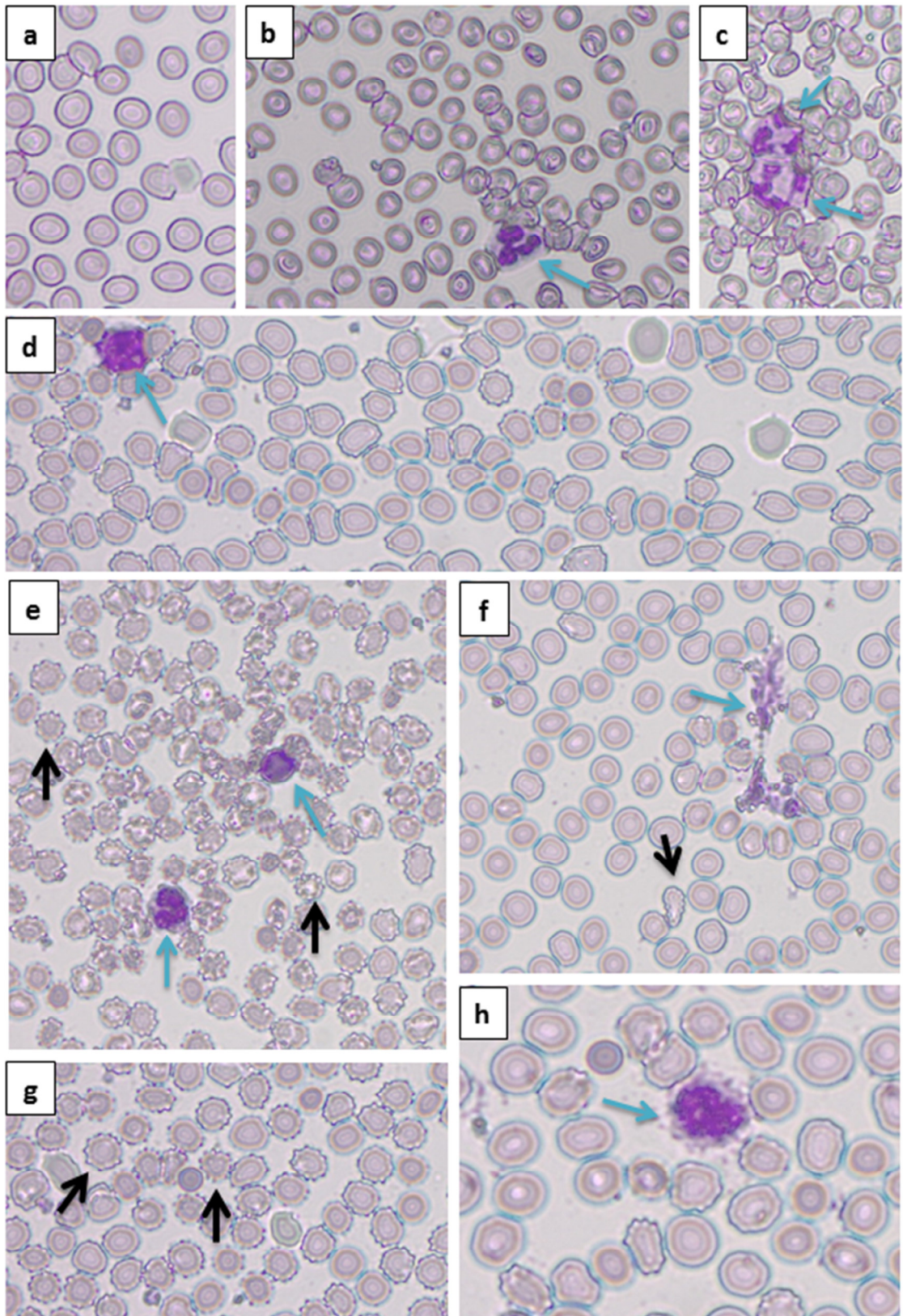
4.1 Výběr vhodných zkumavek pro odběr krevních vzorků

4.1.1 Krevní nátěry

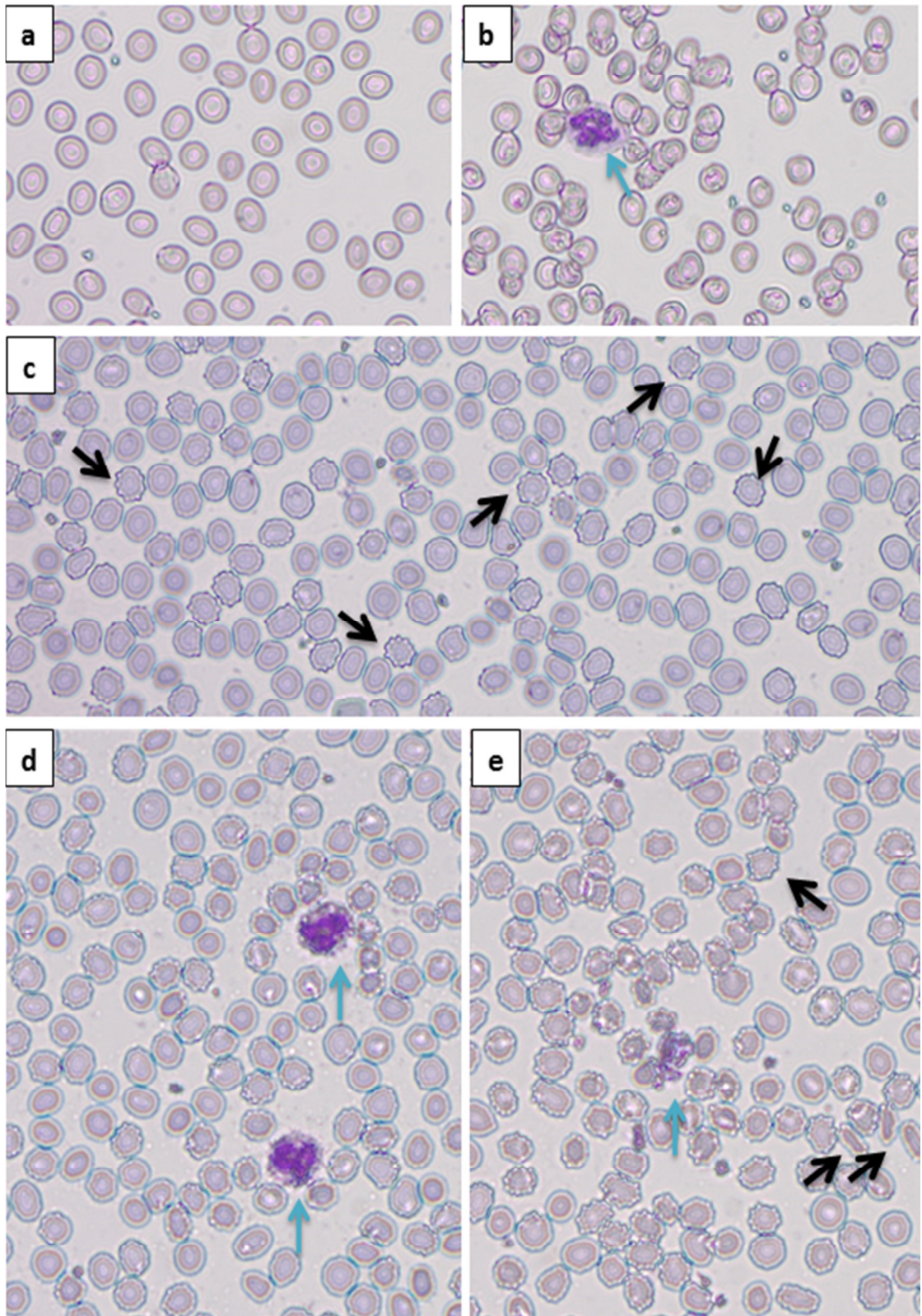
Krevní nátěry byly vyhodnoceny pomocí světelného mikroskopu ZEISS Lab.A1 (při zvětšení 40x) a kamery AxioCam ERc 5s. Výstupem jsou snímky pozorované a uložené prostřednictvím software ZEN 2012 (blue edition).

Na Obr. 6a–5c jsou krevní nátěry vzorků odebraných do zkumavek CellSave a zpracovaných v den odběru, na nichž lze pozorovat erythrocyty (zejména Obr. 6a) a neutrofile vykazující fyziologické rysy. Prvně jmenované krevní elementy jsou nepravidelně a relativně bezkontaktně rozmístěny, stejně jako neutrofile jsou ohraničené, normativní velikosti, pravidelné a bez známek deformací. Celkově v těchto krevních nátěrech nebyly pozorovány zásadnější patologické jevy, což potvrzuje absenci zdravotních problémů u dárců periferní krve. Zbývající obrázky zachycují vzorky odebrané do totožných zkumavek, ale zpracovaných třetí den po odběru. Ve srovnání zejména s těmi zpracovanými v den odběru a druhý den po odběru (neuveďeno) došlo k několika jednoznačným projevům pozdního zpracování stupňujících se s narůstající délkou skladování. V první řadě byla na všech vzorcích patrná změna struktury membrány erythrocytů (Obr. 6e a 6g). Ta je zvráštěná, nepravidelného tvaru a připomínající často echinocyt. Integrita erythrocytů je však zachována do té míry, že není významněji pozorovatelná jejich lýze a nutno dodat, že kromě pozměněných erythrocytů lze stále pozorovat i normocyty. Zajímavé je dále pozorování zvýšené vzájemné adherity erythrocytů (přímky na Obr. 6d a 6f). Ve dříve zpracovaných vzorcích erythrocyty byly celkově více rozprostřeny s menší mírou vzájemných kontaktů (Obr. 6a-6c). Kromě trombocytů lze v krevních nátěrech ze třetího dne spatřit také lymfocyt či neutrofil, které ač nevykazují známky lýze, místy také vykazují drobné abnormality zejména co do plasticity membrány (Obr. 6h), případně tvaru. Velmi vzácně byl pozorován rozpad jaderných buněk (Obr. 6f).

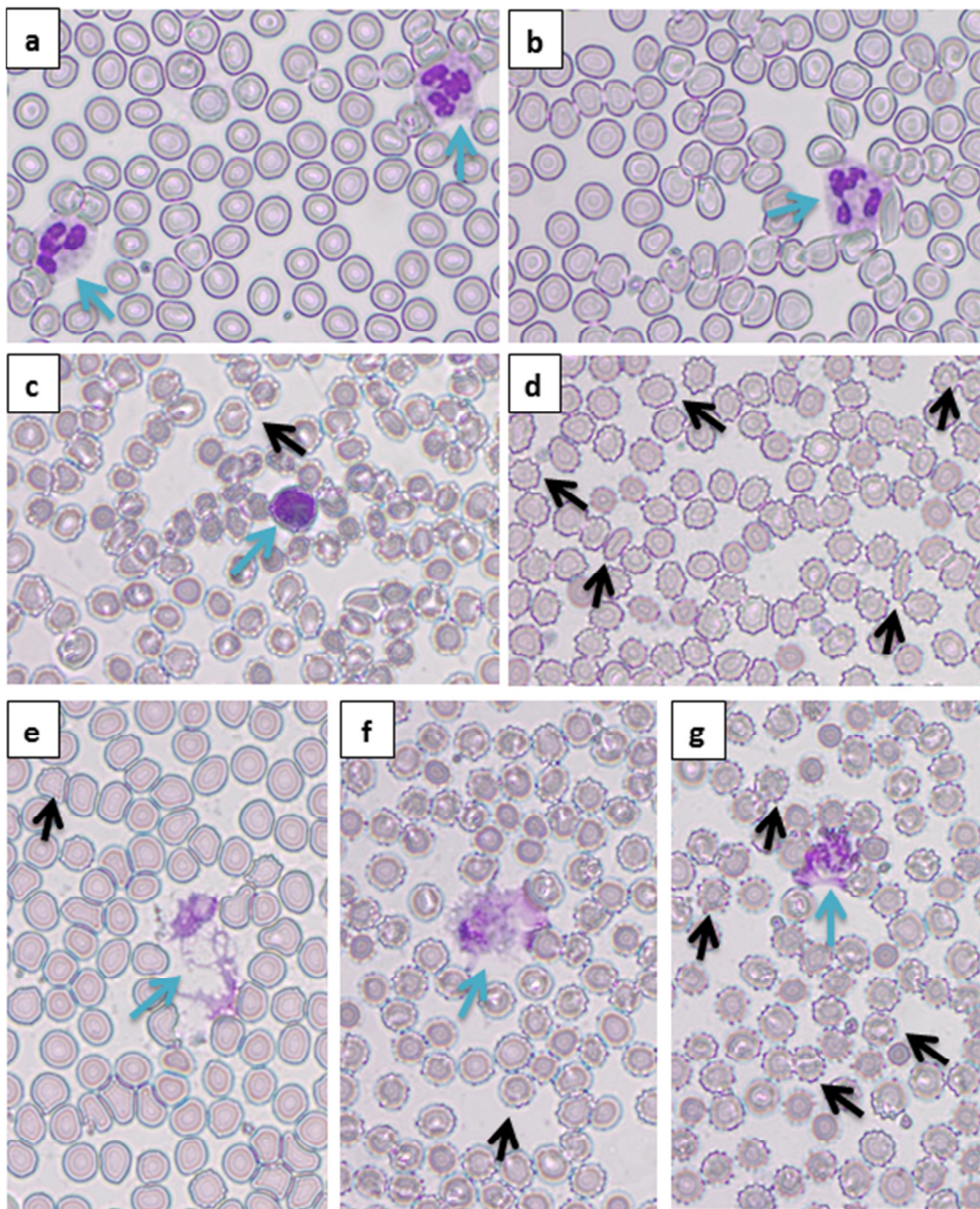
V případě krevních nátěrů vzorků odebraných do zkumavek Streck je pozorování (Obr. 7a-7e) do značné míry srovnatelné se vzorky odebranými do zkumavek CellSave, avšak celkově s nižším zastoupením tvarově či membránově abnormálních erythrocytů. Stejně jako v předchozím případě nebyly až na výjimky pozorovány elementy značící rozpad nukleárních buněk.



Obr. 6a-6h Snímky krevních nátěrů ze světelného mikroskopu. Vzorky odebrané do zkumavek CellSave. Obr. 6a-6c zachycují fyziologický krevní nátěr s neutrofilý (modré šipky) na pozadí erytrocytů. Na Obr. 6d-6h jsou krevní nátěry zpracované 3. den po odběru vykazující stres erytrocytů (černé šipky) a buněk (modré šipky). Buňky a jádra jsou nerovnoměrně ohraničená (6d – lymfocyt; 6e – lymfocyt (výše), monocyt (níže); 6f – ojedinělá lýze jaderné buňky; 6g – echinocyty; 6h – monocyt či modifikovaný lymfocyt), zvětšení: 40x.



Obr. 7a-7e Snímky krevních nátěrů ze světelného mikroskopu. Vzorky odebrané do zkumavek Streck. Obr. 7a,b zachycují fyziologický krevní nátěr s neutrofilem (modrá šipka) na pozadí erytrocytů. Na Obr. 7c-7e jsou krevní nátěry zpracované 3. den po odběru vykazující stres erytrocytů (černé šipky) a buněk (modré šipky). Buňky a jádra jsou nerovnoměrně ohraničeny a ojediněle byly patrné buněčné fragmenty (7e - modrá šipka), 7d – patrně neutrofilů (modré šipky), ačkoliv identifikaci ztěžuje zhoršená buněčná integrita, zvětšení: 40x.



Obr. 8a-8g Snímky krevních nátěrů ze světelného mikroskopu. Vzorky odebrané do zkumavek obsahující jen soli EDTA. Obr. 8a,b zachycují fyziologický krevní nátěr s neutrofilů (modré šipky) na pozadí erytrocytů. Na Obr. 8c-8g jsou krevní nátěry zpracované 3. den po odběru vykazující stres erytrocytů (černé šipky) a buněk (modré šipky). Buňky a jádra jsou nerovnoměrně ohraničená a velká část pozorovaných buněk byla zlyzována (modré šipky na Obr. 8e-8g). Šipka na Obr. 8c – lymfocyt, zvětšení: 40x

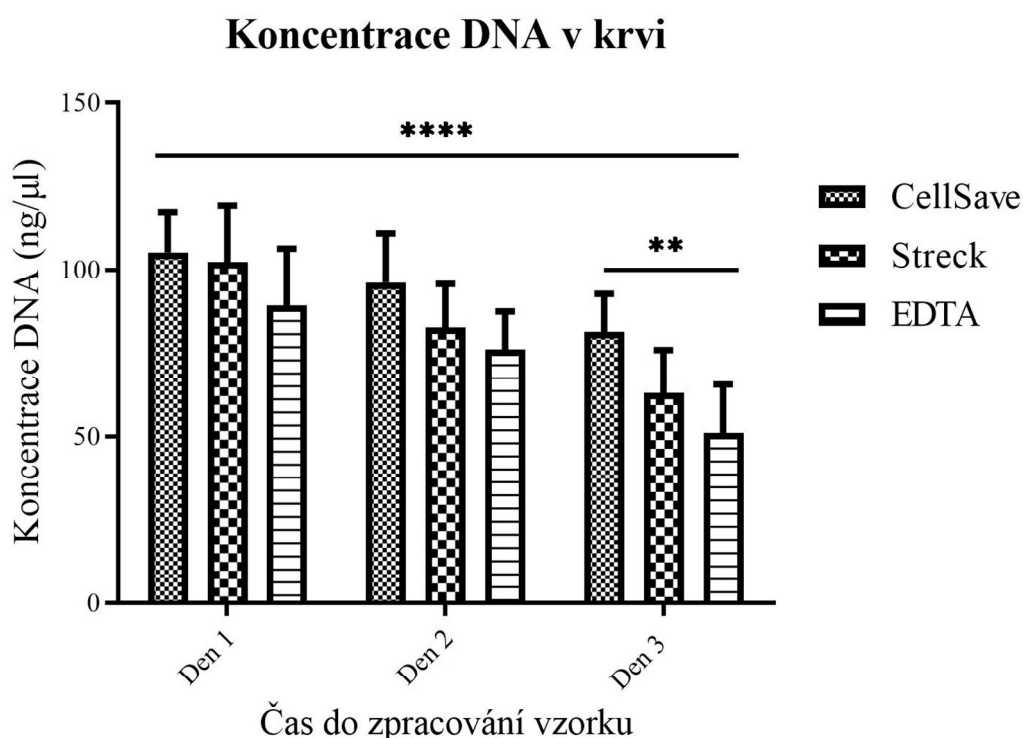
Krevní nátěry vzorků odebraných do běžných zkumavek s EDTA vykazují ze všech studovaných vzorků největší zastoupení různě modifikovaných erytrocytů. Ty mimo výše popisovaných pozorování jeví místy polychromasické znaky. Nejvíce kontrastní s předchozími dvěma skupinami nátěrů však jsou velice častá pozorování rozpadu

buněk a s tím souvisejících fragmentů jaderných buněk (Obr. 8a-8g). U tohoto nátěru jsou dále patrné elementy naznačující možnou lýzu jaderných buněk.

4.1.2 Stabilita DNA

Při porovnání schopnosti stabilizace krevních vzorků vybranými odběrovými zkumavkami byla získána data, která byla otestována na normalitu rozdělení (Shapirův–Wilkův test) prostřednictvím software GraphPad Prism 8.4.2. Hodnoty koncentrací DNA v krvi vykazovaly normální rozdělení, byly tedy dále testovány analýzou rozptylu (dvoufaktorová ANOVA) na hladině významnosti 95 % ($\alpha=0,05$). Shapirův–Wilkův test hodnot koncentrací DNA v plazmě zamítl normalitu hodnocení, data tedy byla normalizována logaritmizací a poté otestována analýzou rozptylu (dvoufaktorová ANOVA) na významnosti 95 % ($\alpha=0,05$).

Čistota DNA v krvi byla vysoká – poměr absorbancí při 260 a 280 nm se pohyboval v intervalu 1,69-1,96. Navíc drtivá většina hodnot se pohybovala velmi blízko průměrné hodnotě 1,84 ukazující na vysokou čistotu. Na Obr. 9 je graficky znázorněn vývoj koncentrací DNA ve vzorcích krve odebraných do jednotlivých odběrových zkumavek.

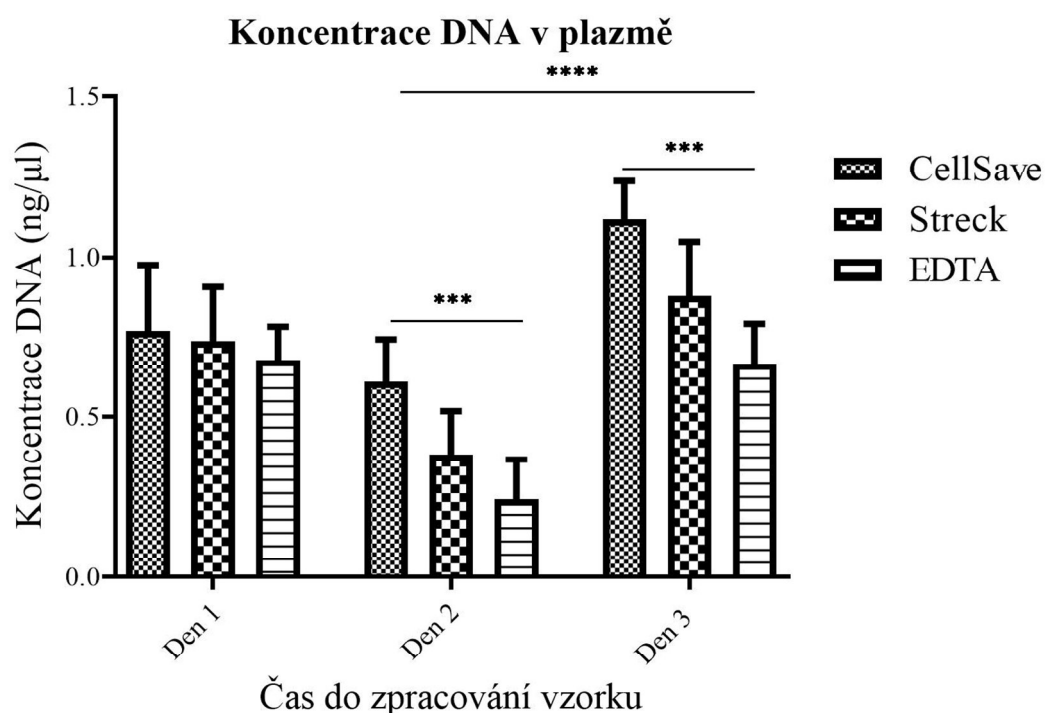


Obr. 9 Grafické znázornění koncentrace DNA ve vzorcích periferní krve odebraných do zkumavek CellSave, Streck a EDTA. Na obrázku lze pozorovat signifikantní rozdíl koncentrace DNA mezi prvním a třetím dnem zpracování napříč všemi skupinami vzorků, stejně tak v rámci třetího dne při srovnání vzorků v CellSave a EDTA. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměrných hodnot, ** odpovídá $p < 0,01$ **** odpovídá $p < 0,0001$.

Je zde patrný celkově shodný a signifikantní ($p < 0,0001$) sestupný trend ve všech typech zkumavek. Data nenaznačují zásadnější rozdíl v dynamice poklesu koncentrací mezi skupinami vzorků, nicméně ve třetí den zpracování byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi vzorky ve zkumavkách CellSave a EDTA. To znamená, že rychlost poklesu koncentrace byla nejpatrnější u zkumavek EDTA a naopak nejméně patrná u zkumavek CellSave.

Čistota DNA v plazmě byla nižší, než v krvi – poměr absorbancí při 260 a 280 nm činil průměrně 1,59 a až na výjimky kolísal v rozmezí 1,5-2,2 s mediánem 1,5. Nižší hodnota indikuje většinou znečištění proteiny nebo organickými látkami. Výsledek však může být odrazem i celkově velmi nízké koncentrace DNA v plazmě. Data jsou graficky zpracována na Obr. 10 a plyne z nich trend reciproční vzhledem k poklesu koncentrace DNA v krvi. Hlavním rysem byl tedy méně (CellSave) či více (Streck, EDTA) patrný pokles koncentrací DNA v plazmě vystřídáný signifikantním ($p < 0,0001$) vzrůstem ve vzorcích zpracovaných třetí den po odběru.

Celkově nejvyšší koncentrace DNA v plazmě byla u vzorků ve zkumavkách

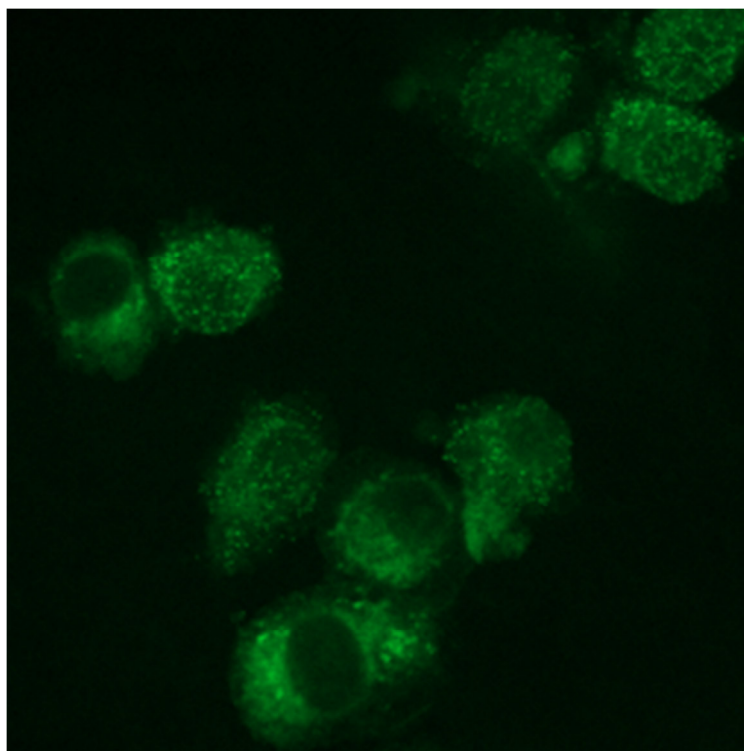


Obr. 10 Grafické znázornění množství DNA ve vzorcích plazmy z krve odebrané do zkumavek CellSave, Streck a EDTA. Na obrázku lze pozorovat signifikantní rozdíl koncentrace DNA mezi druhým a třetím dnem zpracování napříč všemi skupinami vzorků, stejně tak při srovnání vzorků v CellSave a EDTA v rámci druhého a třetího dne. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce průměrných hodnot, *** odpovídá $p < 0,001$ **** odpovídá $p < 0,0001$.

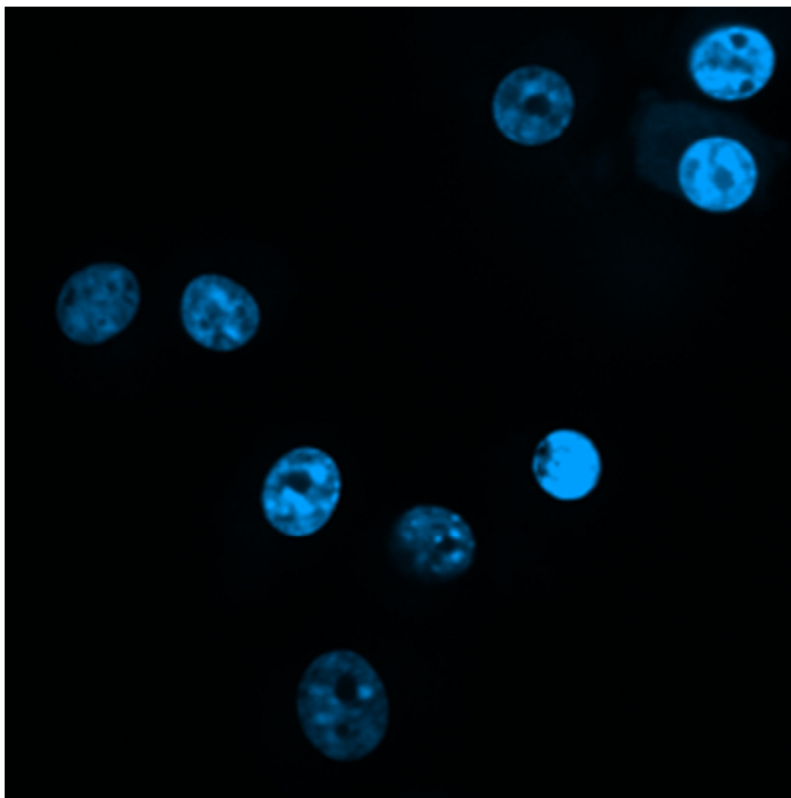
CellSave, signifikantně vyšší ($p < 0,001$) ve srovnání s EDTA, kdežto mezidenní zvýšení u zkumavek Streck bylo při porovnání s EDTA srovnatelné, tedy se vzájemně nesignifikantním rozdílem koncentrací v poslední den zpracování. Statisticky významný rozdíl ($p < 0,001$) byl také v druhý den zpracování u vzorků odebraných do zkumavek CellSave oproti vzorkům odebraných do zkumavek EDTA.

4.2 Validace značení nádorových buněk na buněčné linii U-87 MG

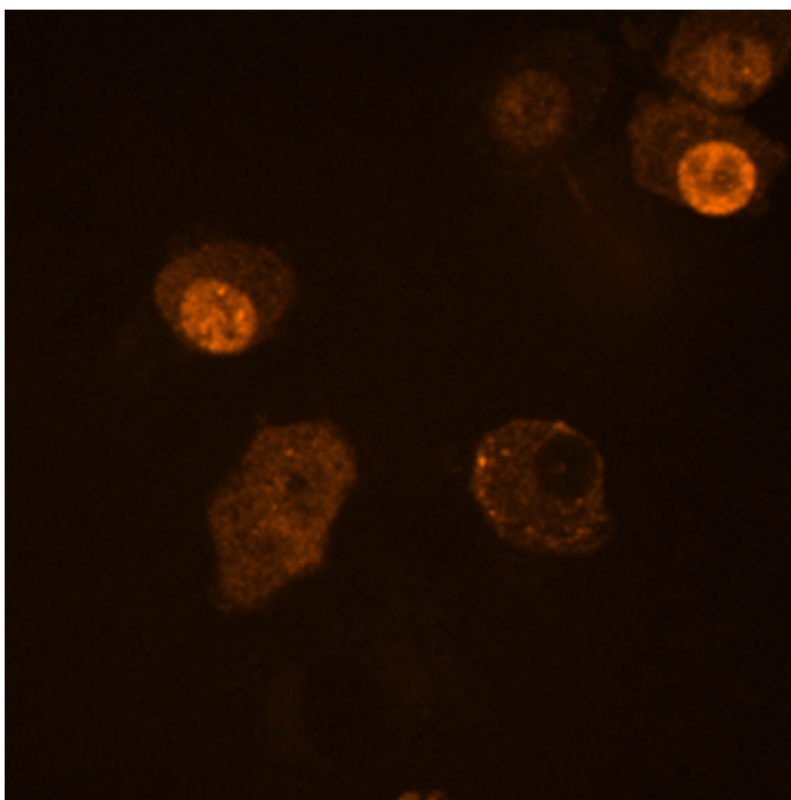
Analýza nádorových buněk U-87 MG přístrojem Vi-Cell stanovila viabilitu buněk na 94,7 %. Z celkového počtu $0,7830 \times 10^6$ buněk v 1 ml získané suspenze to odpovídalo $0,7415 \times 10^6$ živých buněk. Značení těchto buněk příslušnými protilátkami a jejich pozorování pomocí konfokálního mikroskopu ve fixovaném stavu umožnilo získat snímky označené jako Obr. 11-15. Na Obr. 12 je zachycena detekce buněčných jader prostřednictvím DAPI, jádra jsou pravidelně ohraničena a signál pro jejich identifikaci je dostatečně jasný. Optický filtr pro zachycení fluorescence v zelené části spektra odhaluje pozitivnost všech zobrazených jaderných buněk na GFAP (Obr. 11). Fluorescenci emitovanou protilátkami vázanými na vimentin však lze pozorovat jen u menší části těchto buněk, ne všechny zkoumané buňky tedy exprimovaly vimentin



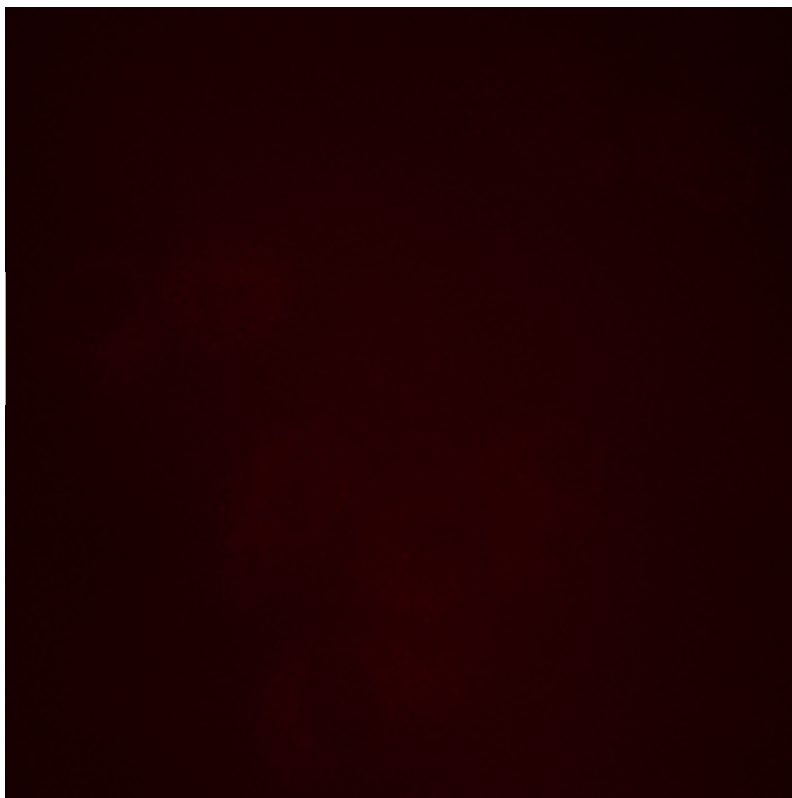
Obr. 11 Snímek z konfokálního mikroskopu zachycující buněčnou linii U-87 MG. Jednotlivé nádorové buňky jsou detekovány pomocí monoklonální anti-GFAP protilátky konjugované s fluoroforem Alexa Fluor® 488, zvětšení 40x.



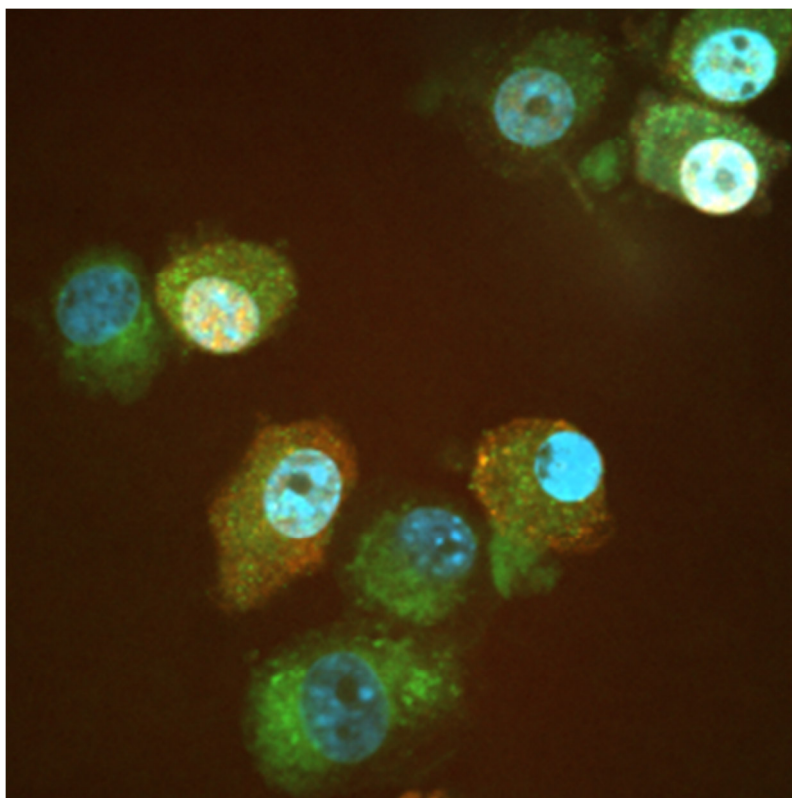
Obr. 12 Snímek z konfokálního mikroskopu zachycující buněčnou linii U-87 MG. Jednotlivé nádorové buňky jsou detekovány pomocí DAPI, zvětšení 40x.



Obr. 13 Snímek z konfokálního mikroskopu zachycující buněčnou linii U-87 MG. Jednotlivé nádorové buňky jsou detekovány pomocí anti-vimentin králičí polyklonální protilátky, konjugované s cyaninem 3, zvětšení 40x.



Obr. 14 Snímek z konfokálního mikroskopu, na němž není patrný žádný fluorescenční signál značící přítomnost leukocytů v buněčné linii U-87 MG. Jedná se o značení anti-CD45 myší monoklonální protilátkou (HI30) konjugovanou s allofukocyaninem, zvětšení 40x.



Obr. 15 Snímek z konfokálního mikroskopu zachycující buněčnou linii U-87 MG díky proložení několika fluorescenčních signálů. Jednotlivé nádorové buňky jsou detekovány za využití markerů GFAP, vimentin a DAPI, zvětšení 40x.

(Obr. 13). Na Obr. 14 nelze identifikovat žádný specifický signál potvrzující absenci negativně selekčního markeru CD45 typického pro leukocyty. Obr. 15 dále souhrnně zachycuje snímek z mikroskopu, v němž jsou proloženy fluorescenční signály znázorněných na Obr. 11-14. Z těchto pozorování je dále patrné, že jádra buněk se více či méně profilují i v rámci jiných fluorescenčních signálů, než u těch pocházejících ze značení DAPI.

4.3 Detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™

Bylo optimalizováno skenování vzorků ve smyslu volby výchozích parametrů analýzy a vyhodnocování jednotlivých hotspotů. Jako neoptimálnější se ukázalo prvotní skenování vzorku o výstupním výkonu laseru 2 mW případně vyšším tak, aby počet hotspotů k vyhodnocení dosahoval nejlépe vyšších jednotek stovek. Tento počet se sice odvíjí z velké části od kvality zpracování vzorku, ale ukázal se jako rozumný kompromis mezi spolehlivostí získaných dat a případnou subjektivností vyhodnocení narůstající s četností hotspotů. Ostatní parametry byly většinou ponechány dle protokolu a měněny jen výjimečně. Po vyhodnocení byly získány snímky zachycující zorné pole o velikosti 0,43x0,32 mm se zvětšením 20x.

4.3.1 Fyziologický krevní vzorek s buněčnou linií U87-MG

Na Obr. 16-19 jsou snímky kontrolního vzorku periferní krve obohacené o buněčnou linii U87-MG. Byla prokázána přítomnost nádorových buněk pozitivních na GFAP (Obr. 16, červené šipky) a vimentin (Obr. 18, červené šipky). Na Obr. 19 lze sice spatřit slabé fluorescenční signály (červené šipky) u značení anti-CD45, při bližším zkoumání se však tyto signály jeví omezeně specifické (oproti jiným – viz zelené šipky) a morfologie jader neodpovídá leukocytům (Obr. 17). Modrá šipka na těchto obrázcích označuje příklad nespecifického fluorescenčního signálu, který je do určité míry charakteristickým jevem doprovázející tento experiment. V rámci optimalizace však byla frekvence těchto útvarů, spolu s nespecifickým pozadím či falešně pozitivními signály z velké části snížena díky zařazení druhého promývacího kroku do původního protokolu. Mimo to byl s cílem zvýšit intenzitu fluorescenčního signálu navýšen přídavek anti-GFAP protilátky ze 7 na 8 μ l.

4.3.2 Krevní vzorky od pacientů s multiforním glioblastomem

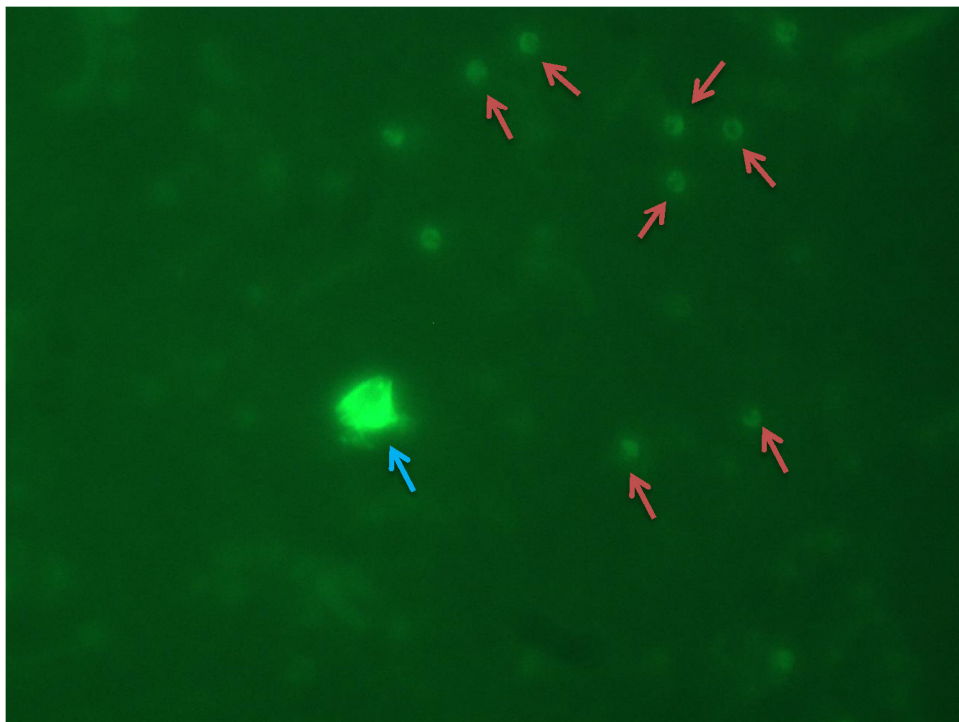
Z celkem sedmi patientských vzorků, které byly pro analýzu k dispozici, v šesti z nich nebyly detekovány CTCs nebo pozorovány známky jejich přítomnosti. Občasné pozorování falešně pozitivních signálů bylo zpravidla vyloučeno z hlediska

morfologického, nesouladu fluorescenčních signálů atp. Tyto případy většinou svědčily o výskytu artefaktů, které mohou mít původ v nečistotách, krystalcích barviva a jiných směrech. V Tab. 1 jsou shrnuty základní informace o těchto vzorcích jako počet hotspotů či použitý výstupní výkon laseru při skenování. Obr. 20-22 pak zachycují snímky pod různými optickými filtry všech vzorků, u nichž nebyly detekovány žádné CTCs. U těchto vzorků nebyl pozorován žádný relevantní fluorescenční signál, který by odpovídal expresi GFAP či vimentinu v buňce. Krevní vzorek pacienta 1 sice vykazuje známky fluorescence pro GFAP (intenzivní body na Obr. 20A), nicméně přítomnost CTCs vylučují další charakteristiky jako absence fluorescence pro vimentin či naopak přítomné fluorescenční signály pro CD-45.

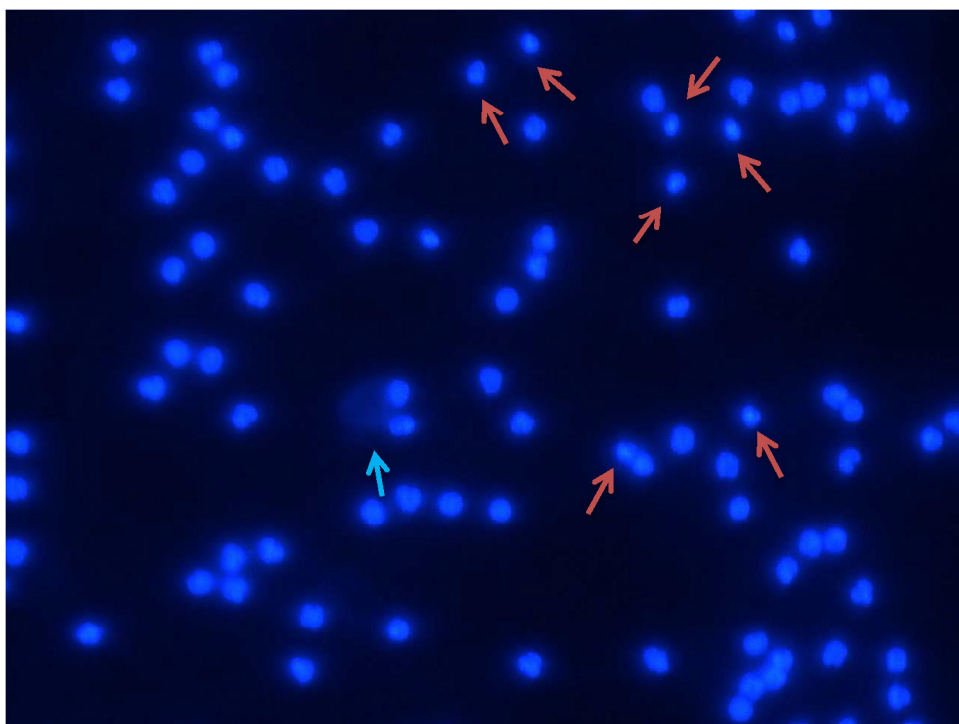
Detekce CTCs je však na Obr. 23-30, u krevního vzorku pacienta 5 byl detekován klastr 2 glioblastomových buněk. Svědčí o tom jasný fluorescenční signál pro GFAP, který překrývá dvě poměrně velká jádra. Fluorescenční signál pro vimentin se překrývá s předchozími dvěma signály a jeho intenzita je obdobně jako u buněk pozorovaných pod konfokálním mikroskopem pro filamentární cytoskelet charakteristicky různorodě rozložena spíše mimo oblasti jader. Značení anti-CD45 (Obr. 26A) poskytlo jednoznačně negativní výsledek, což potvrzuje přítomnost glioblastomových buněk. Ve stejném vzorku byla také nalezena soliterní nádorová buňka, relativně velká a s identickými fluorescenčními znaky jako v případě právě popsaného klastru. Detekované nádorové buňky mají relativně nepravidelný tvar. Kromě toho si lze dále ve vzorku povšimnout přítomnosti relativně velkého počtu jader, resp. buněk, stejný trend byl pozorován i ve zbývajících hotspotech. Kvantitativní srovnání jader však ze získaných snímků nelze provést.

Tab. 1 Shrnutí základních informací z analýzy patientských vzorků

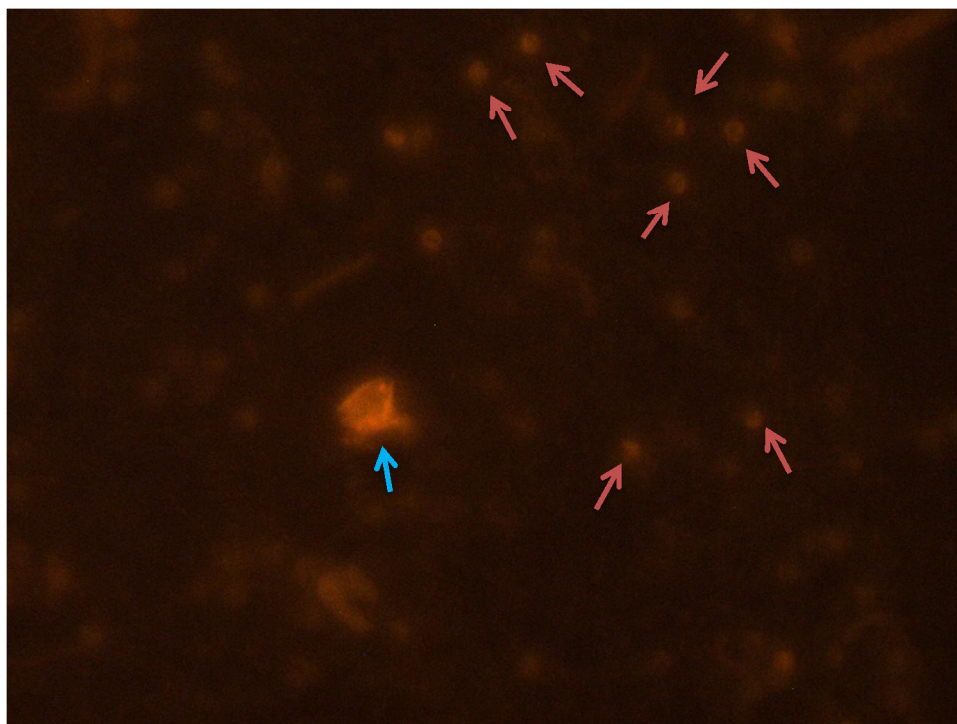
Pacient	Hotspotů	Výstupní výkon laseru (mW)	Nález CTCs
1	757	5	Ne
2	87	3	Ne
3	921	3	Ne
4	1464	3	Ne
5	1799	3	Ne
6	844	5	Ne
7	106	2	Ano



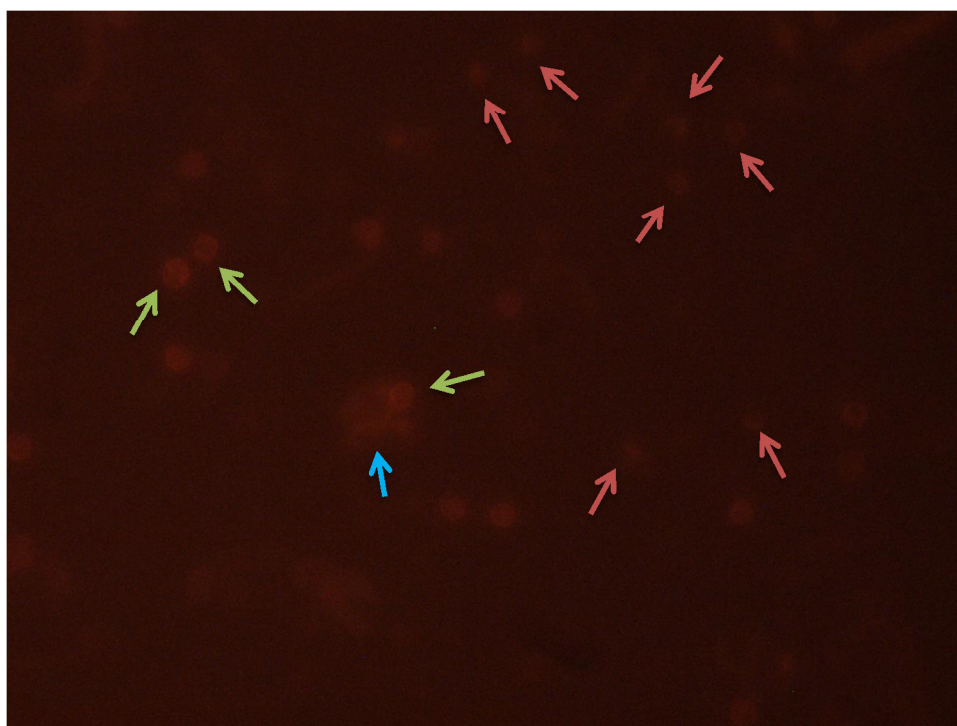
Obr. 16 Snímek z platformy CytoTrack. Kontrolní vzorek s buňkami linie U87-MG. Červené šipky označují fluorescenční signály pro nádorové buňky. Modrá šipka označuje nespecifický signál. Značeno anti-GFAP protilátkou, zvětšení 20x.



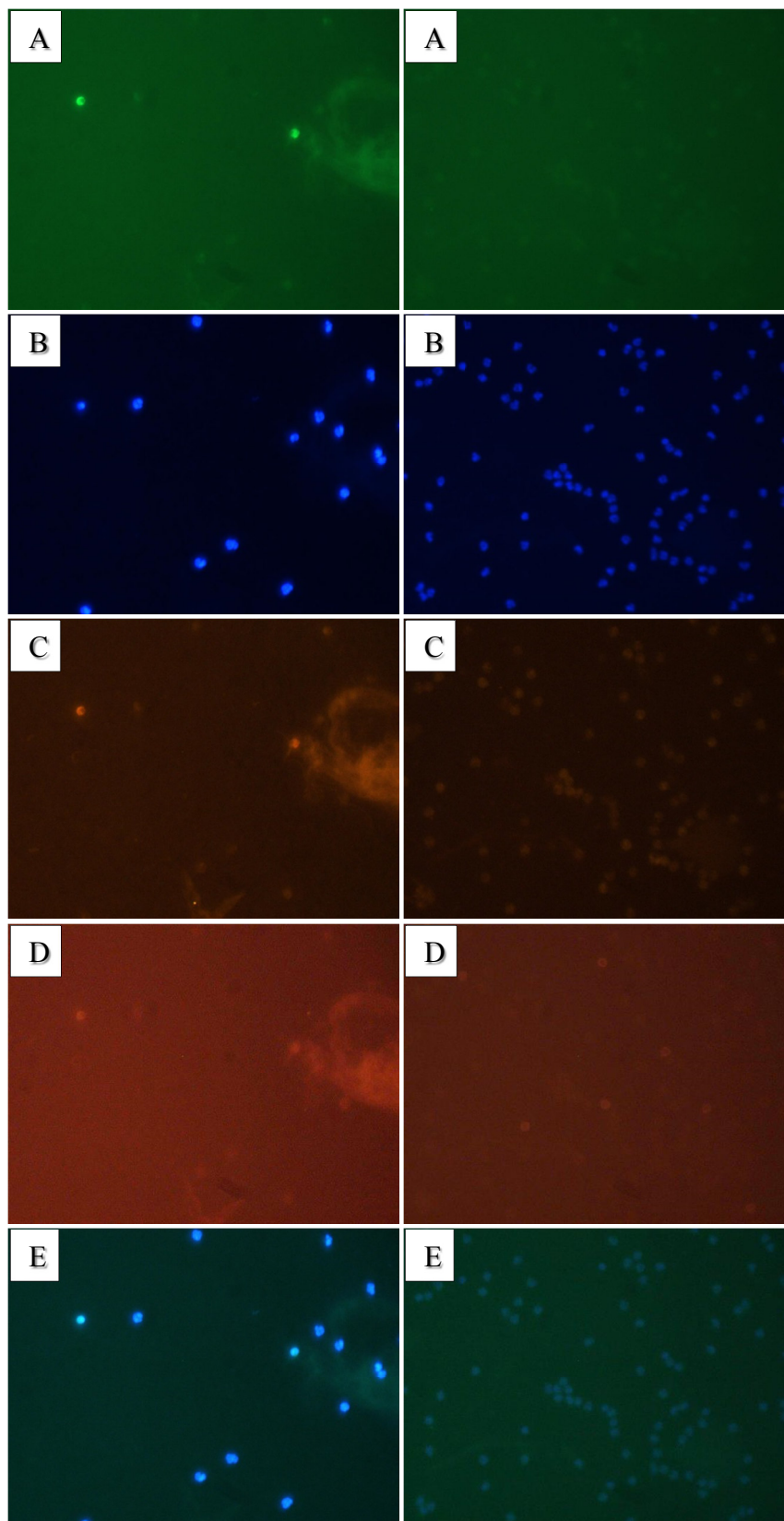
Obr. 17 Snímek z platformy CytoTrack. Kontrolní vzorek s buňkami linie U87-MG. Červené šipky označují jádra nádorových buněk – jejich morfologie neodpovídá leukocytům. Modrá šipka označuje nespecifický signál. Značeno DAPI, zvětšení 20x.



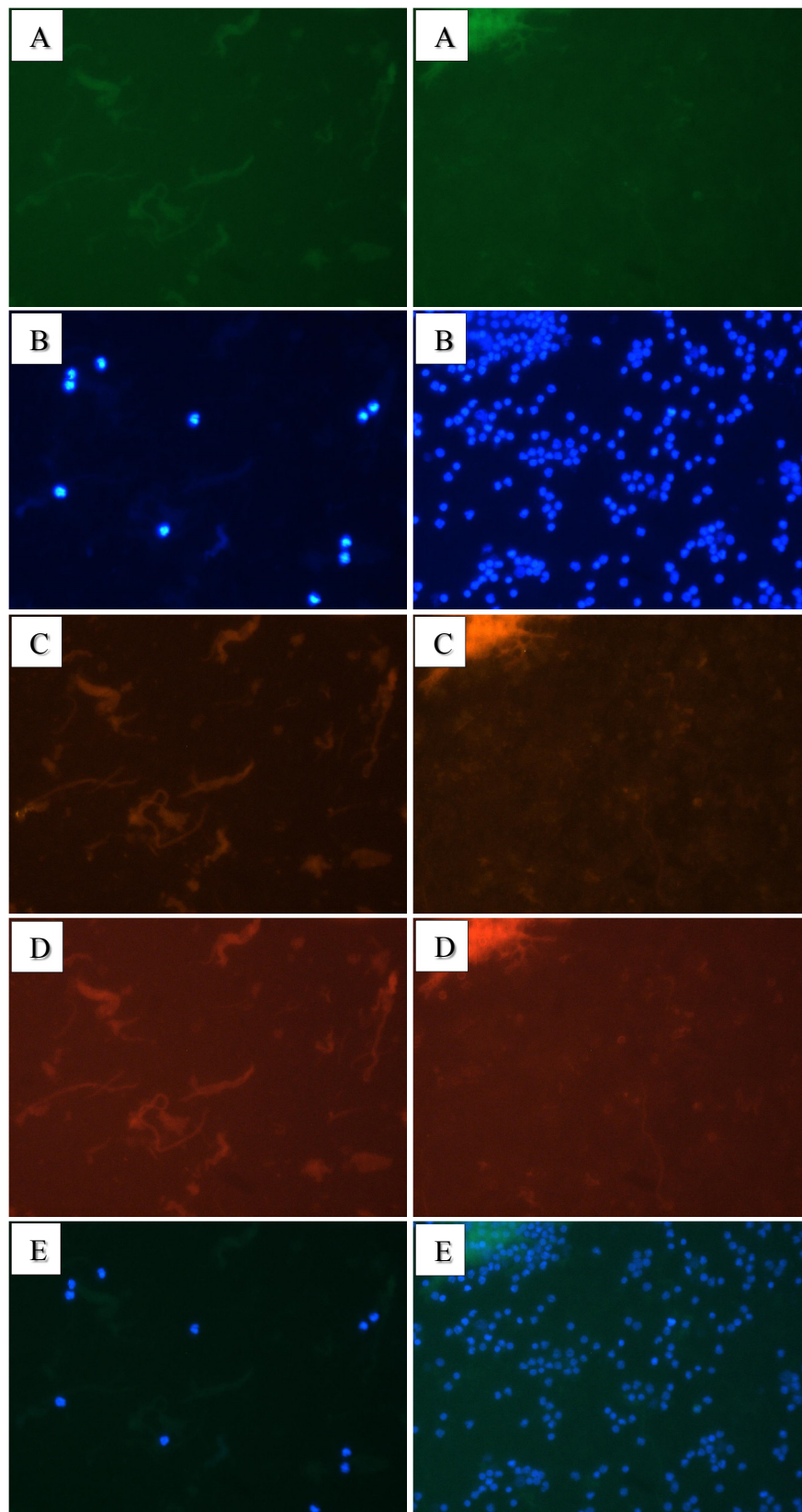
Obr. 18 Snímek z platformy CytoTrack. Kontrolní vzorek s buňkami linie U87-MG. Červené šipky označují fluorescenční signály pro nádorové buňky. Modrá šipka označuje nespecifický signál. Značeno anti-vimentin protilátkou, zvětšení 20x.



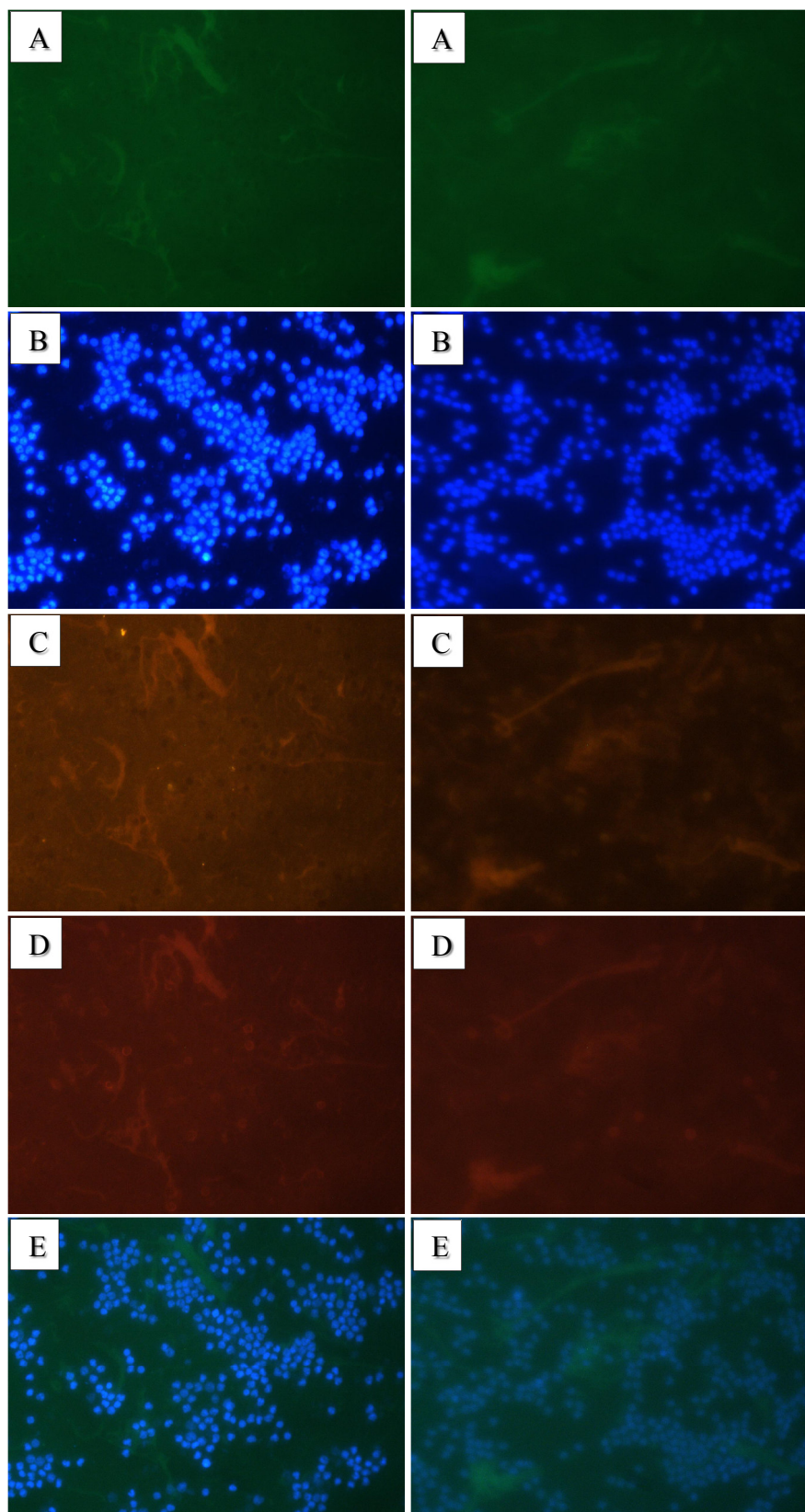
Obr. 19 Snímek z platformy CytoTrack. Kontrolní vzorek s buňkami linie U87-MG. Červené šipky označují absenci nebo jen velmi nespecifický fluorescenční signál vylučující přítomnost leukocytů. Zelené šipky označují pravidelný ohraničený signál pro leukocyty. Modrá šipka označuje nespecifický signál znečištění. Značeno anti-CD45 protilátkou, zvětšení 20x.



Obr. 20 Snímky z platformy CytoTrack. Krevní vzorky pacientů 1 (vlevo) a 2 (vpravo) neobsahovaly CTCs, protože nebyla zaznamenána příslušná kombinace fluorescenčních signálů. Značení: A. anti-GFAP, B: jader pomocí DAPI, C: anti-vimentinem, D: anti-CD45, E: proložení fluorescenčních signálů anti-GFAP a DAPI, zvětšení 20x.



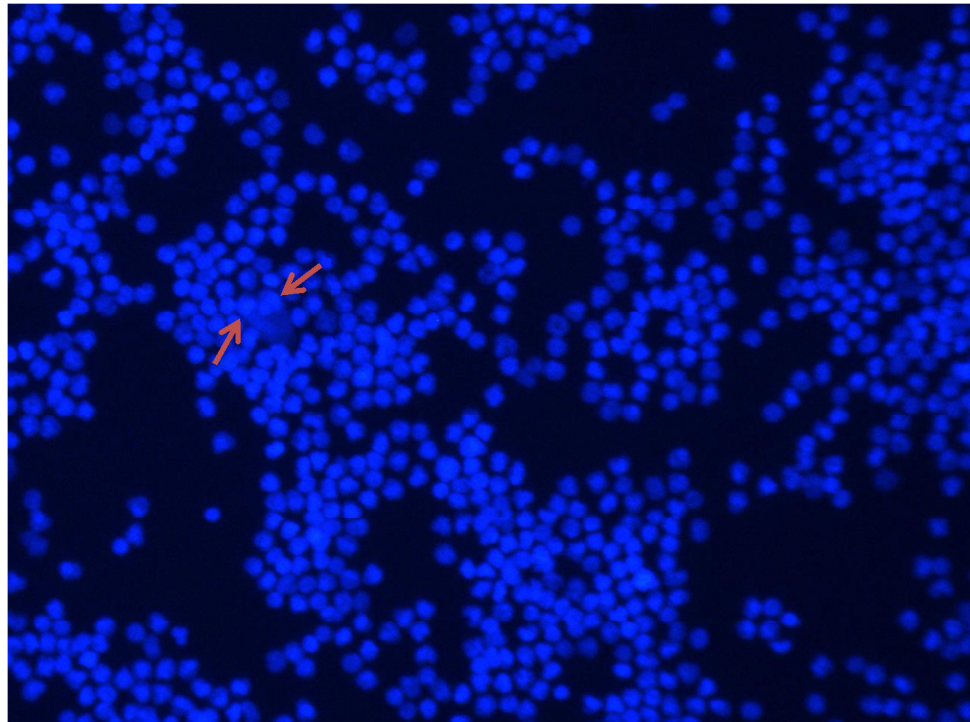
Obr. 21 Snímky z platformy CytoTrack. Krevní vzorky pacientů 3 (vlevo) a 4 (vpravo) neobsahovaly CTCs, protože nebyla zaznamenána příslušná kombinace fluorescenčních signálů. Značení: A: anti-GFAP, B: jader pomocí DAPI, C: anti-vimentinem, D: anti-CD45, E: proložení fluorescenčních signálů anti-GFAP a DAPI, zvětšení 20x.



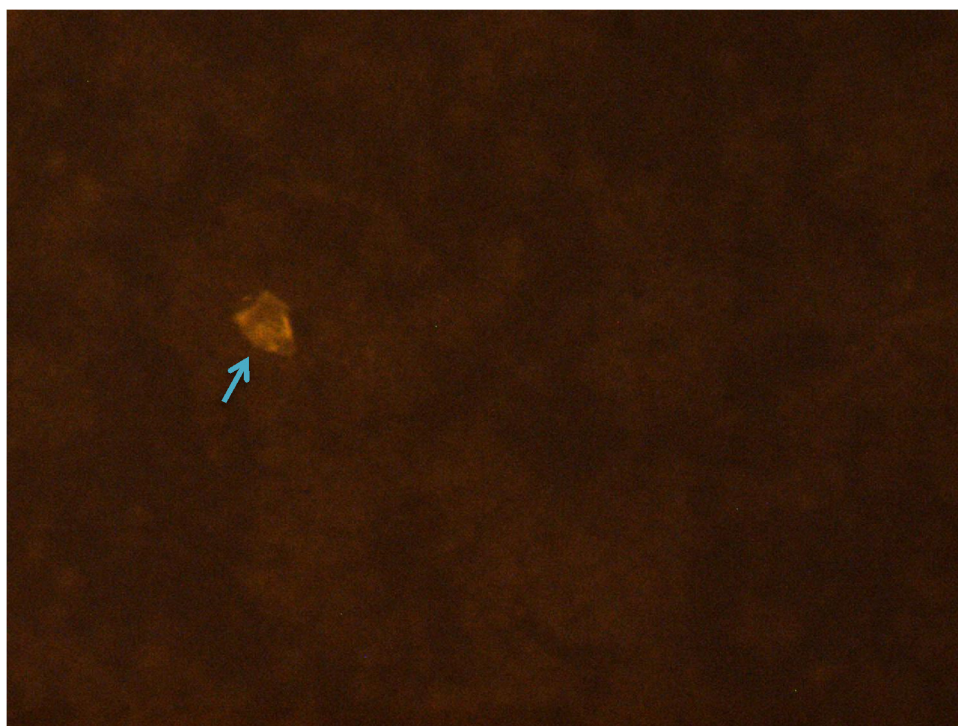
Obr. 22 Snímky z platformy CytoTrack. Krevní vzorky pacientů 5 (vlevo) a 6 (vpravo) neobsahovaly CTCs, protože nebyla zaznamenána příslušná kombinace fluorescenčních signálů. Značení: A: anti-GFAP, B: jader pomocí DAPI, C: anti-vimentinem, D: anti-CD45, E: proložení fluorescenčních signálů anti-GFAP a DAPI, zvětšení 20x.



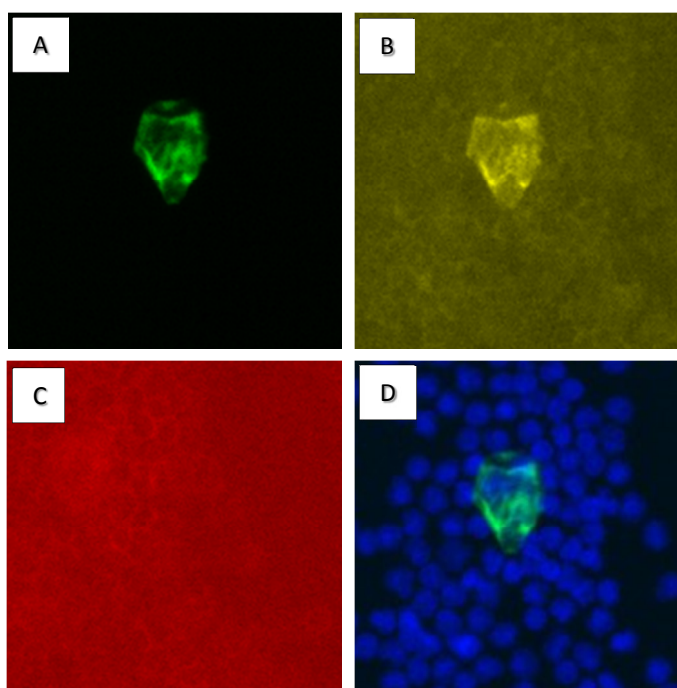
Obr. 23 Snímek z platformy CytoTrack. Detekce klastru CTCs (červená šipka) v krevním vzorku pacienta 7. Značeno anti-GFAP protilátkou, zvětšení 20x.



Obr. 24 Snímek z platformy CytoTrack. Detekce klastru CTCs v krevním vzorku pacienta 7. Značeno (červené šipky označují jádra těchto buněk) DAPI, zvětšení 20x.



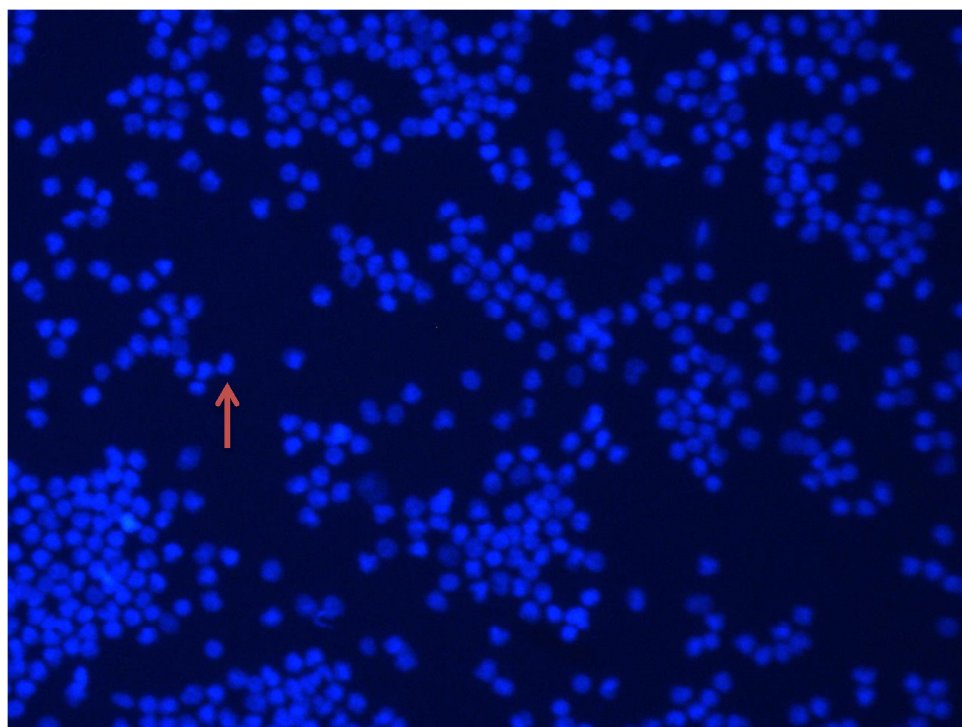
Obr. 25 Snímek z platformy CytoTrack. Detekce klastru CTCs (modrá šipka) v krevním vzorku pacienta 7. Značeno anti-vimentin protilátkou, zvětšení 20x.



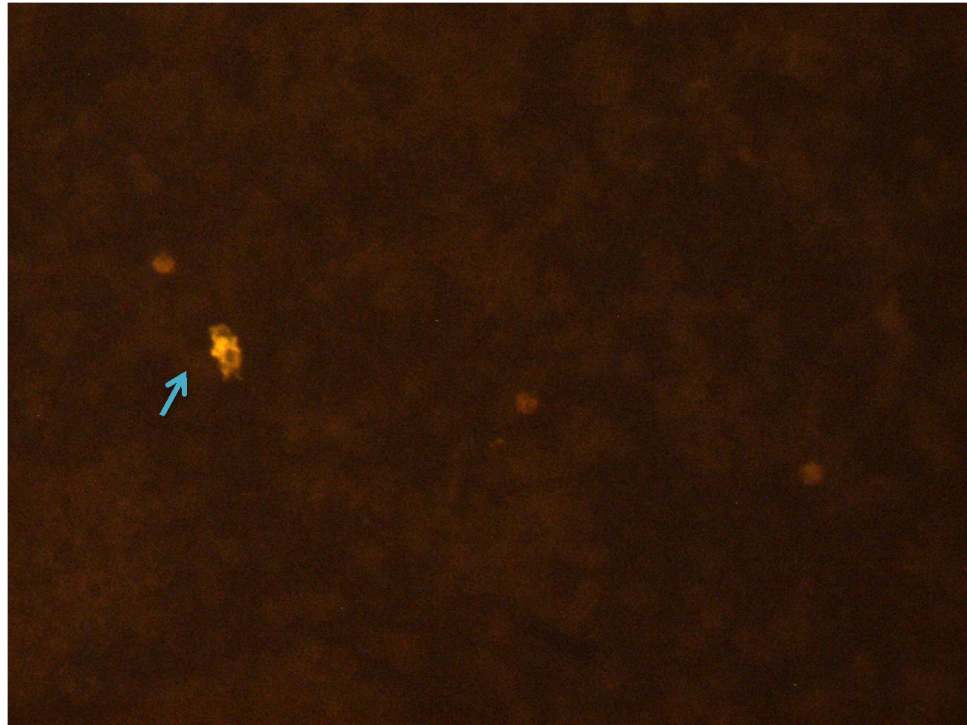
Obr. 26 Snímky z fluorescenčního mikroskopu zachycující klastř CTCs detekovaný v krevním vzorku pacienta 7. Značení A: anti-GFAP, B: anti-vimentin, C: anti-CD45, D: proložení fluorescenčních signálů anti-GFAP a DAPI, zvětšení 40x.



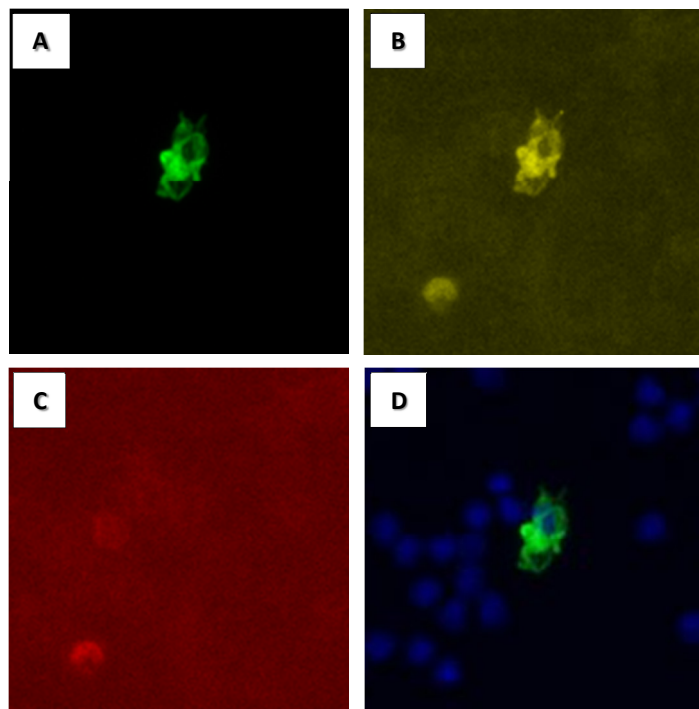
Obr. 27 Snímek z platformy CytoTrack. Detekce CTC (červená šipka) v krevním vzorku pacienta 7. Značeno anti-GFAP protilátkou, zvětšení 20x.



Obr. 28 Snímek z platformy CytoTrack. Detekce CTC (červená šipka označuje jádro buňky) v krevním vzorku pacienta 7. Značeno DAPI, zvětšení 20x.



Obr. 29 Snímek z platformy CytoTrack. Detekce CTC (modrá šipka) v krevním vzorku pacienta 7. Značeno anti-vimentin protilátkou, zvětšení 20x.



Obr. 30 Snímky z fluorescenčního mikroskopu zachycující CTC detekovanou v krevním vzorku pacienta 7. Značení A: anti-GFAP, B: anti-vimentin, C: anti-CD45, D: proložení fluorescenčních signálů anti-GFAP a DAPI, zvětšení 40x.

5 Diskuze

Výběr efektivních odběrových zkumavek probíhal mimo jiné za využití krevních nátěrů. Přesto, že jejich vyhodnocení může kvůli případné subjektivnosti do určité míry zatěžovat výsledek, pozorování vcelku jednoznačně ukázala na nesrovnatelně vyšší počet zlyzovaných jaderných buněk v krvi odebrané do běžných zkumavek oproti zkumavkám CellSearch a Streck. Podrobnější vyhodnocení krevních nátěrů zejména pro odlišení na první pohled podobných výsledků u těchto dvou odběrových zkumavek je nicméně v souladu s trendy pozorovanými v práci Makhro *et al.* (2016). Nejviditelnější projev postupné degradace vzorku ve smyslu deformace erytrocytů zaznamenali také a již po 24 hodinách při 22 °C pozorovali významný nárůst podílu echinocytů rostoucí s časem. Samotné morfologické změny erytrocytů mohou souviset s hyperosmolaritou prostředí, sníženým pH vzorku či narušenou tvorbou membránových lipidů a tedy změnou elektrického potenciálu na membráně. Jde také o oxidační stres lipidů, proteinů a nukleových kyselin hypoxií-indukovanou produkcí reaktivních forem kyslíku (Malacrida *et al.*, 2019). Pozvolný pokles pH plazmy Makhro *et al.* (2016) skutečně pozorovali a stejně jako u Mohammadhoseini *et al.* (2015) byl tento pokles spojen s pokojovou teplotou a při chlazení nebyl tak patrný. Uchování krevních vzorků při pokojové teplotě se odráží i v metabolomu, který je značně pozměněn převážně ve smyslu zvýšení koncentrací různých produktů metabolismu, což může mít vliv na osmolaritu a pH vzorku. Příkladem je hromadění laktátu uvolňovaného vyššími nároky erytrocytů na glykolýzu při vyšší teplotě, který může přispívat k okyselení vzorku (Makhro *et al.*, 2016; Kamlage *et al.*, 2018).

Je zřejmé, že děje probíhající v krevním vzorku *ex vivo* jsou mnohem komplexnější. Hlavně zvyšující se teplota a rostoucí čas před zpracováním vzorky znehodnocuje nejjednoznačeji. Projevuje se to úměrným poklesem populací bílých krvinek vystaveným těmito nepříznivým vlivům (Jobes *et al.*, 2011). Na druhou stranu je těžké diskutovat přesný vliv stabilizačních směsí použitých odběrových zkumavek, protože jejich složení je obchodním tajemstvím. Teplota není také jednoznačně stanovitelným faktorem, protože různé krevní elementy jsou stabilnější při různých teplotách, nicméně obecně jde o teploty nižší - mezi 4 a 16 °C (Diks *et al.*, 2019).

S ohledem na výše uvedená fakta lze konstatovat, že v této práci byla zaznamenána nedostatečná konzervační schopnost zkumavek bez obsahu reagens stabilizující buňky. Mimo to byly také pozorovány celkově nižší koncentrace DNA ve vzorcích krve

i plazmy skladovaných v těchto zkumavkách. Vzhledem k mikroskopickým pozorováním to však velmi pravděpodobně nesouvisí s lepšími stabilizačními schopnostmi.

Příbalové letáky zkumavek CellSave a Streck obsahují informaci o obsahu solí EDTA, nabízí se možná souvislost sníženého množství DNA ve vzorcích odebraných do zkumavek s EDTA s nižším obsahem a tedy nižším inhibičním účinkem látky ve srovnání s dříve jmenovanými zkumavkami. Inhibiční vliv byl popsán na různé typy degradačních enzymů v čele s nukleasami (Banfi *et al.*, 2007; Barra *et al.*, 2015). Protože zkumavky Streck a CellSave obsahují i jiné protektivní látky, které mohou vliv EDTA zcela upozadit, a protože přesné složení konzervační směsi, a tedy ani přesné koncentrace příslušných solí EDTA není známo, nelze spolehlivě zhodnotit možný vliv této látky na stabilitu DNA v jednotlivých zkumavkách. Pozorovaný koncentrační pokles může zčásti vysvětlovat patrně i v některých studiích zmiňovaný spontánní či jen zbytkovými degradačními enzymy způsobený úbytek DNA (Barra *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2016). Podstatný je však také v každém případě rostoucí trend koncentrací DNA v plazmě z druhého na třetí den zpracování vzorků. Kromě všudypřítomné postupné degradace DNA je tedy nutné brát v potaz i postupnou degradaci buněčné složky odpovídající poklesu DNA v krvi a nárůstu v plazmě. Signifikantně významnější nárůst koncentrace DNA v plazmě ze zkumavek CellSave oproti EDTA může být ukazatelem účinnějších stabilizačních schopností zkumavek Streck.

DNA je i přes relativně vyšší stabilitu z kvantitativního hlediska ohrožena kvůli rozpadu bílých krvinek (Huang *et al.*, 2017). Z tohoto pohledu jsou tedy zkumavky CellSave a Streck vhodným nástrojem pro odběr periferní krve (viz vyhodnocení krevních nátěrů). Závěrem lze doplnit, že při volbě zkumavek pro odběr krevních vzorků bylo přihlédnuto k delší časové garanci u značky Streck překonávající jinak většinou srovnatelné výsledky prováděných experimentů u zkumavek CellSave.

Při dalších experimentech by bylo vhodné zaměřit se také na stabilitu RNA pro účely analýz transkriptomu CTCs. Ribonukleová kyselina totiž při skladování plné krve podléhá významnému kvantitativnímu poklesu, a to i za nízké teploty, která tak nezabrání degradaci RNA. Nutno dodat, že pro metody sekvenování nové generace je nutné uchovat vzorky o vysoké kvalitě, tato podmínka je dosažena při zpracování vzorku maximálně do 24 hodin (Huang *et al.*, 2017).

V rámci této diplomové práce byla dále provedena validace imunofluorescenční detekce nádorových buněk buněčné linie U-87 MG. Struktura detekované fluorescence pro GFAP a vimentinu koreluje s mnohými obdobnými experimenty (van Den Berge *et al.*, 2010; Heo *et al.*, 2012; Kamphuis *et al.*, 2014; Moeton *et al.*, 2016). Je vhodné zmínit, že Heo *et al.* (2012) pozorovali detekci GFAP i v kontrolní tkáni. Oproti tomu GFAP- δ jen v té astrocytární navíc v rámci kolokalizace se zvýšenou detekcí proteinu protoonkogenu B-Rad a IDH1. Byla ale také zaznamenána koexprese GFAP- α a vimentinu (van Den Berge *et al.*, 2010), takže pro účely detekce CTCs, zdá se, není potřeba rozlišovat jednotlivé isoformy GFAP. Detekce většího počtu GFAP⁺ buněk, než těch pozitivních na vimentin však v předkládané diplomové práci potvrzuje velmi pravděpodobně spíše opačný trend. Tím je nižší spolehlivost markeru vimentinu, protože experiment probíhal na nádorových buňkách odvozených od GBM. Na druhou stranu jsou známy určité odlišnosti v DNA profilu této široce využívané buněčné linie v porovnání s původními buňkami a nemusí tedy dokonale odrážet znaky primárního tumoru (Allen *et al.*, 2016). V popisovaném validačním experimentu tomu však nic nenasvědčovalo a koexprese GFAP a vimentinu jako markerů daných buněk se pro další experimenty zdála být spolu s negativním selekčním markerem CD45 dostatečná. Z hlediska další perspektivy by bylo vhodné se zabývat i imunofluorescenční detekcí isoformy GFAP- δ , jejíž exprese může usnadňovat označení buněk jako CTCs. Získaná data totiž ukazují, že celková detekce GFAP byla spíše ve formě heterogenní mozaiky drobných agregátů, než pravidelnou sítí dlouhých vláken. Imunofluorescenční analýza Perng *et al.* (2008) jasně ukazuje, že tyto agregáty jsou utvářeny GFAP- δ , kdežto GFAP- α představoval komplexní síť dlouhých vláken.

V rámci detekce vimentinu byl pozorován zvýšený signál kopírující některá jádra. Lze to přisoudit výskytu GFAP- δ , neboť Moeton *et al.* (2016) na buněčných liniích U-87 MG a U251 zjistili, že transdukce této isoformy způsobuje kondenzaci vimentinu zejména v okolí jádra. Toto pozorování by mohl být zajímavý způsob charakterizace nádorových buněk, ale jde o hypotézu vyžadující další ověření na větším množství vzorků.

Pozorování na konfokálním mikroskopu posloužila jako výchozí bod pro optimalizaci přímé detekce CTCs systémem CytoTrack CT11TM. Mohou však být také vhodným nástrojem pro další analýzu přímo detekovaných CTCs, neboť výše popisované morfologické znaky mohou být vedle genetických analýz dalším užitečným

přístupem. Samotná přímá detekce nádorových buněk prokázala své přednosti především ve smyslu vysoké skenovací kapacity velkého počtu buněk ve vzorku, což je významné v kompenzaci celkově nižšího zastoupení CTCs v krevním oběhu. Pro takto velké objemy krevních vzorků je rychlost skenování dalším pozitivem, nicméně praxe ukazuje, že je třeba počítat s časem nutným pro pečlivé vyhodnocení vyselektovaných hotspotů. V rámci zpracování vzorku se jako potenciálně kritický bod jeví odběr buffy coatu. Toto sice nelze objektivně zhodnotit a validační experiment s kontrolním vzorkem a glioblastomovou buněčnou linií tomu přímo nenasvědčuje, nicméně Hillig *et al.* (2014) na tento fakt také poukazují s tím, že ztráta CTCs nemůže být vyloučena. I přes toto úskalí ale validovali platformu CytoTrack jako slibnou a flexibilní metodu s dobrou reprodukovatelností a předpokladem dalšího testování na klinických vzorcích.

Detekce CTCs na klinických vzorcích byla v této práci realizována na úzkém okruhu pacientů. Počet vzorků se odvíjel od uskutečněných operačních zákroků a byl spojen s konkrétní krajskou nemocnicí, což s sebou nese jejich nižší četnost. McArthur *et al.* (2014) a Krol *et al.* (2018) sice své práce staví na 13 a 11, resp. 8 pacientech, je podle nich ale zřejmé, že pro pokročilejší závěry v detekci CTCs u multifonního glioblastomu bude potřeba jednak další výzkum a také navýšit počet analyzovaných vzorků. To platí i pro výstupy v této diplomové práci. Samotná detekce klastru dvou CTCs je ale velmi významná, protože překonání hematoencefalické bariéry celým klastrem zdokumentovali zatím jen Krol *et al.* (2018), mimo jiné také již od dvou buněk. Bližší mikroskopická pozorování detekovaných CTCs odráží znaky již diskutované ve validačním experimentu a dále potvrzují detekci buněk.

Aplikace získaných výstupů na klinická data pacientů nebyla předmětem předkládané diplomové práce, nicméně právě výzkum na širší základně vzorků by mohl sloužit jako užitečný nástroj usnadňující včasné stanovení diagnózy, indikaci adjuvantní terapie či sledování progresu onemocnění (Chistiakov *et al.*, 2018). Je ale nepochybné, že přítomnost CTCs ve vzorku odebraném před chirurgickým zákrokem znamená nepříznivou prognózu pro pacienta a potenciál rozvoje metastáz (Sullivan *et al.*, 2014). Ač nepřímě, potvrzuje to také teoreticky popisované biochemické a buněčné mechanismy, kterými jsou CTCs schopné překročit přirozené biologické bariéry a vstoupit do krevního oběhu.

6 Závěr

V rámci teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše shrnující dostupné poznatky o charakteristice multifornního glioblastomu. Charakteristika byla zaměřena zejména na genetické příčiny vzniku onemocnění a biochemické a molekulární mechanismy účastnící se progresu onemocnění ve smyslu diseminace cirkulujících nádorových buněk. Nedílnou součástí literární rešerše je i shrnutí dosud publikovaných metod detekce cirkulujících nádorových buněk a jejich srovnání.

V praktické části diplomové práce byly vyselektovány nejvhodnější odběrové zkumavky a přímým mikroskopickým pozorováním viability buněčných element spolu s analýzou obsahu DNA v krvi a plazmě validovány odběrové zkumavky Streck. Na rozdíl od běžně užívaných zkumavek s obsahem solí kyseliny ethylendiamintetraoctové a s přihlédnutím k nejdelší garanci skladovatelnosti vzorků vykazovaly nejoptimálnější stabilizační efekt a byly užity pro další experimenty.

Byla také zavedena a zoptimalizována metoda přímé detekce nádorových buněk v periferní krvi u pacientů s multifornním glioblastomem. Systém CytoTrack CT11TM se projevil jako flexibilní a uživatelsky komfortní platforma pro detekci nádorových buněk. Přestože byly analýzy prováděny na úžším okruhu patientských vzorků, byly v jednom z nich detekovány dva případy cirkulujících nádorových buněk, kdy v jednom z nich se jednalo o raritní klastr dvou buněk.

7 Literatura

- Agnihotri S., Aldape K.D., Zadeh G. (2014): Isocitrate dehydrogenase status and molecular subclasses of glioma and glioblastoma. *Neurosurgical Focus* **37**, E13.
- Ahn J.C., Teng P.C., Chen P.J., Posadas E., Tseng H.R., Lu S.C., Yang J.D. (2020): Detection of circulating tumor cells and their implications as a novel biomarker for diagnosis, prognostication, and therapeutic monitoring in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, schváleno k publikaci.
- Alberts B., Johnson A.D., Lewis A., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015): *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed., Garland Science, New York, USA, 1464 stran.
- Alfonso J.C.L., Talkenberger K., Seifert M., Klink B., Hawkins-Daarud A., Swanson K.R., Hatzikirou H., Deutsch A. (2017): The biology and mathematical modelling of glioma invasion: a review. *Journal of the Royal Society Interface* **14**, 20170490.
- Alix-Panabières C., Pantel K. (2014): Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer* **14**, 623-631.
- Allen M., Bjerke M., Edlund H., Nelander S., Westermark B. (2016): Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science Translational Medicine* **8**, 354re3-354re3.
- Auvergne R.M., Sim F.J., Wang S., Chandler-Militello D., Burch J., Al Fanek Y., Davis D., Benraiss A., Walter K., Achanta P., Johnson M., Quinones-Hinojosa A., Natesan S., Ford H., Goldman S.A. (2013): Transcriptional distinctions between normal and glioma-derived A2B5⁺ progenitor cells identify a core set of genes dysregulated at all stages of gliomagenesis. *Cell Reports* **3**, 2127.
- Balss J., Meyer J., Mueller W., Korshunov A., Hartmann C., von Deimling A. (2008): Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica* **116**, 597-602.
- Banfi G., Salvagno G.L., Lippi G. (2007): The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical Chemical Laboratory Medicine* **45**, 565-576.
- Bang-Christensen S.R., Pedersen R.S., Pereira M.A., Clausen T.M., Løppke C., Sand N.T., Ahrens T.D., Jørgensen A.M., Lim Y.Ch., Goksøyr L., Choudhary S., Gustavsson T., Dagil R., Daugaard M., Sander A.F., Torp M.H., Søgaaard M., Theander T.G., Østrup O., Lassen U., Hamerlik P., Salanti A., Agerbæk M.Ø. (2019): Capture and Detection of Circulating Glioma Cells Using the Recombinant VAR2CSA Malaria Protein. *Cells* **8**, 998.
- Barra G.B., Santa Rita T.H., de Almeida Vasques, J., Chianca C.F., Nery L.F.A., Costa S.S.S. (2015): EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from *ex vivo* degradation in blood samples. *Clinical Biochemistry* **48**, 976-981.
- Berezovsky A.D., Poisson L.M., Cherba D., Webb C.P., Transou A.D., Lemke N.W., Hong X., Hasselbach L.A., Irtenkauf S.M., Mikkelsen T., deCarvalho A.C. (2014): Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* **16**, 193-206.
- Bidard F.C., Fehm T., Ignatiadis M., Smerage J.B., Alix-Panabières C., Janni W., Messina C., Paoletti C., Müller V., Hayes D.F., Piccart M., Piega J. (2013): Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer and Metastasis Reviews* **32**, 179-188.
- Bourey M., Suarez-Carmona M., Lambert J., Francart M.E., Schroeder H., Delierneux C., Skrypek N., Thompson E.W., Jérusalem G., Berx G., Thiry M., Blacher S., Holluer B.G., Noël A., Oury C., Polette M., Gilles Ch. (2016): Tissue factor induced by epithelial-mesenchymal transition triggers a procoagulant state that drives metastasis of circulating tumor cells. *Cancer Research* **76**, 4270-4282.
- Brehar F.M., Arsene D., Brinduse L.A., Gorgan M.R. (2014): Immunohistochemical analysis of GFAP-delta and nestin in cerebral astrocytomas. *Brain Tumor Pathol* **32**, 90-98.
- Brennan C.W., Verhaak R.G., McKenna A., Campos B., Noushmehr H., Salama S.R., Zheng S., Chakravarty D., Sanborn J.Z., Berman S.H., Broukhim R., Bernard B., Wu Ch., Genovese G., Shmulevich I., Barnholtz-Sloan J., Zou L., Vegesna R., Shukla S.A., Ciriello G., Yung W.K., Zhang W., Sougnez C., Mikkelsen T., Aldape K., Bigner D.D., Van Meir E.G., Prados

- M., Sloan A., Black K.L., Eschbacher J., Finocchiaro G., Friedman W., Andrews D.W. Guha A., Iacocca M., O'neil B.P., Foltz G., Myers J., Weisenberger D.J., Penny R., Kucherlapati R., Perou Ch.M., Hayes D.N., Gibbs R., Marra M., Mills G.B., Lander E., Spellman P., Wilson R., Sander Ch., Weinstein J., Meyerson M., Gabriel S., Laird P.W., Haussler D., Getz G., Chin L. (2013): The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462-477.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008): Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068.
- Carico C., Nuño M., Mukherjee D., Elramsisy A., Dantis J., Hu J., Rudnick J., Yu J.S., Black K.L., Bannykh S.I., Patil C.G. (2012): Loss of *PTEN* is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One* **7**, e33684
- Cooper L.A., Gutman D.A., Chisolm C., Appin C., Kong J., Rong Y., Kurc T., Meir E.G.V., Saltz J.H., Moreno C.S., Brat D.J. (2012): The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *The American Journal of Pathology* **180**, 2108-2119.
- Corsi L., Mescola A., Alessandrini A. (2019): Glutamate Receptors and Glioblastoma Multiforme: An Old “Route” for New Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1796.
- Costigliola N., Ding L., Burckhardt C.J., Han S.J., Gutierrez E., Mota A., Groisman A., Mitchison T.J., Danuser G. (2017): Vimentin fibers orient traction stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 5195-5200.
- Cuddapah V.A., Robel S., Watkins S., Sontheimer H. (2014): A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Reviews Neuroscience* **15**, 455.
- Cunha M.L.V.D., Maldaun M.V.C. (2019): Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *Revista da Associação Médica Brasileira* **65**, 424-433.
- CytoTrack Technology: <http://www.cytotrack.com/index.php/technology> (8. 5. 2020)
- Dang L., White D.W., Gross S., Bennett B.D., Bittinger M.A., Driggers E.M., Jang H.G., Jin S., Keenan M.C., Marks K.M., Prins R.M., Ward P.S., Yen K.E., Liao L.M., Rabinowitz J.D., Cantley L.C., Thompson C.B., Heiden M.G.V.,1, Su S.M. (2009): Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739.
- Diks A.M., Bonroy C., Teodosio C., Groenland R.J., De Mooij B., De Maertelaere E., Berkowska M.A. (2019): Impact of blood storage and sample handling on quality of high dimensional flow cytometric data in multicenter clinical research. *Journal of Immunological Methods* **475**, 112616.
- Djuzenova C.S., Fiedler V., Memmel S., Katzer A., Hartmann S., Krohne G., Zimmermann H., Scholz C.-J., Polat B., Flentje M., Sukhorukov V.L. (2015): Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in *PTEN* and p53 status. *Experimental Cell Research* **330**, 346-357.
- Dolecek T.A., Propp J.M., Stroup N.E., Kruchko C. (2012): CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-oncology* **14**, v1-v49.
- England B., Huang T., Karsy M. (2013): Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumor Biology* **34**, 2063-2074.
- Fernando M.R., Chen K., Norton S., Krzyzanowski G., Bourne D., Hunsley B., Ryan W.L., Bassett C. (2010): A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis* **30**, 418-424.
- Ferreira M.M., Ramani V.C., Jeffrey S.S. (2016): Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology* **10**, 374-394.
- Forte I.M., Indovina P., Iannuzzi C.A., Cirillo D., Di Marzo D., Barone D., Capone F., Pentimalli F., Giordano A. (2019): Targeted therapy based on p53 reactivation reduces both glioblastoma cell growth and resistance to temozolomide. *International Journal of Oncology* **54**, 2189-2199.

- Gan Z., Ding L., Burckhardt C.J., Lowery J., Zaritsky A., Sitterley K., Mota A., Costigliola N., Starker C.G., Voytas D.F., Tytell J., Goldman R.D., Danuser G. (2016): Vimentin intermediate filaments template microtubule networks to enhance persistence in cell polarity and directed migration. *Cell Systems* **3**, 252-263.
- Gay L.J., Felding-Habermann B. (2011): Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer* **11**, 123-134.
- Gogenur M., Hillig T., Gogenur I. (2017): CytoTrack Analysis Reveals Low Presence of Circulating Tumor Cells in the Perioperative Period in Patients with Non-metastatic Colorectal Cancer. *Anticancer Research* **37**, 3099-3103.
- Grillone A., Battaglini M., Moscato S., Mattii L., de Julián Fernández C., Scarpellini A., Giorgi M., Sinibaldi E., Ciofani G. (2018): Nutlin-loaded magnetic solid lipid nanoparticles for targeted glioblastoma treatment. *Nanomedicine* **14**, 727-752.
- Guo G., Gong K., Puliappadamba V.T., Panchani N., Pan E., Mukherjee B., Damanwalla Z., Bharia S., Hatanpaa K.J., Gerber D.E., Mickey B.E., Patel T.R., Sarkaria J.N., Zhao D., Burma S., Habib A.A. (2019): Efficacy of EGFR plus TNF inhibition in a preclinical model of temozolomide-resistant glioblastoma. *Neuro-Oncology* **21**, 1529-1539.
- Hatoum A., Mohammed R., Zakieh O. (2019): The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer Management and Research* **11**, 1843.
- Heo D.H., Kim S.H., Yang K.-M., Cho Y.J., Kim K.N., Yoon D.H., Kang T.-C. (2012): A histopathological diagnostic marker for human spinal astrocytoma: expression of glial fibrillary acidic protein- δ . *Journal of Neuro-Oncology* **108**, 45-52.
- Hillig T., Horn P., Nygaard A.B., Haugaard A.S., Nejlund S., Brandslund I., Sölétormos G. (2015): *In vitro* detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods. *Tumor Biology* **36**, 4597-4601.
- Hillig T., Nygaard A.B., Nekiunaite L., Klingelhöfer J., Sölétormos G. (2014): *In vitro* validation of an ultra-sensitive scanning fluorescence microscope for analysis of Circulating Tumor Cells. *Apmis* **122**, 545-551.
- Hitomi M., Deleyrolle L.P., Mulkearns-Hubert E.E., Jarrar A., Li M., Sinyuk M., Otvos B., Brunet S., Flavahan W.A., Hubert Ch.G., Goan W., Hale J.S., Alvarado A.G., Zhang A., Rohaus M., Oli M., Vedam-Mai V., Fortin J.M., Futch H.S., Griffith B., Wu Q., Xia Ch., Gong X., Ahluwalia M.S., Rich J.N., Reynolds B.A., Lathia J.D. (2015): Differential connexin function enhances self-renewal in glioblastoma. *Cell Reports* **11**, 1031-1042.
- Hookway C., Ding L., Davidson M.W., Rappoport J.Z., Danuser G., Gelfand V.I. (2015): Microtubule-dependent transport and dynamics of vimentin intermediate filaments. *Molecular Biology of The Cell* **26**, 1675-1686.
- Huang L.H., Lin P.H., Tsai K.W., Wang L.J., Huang Y.H., Kuo H.C., Li S.C. (2017): The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One* **12**.
- Chen L., Voronovich Z., Clark K., Hands I., Mannas J., Walsh M., Nikiforova M.N., Durbin E.B., Weiss H., Horbinski C. (2014): Predicting the likelihood of an isocitrate dehydrogenase 1 or 2 mutation in diagnoses of infiltrative glioma. *Neuro-oncology* **16**, 1478-1483.
- Chi A.S., Batchelor T.T., Kwak E.L., Clark J.W., Wang D.L., Wilner K.D., Louis D.N., Iafrate A.J. (2011): Rapid radiographic and clinical improvement after treatment of a MET-amplified recurrent glioblastoma with a mesenchymal-epithelial transition inhibitor. *Journal of Clinical Oncology* **30**, e30-e33.
- Chistiakov D.A., Chekhonin V.P. (2018): Circulating tumor cells and their advances to promote cancer metastasis and relapse, with focus on glioblastoma multiforme. *Experimental and Molecular Pathology* **105**, 166-174.
- Choi K.-C., Kwak S.E., Kim J.-E., Sheen S.H., Kang T.-Ch. (2009): Enhanced glial fibrillary acidic protein-delta expression in human astrocytic tumor. *Neuroscience Letters* **463**, 182-187.
- Chonan Y., Taki S., Sampetean O., Saya H., Sudo R. (2017): Endothelium-induced three-dimensional invasion of heterogeneous glioma initiating cells in a microfluidic coculture platform. *Integrative Biology* **9**, 762-773.

- Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gundersen G.A., Benveniste H., Vates G.E., Deane R., Goldman S.A., Nagelhus E.A., Nedergaard M. (2012): A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Science Translational Medicine* **4**, 147ra111-147ra111.
- Ishiwata T., Teduka K., Yamamoto T., Kawahara K., Matsuda Y., Naito Z. (2011): Neuroepithelial stem cell marker nestin regulates the migration, invasion and growth of human gliomas. *Oncology Reports* **26**, 91-99.
- Jobes D., Wolfe Y., O'Neill D., Calder J., Jones L., Sesok-Pizzini D., Zheng X.L. (2011): Toward a definition of "fresh" whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion. *Transfusion* **51**, 43-51.
- Joseph J.V., Conroy S., Tomar T., Eggens-Meijer E., Bhat K., Copray S., Boddeke E., Balasubramanyian V., Wagemakers M., den Dunnen W.F., Kruyt F.A.E. (2014): TGF- β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death & Disease* **5**, e1443-e1443.
- Jovčevska I. (2019): Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* **19**, 116.
- Jung H.Y., Fattet L., Yang J. (2015): Molecular pathways: linking tumor microenvironment to epithelial-mesenchymal transition in metastasis. *Clinical Cancer Research* **21**, 962-968.
- Kahlert U.D., Nikkhah G., Maciaczyk J. (2013): Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Letters* **331**, 131-138.
- Kamlage B., Neuber S., Bethan B., González Maldonado S., Wagner-Golbs A., Peter E., Schatz P. (2018): Impact of prolonged blood incubation and extended serum storage at room temperature on the human serum metabolome. *Metabolites* **8**, 6.
- Kamphuis W., Middeldorp J., Kooijman L., Sluijs J.A., Kooi E.J., Moeton M., Freriks M., Mizee M.R., Hol E.M. (2014): Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **35**, 492-510.
- Kang Q., Henry N.L., Paoletti C., Jiang H., Vats P., Chinnaiyan A.M., Hayes D.F., Merajver S.D., Rae J.M., Tewari M. (2016): Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clinical Biochemistry* **49**, 1354-1360.
- Karim R., Palazzo C., Evrard B., Piel G. (2016): Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: current state-of-the-art. *Journal of Controlled Release* **227**, 23-37.
- Karnati H.K., Panigrahi M., Shaik N.A., Greig N.H., Bagadi S.A.R., Kamal M., Kapalavayi N. (2014): Down regulated expression of Claudin-1 and Claudin-5 and up regulation of β -catenin: association with human glioma progression. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* **13**, 1413-1426.
- Kastenhuber E.R., Lowe S.W. (2017): Putting p53 in context. *Cell* **170**, 1062-1078.
- Kaufhold S., Bonavida B. (2014): Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **33**, 62.
- Klump L., Sezgin E.C., Skardelly M., Eckert F., Huber S.M. (2018): KCa3. 1 channels and glioblastoma: in vitro studies. *Current Neuropharmacology* **16**, 627-635.
- Koolman J., ROEHM K.H. (2005): *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd ed., Thieme, Marburg, Německo, 467 stran.
- Kopp H.G., Placke T., Salih H.R. (2009): Platelet-derived transforming growth factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Research* **69**, 7775-7783.
- Koul D. (2008): *PTEN* signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy* **7**, 1321-1325.
- Krol I., Castro-Giner F., Maurer M., Gkountela S., Szczerba B.M., Scherrer R., Coleman N., Carreira S., Bachman F., Anderson S., Engelhardt M., Lane H., Evans T.R.J., Plummer R., Kristeleit R., Lopez J., Aceto N. (2018): Detection of circulating tumour cell clusters in human glioblastoma. *British Journal of Cancer* **119**, 487-491.

- Kwak Y., Kim S.I., Park C.K., Paek S.H., Lee S.T., Park S.H. (2015): C-MET overexpression and amplification in gliomas. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **8**, 14932.
- Llaguno S. R.A., Wang Z., Sun D., Chen J., Xu J., Kim E., Hatanpaa K.J., Raisanen J.M., Burns D.K., Johnson J.E., Parada L.F. (2015): Adult lineage-restricted CNS progenitors specify distinct glioblastoma subtypes. *Cancer Cell* **28**, 429-440.
- Lo Dico A., Martelli C., Diceglie C., Lucignani G., Ottobrini L. (2018): Hypoxia-inducible factor-1 α activity as a switch for glioblastoma responsiveness to temozolomide. *Frontiers in Oncology* **8**, 249.
- Lombard A., Goffart N., Rogister B. (2015): Glioblastoma Circulating Cells: Reality, Trap or Illusion? *Stem Cells International*, 182985.
- Louveau A., Plog B.A., Antila S., Alitalo K., Nedergaard M., Kipnis J. (2017): Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *The Journal of Clinical Investigation*. **127**, 3210-3219.
- Lu C., Ward P.S., Kapoor G.S., Rohle D., Turcan S., Abdel-Wahab O., Edwards Ch.R., Khanin R., Figueroa M.E., Melnick A., Wellen K.E., O'Rourke D.M., Berger S.L., Chan T.A., Levine R.S., Mellinghoff I.K., Thompson C.B. (2012): IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* **483**, 474-478.
- Lun M., Lok E., Gautam S., Wu E., Wong E.T. (2011): The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* **105**, 261-273.
- MacArthur K.M., Kao G.D., Chandrasekaran S., Alonso-Basanta M., Chapman C., Lustig R.A., Wileyto E.P., Hahn M., Dorsey J.F. (2014): Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Research* **74**, 2152-2159.
- Mahabir R., Tanino M., Elmansuri A., Wang L., Kimura T., Itoh T., Ohba Y., Nishihara H., Shirato H., Tsuda M., Tanaka S. (2013): Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-Oncology* **16**, 671-685.
- Makhro A., Huisjes R., Verhagen L.P., Manu-Pereira M.D.M., Llaudet-Planas E., Petkova-Kirova P., Wang J., Eichler H., Bogdanova A., Kaestner L., Vives-Corrons J.L. (2016): Red cell properties after different modes of blood transportation. *Frontiers in Physiology* **7**, 288.
- Malacrida S., Giannella A., Ceolotto G., Reggiani C., Vezzoli A., Mrakic-Spota S., Moretti S., Turner R., Falla M., Brugger H., Strapazon G. (2019): Transcription Factors Regulation in Human Peripheral White Blood Cells during Hypobaric Hypoxia Exposure: an in-vivo experimental study. *Scientific Reports* **9**, 1-13.
- Malara N., Donato, G. (2018): Blood-Brain Barrier Breakdown by Combined Detection of Circulating Tumor and Endothelial Cells in Liquid Biopsy. *Liquid Biopsy*
- Malzkorn B., Reifenberger G. (2016): Practical implications of integrated glioma classification according to the World Health Organization classification of tumors of the central nervous system 2016. *Current Opinion in Oncology* **28**, 494-501.
- Manini I., Caponnetto F., Bartolini A., Ius T., Mariuzzi L., Di Loreto C., Beltrami A.P., Cesselli D. (2018): Role of microenvironment in glioma invasion: what we learned from in vitro models. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 147.
- Massagué J. (2012): TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 616-630.
- McCrea P.D., Gottardi C.J. (2016): Beyond β -catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 55.
- Mehta S., Cascio C.L. (2018): Developmentally regulated signaling pathways in glioma invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 385-402.
- Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Gray J.W., Thompson C.B. (2014): *The Molecular Basis of Cancer*. 3rd ed., Elsevier, Filadelfie, 757 stran.
- Mendez M.G., Kojima S.I., Goldman R.D. (2010): Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *The FASEB Journal* **24**, 1838-1851.

- Middeldorp J., Hol E.M. (2011): GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* **93**, 421-443.
- Mikheeva S.A., Mikheev A.M., Petit A., Beyer R., Oxford R.G., Khorasani L., Khorasani L., Maxwell J.-P., Glackin C.A., Wakimoto H., González-Herrero I., Sánchez-García I., Silber J.R., Horner P.J., Rostomily R.C. (2010): TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Molecular Cancer* **9**, 194.
- Moeton M., Stassen O.M., Sluijs J.A., van der Meer V.W., Kluivers L.J., van Hoorn H., Schmidt T., Reits E.A.J., van Strien M.E., Hol E.M. (2016). GFAP isoforms control intermediate filament network dynamics, cell morphology, and focal adhesions. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 4101-4120.
- Mohammadhoseini E., Safavi E., Seifi S., Seifirad S., Firoozbakhsh S., Peiman S. (2015): Effect of sample storage temperature and time delay on blood gases, bicarbonate and pH in human arterial blood samples. *Iranian Red Crescent Medical Journal* **17**, e13577.
- Montana V., Sontheimer H. (2011): Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. *Journal of Neuroscience* **31**, 4858-4867.
- Mueller O., Lightfoot S., Schroeder A. (2004): RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control. *Agilent Application Note* **1**, 1-8.
- Müller C., Holtschmidt J., Auer M., Heitzer E., Lamszus K., Schulte A., Matschke J., Langer-Freitag s., Gasch Ch., Stoupiet M., Mauermann O., Peine S., Hlatzel M., Speicher M.R., Westphal M., Pantel K., Riethdorf S. (2014): Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Science Translational Medicine* **6**, 247ra101-247ra101.
- Myung J.K., Choi S.A., Kim S.K., Wang K.C., Park S.H. (2014): Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **7**, 1977.
- Narasimhaiah D., Miquel C., Verhamme E., Desclée P., Cosnard G., Godfraind C. (2012): IDH1 mutation, a genetic alteration associated with adult gliomatosis cerebri. *Neuropathology* **32**, 30-37.
- Ohgaki H, Kleihues P. (2009): Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science* **100**, 2235–2241.
- Ohgaki H., Kleihues P. (2013): The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research* **19**, 764-772.
- Ostrom Q.T., Gittleman H., Fulop J., Liu M., Blanda R., Kromer C., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. (2015): CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology* **17**, iv1–iv62.
- Payne L.S., Huang P.H. (2013): The pathobiology of collagens in glioma. *Molecular Cancer Research* **11**, 1129-1140.
- Peng M.D., Wen S.F., Gibbon T., Middeldorp J., Sluijs J., Hol E.M., Quinlan R.A. (2008): Glial fibrillary acidic protein filaments can tolerate the incorporation of assembly-compromised GFAP- δ , but with consequences for filament organization and α B-crystallin association. *Molecular Biology of The Cell* **19**, 4521-4533.
- Philips A., Henshaw D.L., Lamburn G., O'Carroll M.J. (2018): Brain tumours: rise in Glioblastoma Multiforme incidence in England 1995–2015 suggests an adverse environmental or lifestyle factor. *Journal of Environmental and Public Health*, 7910754.
- Prabhakaran N., Miller D.C., Litofsky N.S., Frazier S.R. (2019): Extraneural Metastasis of Primary Glioma Occurring in a Setting of Occupational Ionizing Radiation Exposure. *Case Reports in Neurological Medicine*, 1748739.
- Qi S., Song Y., Peng Y., Wang H., Long H., Yu X., Li Z., Fang L., Wu A., Luo W., Zhen Y., Zhou Y., Chen Y., Mai Ch., Zhen Y., Fang W. (2012): ZEB2 mediates multiple pathways regulating cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis in glioma. *PLoS One* **7**, e38842.
- Quail D.F., Joyce J.A. (2017). The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell* **31**, 326-341.
- Rahmawati D., Marhaendraputro E.A., Kurniawan S.N., Wirathmawati A. (2019): Extracranial metastasis of glioblastoma: a rare case. *Malang Neurology Journal* **5**, 51-54.

- Ramalho-Carvalho J., Pires M., Lisboa S., Graça I., Rocha P., Barros-Silva J.D., Savva-Bordalo J., Mauricio J., Resende M., Teixeira M.R., Honavar M., Henrique R., Jerónimo C. (2013): Altered expression of *MGMT* in high-grade gliomas results from the combined effect of epigenetic and genetic aberrations. *PLoS One* **8**, e58206.
- Ray A., Manjila S., Hdeib A.M., Radhakrishnan A., Nock C.J., Cohen M.L., Sloan A.E. (2015): Extracranial metastasis of glioblastoma: Three illustrative cases and current review of the molecular pathology and management strategies. *Molecular and Clinical Oncology* **3**, 479-486.
- Riethdorf S., Fritsche H., Müller V., Rau T., Schindlbeck C., Rack B., Janni W., Coith C., Beck K., Jänicke F., Jackson S., Gornet T., Cristofanilli M., Pantel K. (2007): Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical Cancer Research* **13**, 920-928.
- Rosen J., Blau T., Grau S.J., Barbe M.T., Fink G.R., Galldiks N. (2018): Extracranial metastases of a cerebral glioblastoma: a case report and review of the literature. *Case Reports in Oncology* **11**, 591-600.
- Sevenich L., Bowman R.L., Mason S.D., Quail D.F., Rapaport F., Elie B.T., Massagué J. (2014): Analysis of tumour-and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nature Cell Biology* **16**, 876.
- Shajani-Yi Z., de Abreu F.B., Peterson J.D., Tsongalis G.J. (2018): Frequency of Somatic *TP53* Mutations in Combination with Known Pathogenic Mutations in Colon Adenocarcinoma, Non-Small Cell Lung Carcinoma, and Gliomas as Identified by Next-Generation Sequencing. *Neoplasia* **20**, 256-262.
- Shih A.H., Levine R.L. (2012): IDH1 mutations disrupt blood, brain, and barriers. *Cancer Cell* **22**, 285-287.
- Siebzehnubl F.A., Silver D.J., Tugertimur B., Deleyrolle L.P., Siebzehnubl D., Sarkisian M.R., Devers K.G., Yachnis A.T., Kupper M.D., Neal D., Nabils N.H., Kladdé M.P., Suslov O., Brabletz S., Brabletz T., Reynolds B.A., Steindler D.A. (2013): The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Molecular Medicine* **5**, 1196-1212.
- Srividya M.R., Thota B., Shailaja B.C., Arivazhagan A., Thennarasu K., Chandramouli B.A., Hegde A.S., Santosh V. (2011): Homozygous 10q23/*PTEN* deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology* **31**, 376-383.
- Stamatovic S.M., Johnson A.M., Keep R.F., Andjelkovic A.V. (2016): Junctional proteins of the blood-brain barrier: new insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers* **4**, e1154641.
- Stassen O.M., van Bodegraven E.J., Giuliani F., Moeton M., Kanski R., Sluijs J.A., van Strien M.E., Kamphuis W., Robe P.A.J., Hol E.M. (2017): GFAP δ /GFAP α ratio directs astrocytoma gene expression towards a more malignant profile. *Oncotarget* **8**, 88104.
- Sullivan J.P., Nahed B.V., Madden M.W., Oliveira S.M., Springer S., Bhere D., Chi A.S., Wakimoto H., Rothernberg S.M., Sequist L.V., Kapur R., Shah K., Iafrate J., Curry W.T., Loeffler J.S., Batchelor T.T., Louis D.N., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. (2014): Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discovery* **4**, 1299-1309.
- Suzuki K., Kawataki T., Endo K., Miyazawa K., Kinouchi H., Saitoh M. (2018): Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade. *Oncology Letters* **16**, 1758-1764.
- Talasila K.M., Soentgerath A., Euskirchen P., Rosland G.V., Wang J., Huszthy P.C., Prestegarden L., Skaftnesmo K.O., Sakariassen P.Ø., Eskilsson E., Stieber D., Keunen O., Brekka N., Moen I., Nigro J.M., Vintermyr O.K., Lund-Johansen M., Niclou S., Mørk S.J., Enger P. Ø., Bjerkvig R., Miletic H. (2013): EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathologica* **125**, 683-698.
- Tanaka F., Yoneda K., Hasegawa S. (2010): Circulating tumor cells (CTCs) in lung cancer: current status and future perspectives. *Lung Cancer: Targets and Therapy* **1**, 77-84.

- Tormoen G.W., Haley K., Levine R., McCarty O. (2012): Do circulating tumor cells play a role in coagulation and thrombosis?. *Frontiers in Oncology* **2**, 115.
- van Bodegraven E.J., van Asperen J.V., Robe P.A., Hol E.M. (2019): Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. *Glia* **67**, 1417-1433.
- van Den Berge S.A., Middeldorp J., Zhang C.E., Curtis M.A., Leonard B.W., Mastroeni D., Voorn P., van De Berg W., Huitinga I., Hol E.M. (2010): Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP- δ . *Aging Cell* **9**, 313-326.
- Velpula K.K., Dasari V.R., Tsung A.J., Dinh D.H., Rao J.S. (2011): Cord blood stem cells revert glioma stem cell EMT by down regulating transcriptional activation of Sox2 and Twist1. *Oncotarget* **2**, 1028.
- Villa C., Miquel C., Mosses D., Bernier M., Di Stefano A.L. (2018): The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. *La Presse Médicale* **47**, e187-e200.
- Virtakoivu R., Mai A., Mattila E., De Franceschi N., Imanishi S.Y., Corthals G., Kaukonen R., Saari M., Cheng F., Torvaldson E., Kosma V.-M., Mannermaa A., Muharram G., Gilles Ch., Eriksson J., Soini Y., Lorens J.B., Ivaska J.(2015): Vimentin–ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. *Cancer Research* **75**, 2349-2362.
- Wade M., Li Y.C., Wahl G.M. (2013): MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **13**, 83.
- Wang H., Fang R., Wang X.F., Zhang F., Chen D.Y., Zhou B., Wang S., Cai S.-H., Du J. (2013): Stabilization of Snail through AKT/GSK-3 β signaling pathway is required for TNF- α -induced epithelial–mesenchymal transition in prostate cancer PC3 cells. *European Journal of Pharmacology* **714**, 48-55.
- Watkins S., Robel S., Kimbrough I.F., Robert S.M., Ellis-Davies G., Sontheimer H. (2014): Disruption of astrocyte–vascular coupling and the blood–brain barrier by invading glioma cells. *Nature Communications* **5**, 4196.
- Weller M., Wick W., von Deimling A. (2011): Isocitrate dehydrogenase mutations: a challenge to traditional views on the genesis and malignant progression of gliomas. *Glia* **59**, 1200-1204.
- Wong D., Moturi S., Angkachatchai V., Mueller R., DeSantis G., van den Boom D., Ehrich M. (2013): Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clinical Biochemistry* **46**, 1099-1104.
- Xie Q., Mittal S., Berens M.E. (2014): Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro-Oncology* **16**, 1575-1584.
- Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., Friedman H., Friedman A., Reardon D., Herndon J., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B., Bigner D.D. (2009): IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England Journal of Medicine* **360**, 765-773.
- Yang H.W., Menon L.G., Black P.M., Carroll R.S., Johnson M.D. (2010): SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer* **10**, 301.
- Yu H., Zhang L., Liu P. (2015): CXCR7 signaling induced epithelial–mesenchymal transition by AKT and ERK pathways in epithelial ovarian carcinomas. *Tumor Biology* **36**, 1679-1683.
- Yu Q., Xue Y., Liu J., Xi Z., Li Z., Liu Y. (2018): Fibronectin promotes the malignancy of glioma stem-like cells via modulation of cell adhesion, differentiation, proliferation and chemoresistance. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**, 130.
- Zarkoob H., Taube J.H., Singh S.K., Mani S.A., Kohandel M. (2013): Investigating the link between molecular subtypes of glioblastoma, epithelial-mesenchymal transition, and CD133 cell surface protein. *PloS One* **8**, e64169.
- Zhang C., Moore L.M., Li X., Yung W.A., Zhang W. (2013): IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro-Oncology* **15**, 1114-1126.
- Zhang W., Chen H., Lv S., Yang H. (2016): High CD133 expression is associated with worse prognosis in patients with glioblastoma. *Molecular Neurobiology* **53**, 2354-2360.

- Zhang Z., Tang H., Wang Z., Zhang B., Liu W., Lu H., Xiao L., Liu X., Wang R., Li X., Wu M., Li G. (2011): Mir-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma. *Molecular Cancer* **10**,124.
- Zhao J., Zhang L., Dong X., Liu L., Huo L., Chen H. (2018): High expression of vimentin is associated with progression and a poor outcome in glioblastoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **26**, 337-344.
- Zheng Y., McFarland B.C., Drygin D., Yu H., Bellis S.L., Kim H., Bredel M., Benveniste E.N. (2013): Targeting protein kinase CK2 suppresses prosurvival signaling pathways and growth of glioblastoma. *Clinical Cancer Research* **19**, 6484-6494.
- Zhu Y., Yang P., Wang Q., Hu J., Xue J., Li G., Zhang G., Li X., Zhou Ch., Zhao, M., Wang D. (2013): The Effect of CXCR4 Silencing on Epithelial-Mesenchymal Transition Related Genes in Glioma U87 Cells. *The Anatomical Record* **296**, 1850-1856.
- Zinn P.O., Singh S.K., Kotrotsou A., Abrol S., Thomas G., Mosley J., Elakkad A., Hassan I., Kumar A., Colen R.R. (2017): Distinct radiomic phenotypes define glioblastoma *TP53-PTEN-EGFR* mutational landscape. *Neurosurgery* **64**, 203-210.

8 Seznam použitých symbolů a zkratek

ABCB1 - ATP-dependentní ATP-binding cassette transportér 1
ADAMs - povrchové a sekretované proteasy (z anglického termínu „a disintegrin and metalloprotease“)
AMPA receptor - receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny
AMPA receptory - receptory α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny
ASIC1 - iontový kanál pro detekci kyseliny 1
BSA - Hovězí sérový albumin (z anglického termínu „bovine serum albumin“)
CDK – cyklin-dependentní kinasy
cfDNA – volná DNA (z anglického termínu „cell-free DNA“)
CNS – centrální nervová soustava
CpG ostrůvky - cytosin-fosfát-guaninové ostrůvky
CTCs - circulating tumor cells
ctDNA - cirkulující tumorová DNA
DAPI - 6-diamidino-2-fenylindol
DEPC – diethylpyrokarbonát
DMEM médium- Dulbecco's modified eagle medium
ECMs - extrakraniální metastázy (z anglického termínu „Extracranial metastases“)
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF - epidermální růstový faktor (z anglického termínu „epidermal growth factor“)
EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru (z anglického termínu „epidermal growth factor receptor“)
EMT - epiteliálně-mezenchymální tranzice (z anglického termínu „epithelial to mesenchymal transtition“)
GBM – glioblastoma multiforme
GFAP - gliální fibrilární acidický protein
GSCs, - glioblastomové kmenové buňky (z anglického termínu „glioma stem-like cells“)
GSK3 β – glykogensyntasová kinasa-3 β
HIF1 - transkripční faktor indukovaný hypoxií (z anglického termínu „hypoxia-induced factor“)
IDH – isocitrátdehydrogenasa
IF - intermediární filamentum
JAMs - spojivé adhezivní molekuly (z anglického termínu „junctional adhesion molecule“)
MMP - Zn²⁺-dependentní metaloproteasy (z anglického termínu „matrix metalloproteinase“)
NK lymfocyty - natural killers lymfocyty
NKB - nervové kmenové buňky
NKCC1 - Na⁺-K⁺-Cl⁻- kotransportér 1
PBS – fosfátem pufovaný solný roztok (z anglického termínu „phosphate buffered saline,“
PDGF - destičkový růstový faktor (z anglického termínu „platelet-derived growth factor“)
PDGFR - receptor destičkového růstového faktoru (z anglického termínu „platelet-derived growth factor receptor“)
PTEN - fosfatasový a tenzinový homolog
RB protein – retinoblastomový protein

RIN - hodnota integrity RNA (z anglického termínu „RNA Integrity Number“)

RTK – receptorové tyrosinkinasy

uPa - Aktivátor plasminogenu typu urokinasy (z anglického termínu „urokinase-type plasminogen activator receptor“)

VEGF - vaskulární endotelový růstový faktor (z anglického termínu „vascular endothelial growth factor“)

WHO - World Health Organization