

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



Mgr. Veronika Mikulová

Laboratorní diagnostika mikrometastáz u pacientek s karcinomem prsu

Detekce a molekulární charakterizace cirkulujících nádorových buněk pomocí imunomagnetické separace v kombinaci s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí.

Laboratory diagnostics of micrometastases in breast cancer patients

Detection and molecular characterization of circulating tumor cells based on combination of immunomagnetic separation with quantitative polymerase chain reaction.

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA

Školitel konzultant: doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28. června 2016

Veronika Mikulová

Podpis

Identifikační záznam:

MIKULOVÁ, Veronika. *Laboratorní diagnostika mikrometastáz u pacientek s karcinomem prsu: Detekce a molekulární charakterizace cirkulujících nádorových buněk pomocí imunomagnetická separace kombinované s kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí.* [Laboratory diagnostics of micrometastases in breast cancer patients: Detection and molecular characterization of circulating tumor cells based on combination of immunomagnetic separation with quantitative polymerase chain reaction.]. Praha, 2016 106 s., 2 přílohy. Dizertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Zima, Tomáš.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala za trpělivost, vstřícnost a inspirující odborné vedení svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc. MBA.

Spolupracovníkům z Laboratoře klinické imunologie a alergologie, ÚLBLD VFN, Ing. Markétě Jančíkové bych ráda poděkovala za příjemnou spolupráci a pomoc při grafické úpravě publikací a posterů, MUDr. Karin Malíčkové a RNDr. Ivaně Janatkové za vytvoření velmi příjemných pracovní podmínek pro vznik této práce a pomoc při statistickém zpracování dat.

Velké poděkování patří paní doc. MUDr. Petře Tesařové, CSc. a MUDr. Michaele Čabiňakové, PhD. za odpornou spolupráci, přátelský přístup a podporu v rámci Onkologické kliniky VFN.

Mé poděkování patří i Mgr. Kataríně Kološtové, PhD., které mne svým pracovním nasazením a zapálením pro výzkum inspirovala v mé práci a pomohla mi v mých výzkumných začátcích.

V neposlední řadě děkuji mému manželovi, synovi a celé milující rodině za neskutečnou podporu, trpělivost a čas, který mi věnovali pro mou vědeckou práci.

Tato práce vznikla za podpory grantového projektu GA UK č. 7709, RVO-VFN 64165/2012 a SVV 266515.

ABSTRAKT

Úvod: Přítomnost cirkulujících nádorových buněk (CTC) v periferní krvi je asociována s horší prognózou a časným relapsem u pacientek s karcinomem prsu. Stanovení přítomnosti CTC v periferní krvi je nyní považováno za tzv. tekutou biopsii. Cílem této práce bylo stanovení přítomnosti CTC a jejich molekulární charakterizace s potenciálním využitím nejen jako nový biomarker pro sledování účinnosti systémové terapie ale také jako vhodný nástroj pro stratifikaci pacientek a následnou individualizaci léčby karcinomu prsu.

Metody: Do prospektivní studie bylo zařazeno 54 pacientek s časným karcinomem prsu. Opakovaně jsme odebírali 10ml periferní krve pro stanovení přítomnosti a charakterizaci CTC v průběhu léčby. Izolace a detekce CTC byla provedena za použití AdnaTest BreastCancer™ kitu (AdnaGen AG, Německo) využívající kombinaci imunomagnetické separace s multiplex PCR pro stanovení transkriptů epiteliálních a tumor-asociovaných genů (EpCAM, MUC1 a HER2) v lyzátu CTC. Následně byla cDNA z izolovaných CTC použita pro analýzu genových expresí TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktin pomocí nově navržených a optimalizovaných esejí pomocí kvantitativní PCR (qPCR). Výsledky qPCR byly analyzovány pomocí softwaru Genex (MultiD Analysis).

Výsledky: Celkem jsme vyšetřily 195 vzorků periferní krve. Přítomnost CTC byla prokázána u 31 % pacientek před zahájením léčby. Pouze u 10% pacientek jsme zjistili CTC pozitivitu po ukončení léčby. Úspěšně jsme navrhli a optimalizovali qPCR eseje pro TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktin. Získaná data poukázala na značnou rozdílnost v expresních profilech CTC pro všechny sledované geny. Nejvíce exprimovaným genem v CTC byl MUC1 (70%), HER2 (52%) a EpCAM (35%). Ostatní geny byly detekovány v méně jak 20%. Porovnáním HER2 stavu mezi primárním nádorem a CTC jsme zjistili diskrepanci u 20% pacientek. Na základě statistického vyhodnocení jsme nezjistili významnou korelaci mezi CTC a klinicko-patologickými charakteristikami primárního nádoru u jednotlivých pacientek.

Závěr: Pomocí našeho metodického přístupu je možné detekovat a charakterizovat CTC v periferní krvi pacientek s karcinomem prsu. Informace získané na základě průkazu CTC a jejich expresních profilů mohou napomoci v klinické praxi jako podpora pro individualizaci léčby.

KLÍČOVÁ SLOVA: cirkulující nádorové buňky; karcinom prsu; kvantitativní polymerázová řetězová reakce; imunomagnetická separace; genová exprese; charakterizace.

ABSTRACT

Introduction: The presence of circulating tumor cells (CTC) in the peripheral blood has been associated with worse prognosis and early relapse in breast cancer patients. CTC determination in the peripheral blood has been considered as a liquid biopsy. The aim of this project was to analyze the presence of CTC followed by their molecular characterization with the potential use not only as a new biomarker for real-time monitoring of therapy efficacy but also as a suitable tool for patient's stratification and individualization of treatment for breast cancer.

Methods: A total of 54 patients with diagnosed early breast cancer were enrolled into a prospective study. Ten millilitres of peripheral blood were sequentially collected to test for the presence and characterization of CTC during the follow-up of patients. CTC isolation and detection was performed by AdnaTest BreastCancer™ (AdnaGen AG, Germany), which is based on the detection of EpCAM, HER2 and MUC1 specific transcripts in enriched CTC-lysates. cDNA from isolated CTC has been further used for newly optimized qPCR assays for breast tumor and therapy resistance associated genes: TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 and reference gene actin. qPCR results have been analyzed by Genex software (MultiD Analysis).

Results: 195 blood samples have been analyzed in total. We detected CTC before therapy initiation in 31 % of patients. Only 10 % of patients remained CTC positive after the completion of therapy. We have successfully designed and optimized qPCR assays for genes TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 and reference gene actin. Our data indicated noticeable heterogeneity of expression profile of detected CTC for all studied genes. The most expressed gene in CTC was MUC1 (70%), HER2 (52%) and EpCAM (35%). For others genes the detection rate was lower than 20%. HER2 status comparison between the primary tumor and CTC shown mismatch in 20% of patients. We found no significant correlation between CTC and individual clinico-pathologic characteristic of the primary tumor.

Conclusions: We have confirmed practicability of our methodological approaches for the detection and characterization of CTC in the peripheral blood of breast cancer patients. Information based on the CTC presence and expression profiles could provide clinicians additional support for therapy management.

KEY WORDS: circulating tumor cells; breast cancer; quantitative; polymerase chain reaction; immunomagnetic separation; gene expression; characterization; detection.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
1 ÚVOD	12
1.1 KARCINOM PRSU	12
1.1.1 Epidemiologie karcinomu prsu u žen v České republice	12
1.2 Etiopatogeneze karcinomu prsu.....	14
1.2.1 Klinické projevy karcinomu prsu	17
1.2.2 Diagnostika karcinomu prsu.....	17
1.2.3 Léčba karcinomu prsu	19
1.3 Cirkulující nádorové buňky	21
1.3.1 Historie cirkulujících nádorových buněk	21
1.3.2 Biologie cirkulujících nádorových buněk	21
1.3.3 Osud cirkulujících nádorových buněk v metastatickém procesu	22
1.3.4 Molekulární charakteristika CTC.....	28
1.3.5 Izolační a detekční systémy CTC.....	31
1.4 Klinické využití cirkulujících nádorových buněk	38
1.4.1 Cirkulující nádorové buňky u nádorových onemocnění	38
1.4.2 Klinický význam CTC u pacientek s karcinomem prsu.....	40
1.4.3 Potenciál cirkulujících nádorových buněk v budoucnosti.....	42
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	44
2 MATERIÁL A METODIKA	47
2.1 Kritéria pro zařazení pacientek do studie	47
2.2 Charakteristika pacientek zařazených do studie	47
2.3 Schéma odběru vzorků periferní krve	50
2.4 Stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi	51
2.4.1 Separace cirkulujících nádorových buněk.....	51
2.4.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk	51
2.5 Porovnání exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL a KRT 19 mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a mononukleárními buňkami periferní krve	54
2.5.1 Izolace mononukleárních buněk periferní krve.....	54
2.5.2 Izolace celkové RNA z mononukleárních buněk periferní krve	54
2.5.3 Kontrola kvality RNA	55
2.5.4 Reverzní transkripce.....	55
2.5.5 Analýza exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT 19	55
2.5.6 Statistická analýza dat	57
3 VÝSLEDKY	58

3.1	Validace a ověření výtěžnosti AdnaTestu	58
3.2	Stanovení přítomnosti CTC před zahájením a v průběhu léčby	61
3.3	Vybrané kazuistiky pacientek.....	71
3.3.1	Kazuistika I	71
3.3.2	Kazuistika II	72
3.3.3	Kazuistika III.....	73
3.3.4	Kazuistika IV.....	74
3.4	Sledování heterogenity CTC pomocí analýzy genové exprese vybraných nádorově specifických genů.....	76
3.4.1	Stanovení koncentrace a kvality celkové RNA získané z PBMC.....	76
3.4.2	Optimalizace qPCR analýzy pro sledované geny	77
3.4.3	Porovnání a výběr vhodných reagensů pro provedení RT qPCR	85
3.4.4	Rozdíl exprese TOP1, TOP2A, CTSD, KRT 19, ST6GAL mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a mononukleárními buňkami periferní krve	86
3.4.5	Expresí genu TOP1, TOP2A, CTSD, KRT 19, ST6GAL v cirkulujících nádorových buňkách ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám primárního nádoru 87	
4	DISKUSE.....	91
5	ZÁVĚR.....	95
6	SEZNAM PŘÍLOH	98
7	SEZNAM PUBLIKACÍ.....	98
8	PŘEHLED AKTIVNÍ ÚČASTI NA KONGRESECH A KONFERENCÍCH	99
9	VÝZKUMNÉ PROJEKTY	100
10	POUŽITÁ LITERATURA.....	102

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BRMS1	breast cancer metastasis suppressor 1
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CEA	karcinoembryonální antigen
CEpCs	cirkulující epiteliální nádorové buňky
CMF	Cyklofosfamid
CSC	nádorové kmenové buňky
CST6	cystatin M
CT	počítačová tomografie
CTC	cirkulující nádorové buňky
DCIS	duktální karcinom in situ
DEP	Dielektróforéza
DFS	celkové bezpříznakové přežití
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTC	diseminované nádorové buňky
ECM	extracelulární matrix
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
EMT	epiteliální-mesenchymální tranzice
EpCAM	epiteliální buněčná adhezivní molekula
EPISPOT	Epithelial immunospot
ER	estrogenový receptor
G	grade
HER2	epidermální růstový faktor 2
ICC	Imunocytochemie
IDC	invazivní ductální karcinom
IGF	insulinový růstový faktor
IGF-IR	receptor pro insulinový růstový faktor
LCIS	lobulární karcinom in situ
LSC	laserová skenovací cytometrie
MET	mesenchymální-epiteliální tranzice
MFS	přežití bez metastazování
MMP	matrixové metalloproteinázy
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
NGS	Next Generation Sequencing
OS	celkové přežití
PBMC	mononukleární buňky periferní krve
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	pozitronová počítačová tomografie
PK	periferní krev
pMOFF	mikrofluidní průtokové frakcionační zařízení
PR	progesteronový receptor
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
tRNA	celková ribonukleová kyselina
uPA	urokinázový aktivátor plasminogenu

uPAR receptor urokinázového aktivátoru plasminogenu
VEGF vaskulární endoteliální růstový faktor
ZN zhoubný nádor

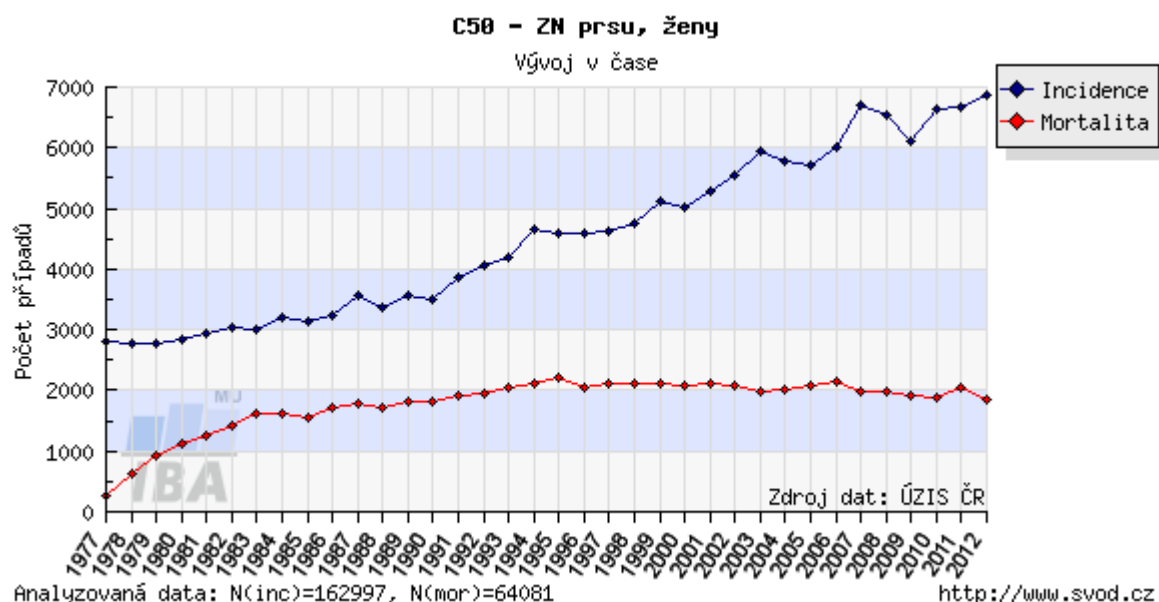
1 ÚVOD

1.1 KARCINOM PRSU

1.1.1 Epidemiologie karcinomu prsu u žen v České republice

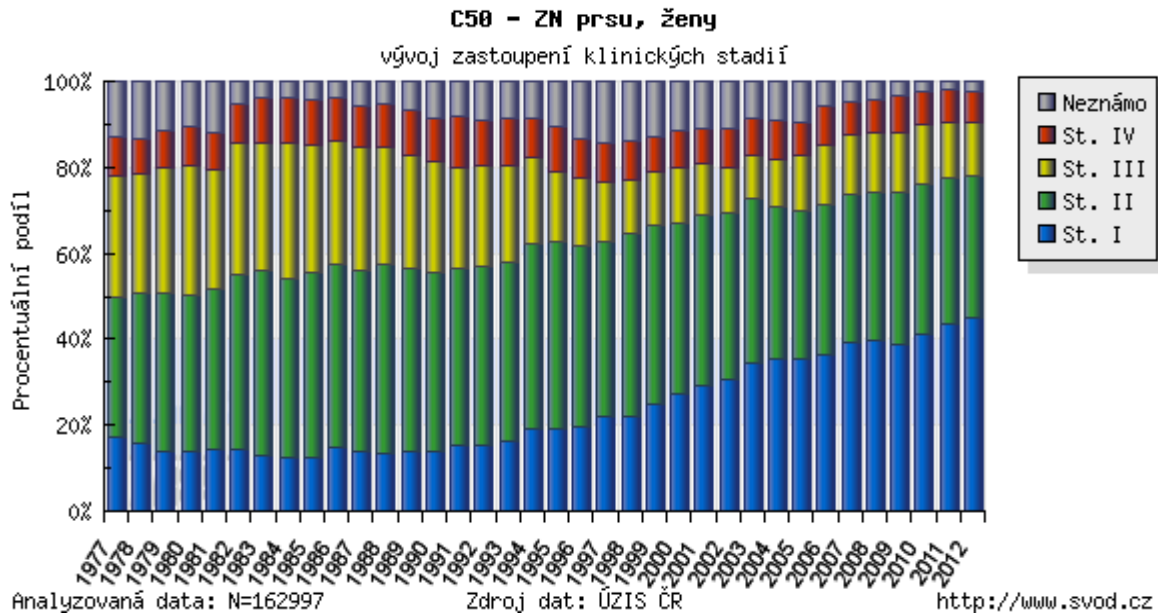
Nádorová onemocnění představují závažný zdravotní problém současné české populace. Karcinom prsu patří po „jiném zhoubném novotvaru kůže“ (dg. C44) k nejčastějším zhoubným nádorům u žen. Z nově diagnostikovaných novotvarů v ženské populaci představoval v letech 2005 – 2009 více než 24%. Incidence nádorů prsu v tomto období měla setrvale rostoucí trend, od roku 2007 však došlo ke stagnaci a mírnému poklesu. Z Obr. 1 je patrné, že od roku 2010 opět dochází k mírnému nárůstu případů s karcinomem prsu (1).

V roce 2011 byl karcinom prsu u žen nečastějším hlášeným novotvarem. Celkový počet nově diagnostikovaných pacientek s tímto onemocněním byl v počtu 6 620 případů, což v přepočtu na 100 tisíc žen představovalo 123,9 případů. Oproti roku 2010 došlo k nárůstu o 0,5% případů. Karcinom prsu představoval 16,2% ze všech hlášených zhoubných nádorů a novotvarů *in situ* u žen. Ve stejném roce zemřelo na tuto diagnózu 1655 pacientek. Incidence karcinomu prsu je v posledních letech ovlivněna celostátním screeningovým programem, který byl zahájen v září roku 2002. Toto je patrné v incidenční křivce, kde se objevují dva výrazné vrcholy ovlivněné právě zavedením plošného screeningového programu, díky kterému je možné včas zachytit nižších stádia tohoto onemocnění (2).



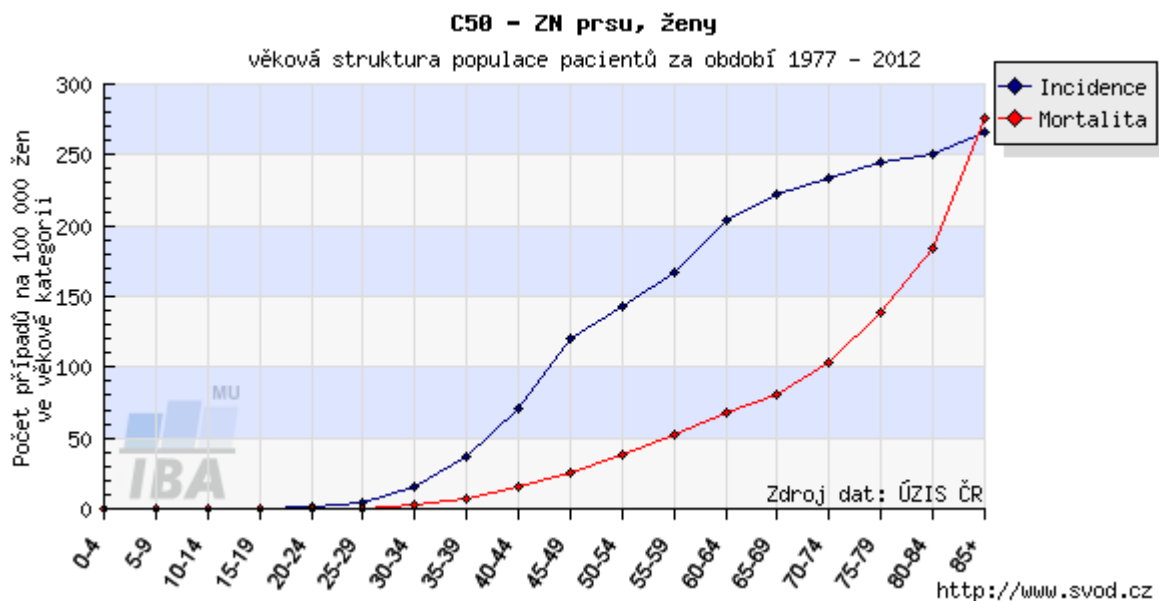
Obrázek 1: Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) u zhoubného nádoru prsu.

I přes stále se zvyšující incidenci nádorů prsu, dochází dlouhodobě ke stagnaci úmrtnosti, a to zejména díky zlepšování úspěšnosti léčby, dostupnosti moderních léčebných metod a programu mamografického skríninku v ČR.



Obrázek 2: Časový vývoj procentuálního zastoupení klinických stadií určených na základě TNM klasifikace.

U nově diagnostikovaného nádoru je zásadní charakteristikou jeho morfologický typ, biologické chování, přesná lokalizace a stádium pokročilosti onemocnění. Nejčastějším typem karcinomu prsu v roce 2010 byla skupina duktálních karcinomů (78,9%), následovaná druhým nejčastějším typem - lobulární karcinomem (12,8%) (2). Podle klinického stádia (viz. Obr. 2), které je zásadním pro stanovení prognózy a zvolení vhodného léčebného postupu, bylo zastoupení následující: nejčastěji se vyskytující klinickým stádiem bylo časné stádium I (43,3%), poté stádium II (34,1%). Pokročilá stádia (III a IV) byla zastoupena v 12,8 % a 7,4%. Zbývající 2,4% připadala na stádia neznámá. Vysoce rizikovou skupinu představují karcinomy prsu vyskytující se u mladých žen. U velmi mladých žen do 20 let je incidence velmi nízká (v roce 2010 nebyl žádný případ). Od 20. roku je však výskyt častější a incidence s věkem postupně narůstá. U pacientek ve věku pod 35 let bylo nahlášeno 123 nových případů, z nichž 23 zemřelo na tuto diagnózu. U žen po 40. roce věku dle Obr.3 prudce narůstá incidence nádorů prsu (1).



Obrázek 3: Incidence a mortalita dle věkové struktury pacientek s diagnózou karcinomu prsu.

Epidemiologie karcinomu prsu v mezinárodním srovnání poukazuje na vysokou zátěž evropských zemí tímto onemocněním doprovázenou velmi vysokou úmrtností. Česká republika obsazuje v incidence karcinomu prsu u žen ve srovnání se světem 30. místo, ve srovnání s evropskými zeměmi 18. místo. Úmrtnost českých žen na ZN prsu připadá na 118. místo světově a na 37. místo v Evropě (3).

1.2 Etiopatogeneze karcinomu prsu

V dnešní době etiopatogeneze karcinomu prsu není stále zcela jasná, ale i přesto jsou známé určité faktory, které zvyšují riziko vzniku tohoto onemocnění. Jedná se zejména o faktory genetické, hormonální, nutriční a faktory zevního prostředí. U 75-85 % nemocných dochází ke vzniku sporadického karcinomu prsu. Hereditární karcinom prsu vznikající v důsledku genetické mutace se vyskytuje u 5 – 7 % nemocných (4).

Genetické faktory

Hereditární predispozice ke vzniku karcinomu prsu výrazně ovlivňuje screening a sledování nemocných. Specifický predisponující gen je nalézán u méně než 30 % případů s osobní a/nebo rodinnou anamnézou. Téměř u 25 % případů s hereditárním karcinomem prsu je nalezena mutace v jednom z několika již identifikovaných, vzácných, ale vysoce penetrujících tumor-supresorových genů (BRCA 1 a BRCA 2, TP53, STK11, PTEN, CDH 1, CHEK 2, ATM a další). V roce 1991 byl identifikován na chromozomu 17q21 gen BRCA1 a o tři roky později (1994) byl zmapován na chromozomu 13q12 gen BRCA2 (5). U nositelky mutace BRCA1 je riziko vzniku onemocnění karcinomem prsu 56 – 85 %. Postihuje zejména

mladé ženy do 35 let s oboustranným výskytem nádoru. Mutace BRCA1 je zodpovědná i za další nádorová onemocnění a to karcinom vaječníků, karcinom tlustého střeva a karcinom prostaty u mužů. U nositelek mutace BRCA1 dochází ke vzniku karcinomu vaječníků a to v 15 – 45 %. Nositelky mutace BRCA2 jsou také ve zvýšeném riziku vzniku karcinomu prsu, dále může vést ke vzniku karcinomu vaječníků (10 – 20 %), pankreatu a melanomu (4). Nádory v důsledku mutace BRCA1 mají tendenci vykazovat basal-like fenotyp, vyšší histologický grade a běžně neexprimují estrogenové, progesteronové receptory stejně jako HER2/neu. Jsou proto řazeny mezi tzv. triple-negativní karcinomy prsu. Zatímco nádory, vzniklé v důsledku mutace BRCA2, se blíže podobají sporadickému karcinomu prsu (6). BRCA1 a BRCA2 mutace jsou zodpovědné za vznik syndromu hereditární karcinomu prsu a ovarií (7). V tab. 1 jsou uvedeny vysoce penetrující geny a jejich asociace s hereditárními nádorovými syndromy.

Tabulka 1: Přehled hereditárních syndromu u karcinomu prsu.

Gen	Hereditární syndrom	Riziko vzniku karcinomu prsu	Další asociované nádory
BRCA 1	syndrom	82 % celoživotní riziko	karcinom ovarií a vejcovodů
BRCA 2	hereditárního karcinomu prsu a ovarií		karcinom prostaty karcinom pankreatu a žlučových melanom
PTEN	Cowdenův syndrom Syndrom mnohočetného hamartomu	85 % celoživotní riziko	Karcinom endometria Nemedulární karcinom štítné žlázy Karcinomy urogenitálního traktu
TP53	Li-Fraumeniho syndrom	25 % riziko	Sarkom Mozkové nádory Leukémie Bronchoalveolární plicní karcinom Karcinom kůry nadledvin
CDH1	Hereditární difusní karcinom žaludku	39 % celoživotní riziko vzniku lobulárního karcinomu prsu	Karcinom žaludku Kolorektální karcinom
STK11	Peutz-Jeghers syndrom	32 % riziko	Karcinomy gastrointestinálního traktu Karcinom pankreatu Neepitelové nádory ovarií

Menší počet případů hereditárního karcinomu prsu je dávana do souvislosti s průkazem mutace u středně penetrujících genů. Jedná se zejména o geny zodpovědné za reparaci DNA, které interagují s BRCA1 a BRCA2. Mutace v genech CHEK2, BRIP1, ATM a PALB2 zvyšuje dvojnásobně riziko vzniku karcinomu prsu. Díky pokročilému genetickému testování byly objeveny vzácné mutace u nízko penetrujících genů, které mohou přispět k riziku polygenně podmíněných genetických nádoru prsu. Stanovení středně a nízko penetrujících genů zatím není dostupné v klinické praxi, zatímco stanovení vysoce penetrujících genů je součástí diagnostiky hereditárně podmíněných nádorových onemocnění (5).

Hormonální faktory

ZN prsu může vzniknout u žen po delší expozici estrogenů. Jedná se zejména o ženy s časnou menarche, pozdní menopauza, první graviditou po 30. roce života, krátkou dobou laktace a dlouhodobým užíváním exogenních estrogenů (v rámci substituční léčby) a také nuliparitou.

Nutriční faktory

Zvýšený příjem alkoholu, tuků ve stravě, nadváha či obezita a nedostatek fyzické aktivity zvyšují riziko vzniku ZN prsu. U žen před menopauzou je většina estrogenů produkovány vaječníky, zatímco tuková tkáň produkuje malé množství estrogenů. Po menopauze, je však většina estrogenů produkována tukovou tkání. Nadváha a obezita po menopauze vede tedy ke zvýšené hladině estrogenů a zvyšuje tak riziko vzniku ZN prsu. U žen s nadváhou může docházet ke zvýšené hladině inzulínu, což je spojováno s výskytem zhoubných nádorů včetně ZN prsu.

Faktory zevního prostředí

Velmi významným rizikovým faktorem pro vznik ZN v pre-menopauzálním období představuje expozice ionizujícímu záření. Míra rizika závisí zejména na věku, kdy došlo k ozáření, dávce radiace a dosaženého věku. U žen ozařovaných z důvodu Hodgkinovy choroby před 25. rokem stoupá riziko vzniku ZN prsu o 10% do 45 let, a o 29% kolem 55 let ve srovnání se zdravou populací. Radioterapie po 50. roce života je zcela neškodná, zatímco ozáření před 18. rokem je pro prs velmi nebezpečné z důvodu proliferace prsní žlázy v období adolescence, kdy by ionizující záření mohlo způsobit mutace DNA.

1.2.1 Klinické projevy karcinomu prsu

Klinické příznaky primárního nádoru mohou být zcela asymptomatické, nebo naopak mohou vést ke změně velikosti prsu, vtažení kůže či změnám kontury prsu, k asymetrii prsů, vpáčení bradavky a sekreci z bradavky. Nejčastějším příznakem je však hmatná rezistence v prsu či podpaží. U generalizovaných forem nádorů prsu se objevuje specifická symptomatologie postižených orgánů (plic, jater, skeletu). U metastatického postižení plic se objevuje dušnost a chronický kašel, u jaterních metastáz hepatomegalie a alterace jaterních funkcí, u metastáz do skeletu se objevují bolesti kostí a v pokročilých případech patologické zlomeniny. U 10 – 16% pacientek s karcinomem prsu dochází k postižení centrálního nervového systému. Mozkové metastázy jsou často asociovány s nízkým věkem pacientek a s přítomností primárního nádoru, který je ER a HER2 negativní nebo má basal-like fenotyp. Dále se mohou u pacientek objevit metastatická ložiska v podkoží a lokoregionální metastázy, které se projeví hmatnou rezistencí v odpovídajícím místě.

Před vznikem karcinomu prsu se mohou u pacientek objevit premaligní změny představující hyperplazie epiteliálních buněk bazální membrány ductů nebo lobulů prsní tkáně. Hyperplazie mohou následně přejít do benigního stadia karcinomu prsu označovaného jako karcinom „*in situ*“ (duktální karcinom *in situ* – DCIS, lobulární karcinom *in situ* – LCIS). Změnou benigního stadia na maligní, získávají nádorové buňky schopnost metastazovat. Nejčastěji zastoupeným invazivním karcinomem prsu je infiltrující duktální karcinom (IDC – představuje 53% všech případů ZN), dále se objevují smíšené typy se zastoupením IDC (28%), infiltrující medulární karcinom (6%), lobulární (5%) a acinózní (2,5%). Velmi raritní jsou papilokarcinomy a karcinosarkomy, které se vyskytují u méně než poloviny procenta pacientek. V současné době se do popředí dostává velmi agresivní forma IDC představovaná inflamatorním (erysipeloidním) karcinomem prsu. Tato forma ZN postihuje duktální část prsní tkáně, nádorové buňky jsou nediferencované a jsou schopny infiltrovat celý prs. Typickým projevem je zarudnutí a bolestivost postižené kůže, která vzhledově vypadá jako pomerančová kůra (*peau d'orange*). Jedná se o velmi rychle rostoucí ZN, který je již velmi časně schopen metastazovat do lymfatických uzlin podpaží a následně i do dalších orgánů.

1.2.2 Diagnostika karcinomu prsu

Základem stanovení diagnózy je podrobná rodinná a osobní anamnéza, které může upozornit nejen na možný genetický výskyt nemoci, ale i na dobu jejího trvání a dynamiku

růstu nádoru. Dále následuje fyzikální vyšetření ženy, při kterém mohou být pozorovány výše uvedené klinické příznaky. V případě nálezu hmatné rezistence se stanoví její velikost, konzistence a pohyblivost proti spodině a kůži. Palpačně se provádí i vyšetření lymfatických uzlin v podpaží, nadklíčku a na krku. Na základě výsledku fyzikálního vyšetření je žena odeslána na mamografické či ultrasonografické vyšetření. V průběhu obou těchto zobrazovacích vyšetření může být proveden odběr tkáně na histopatologický rozbor. Při podezření na multifokální postižení je prováděna magnetická rezonance. Pro zhodnocení vztahu nádoru k okolí a stanovení původu nádoru se používá počítačová tomografie (CT) či pozitronová emisní tomografie (PET). V případě, že je ženě stanovena diagnóza karcinomu prsu, pro zhodnocení jejího stavu se provádí biochemická vyšetření vč. stanovení nádorových markerů (CEA, CA 15-3) a hematologická vyšetření. Tato vyšetření se provádí opakovaně v průběhu celé léčby.

Velmi zásadní při stanovení diagnózy je získání tkáně pro histopatologické vyšetření. Při základním histopatologickém vyšetření se hodnotí velikost nádoru (mikroskopicky měřena invazivní část nádoru), histologický typ nádoru a jeho grade (dobře diferencovaný – G1, středně diferencovaný – G2, níže diferencovaný – G3). Dále se hodnotí invaze do lymfatických a krevních cév, přítomnost perineurální propagace a nekróz v nádoru. Přítomnost těchto parametrů je nepříznivým prognostickým faktorem pro pacientku. Vedle histopatologického vyšetření se provádí imunohistochemické stanovení hormonálních receptorů (estrogenových a progesteronových), ukazatelů buněčné proliferace Ki-67 a PCNA s expresí onkogenu HER2 na membránách nádorových buněk. Pro stanovení stadia onemocnění je nezbytné vyšetřit stav lymfatických uzlin. Zjišťuje se počet uzlin infiltrovaných nádorovými buňkami z celkového počtu odebraných uzlin. Navíc se ještě provádí vyšetření sentinelové uzliny, jehož výsledek informuje o míře rizika postižení ostatních uzlin v regionální oblasti.

Prognóza onemocnění karcinomem prsu je ovlivňována řadou prognostických a prediktivních faktorů. Mezi prognostické faktory jsou řazeny charakteristiky nádoru jako je velikost primárního nádoru, postižení axilárních lymfatických uzlin a jejich počet, histologický typ nádoru, klinické stadium, jaderný nebo histologický grade nádoru a proliferační aktivita nádoru, angioinvazivita a lymfangioinvazivita a přítomnost hormonálních receptorů v nádorových buňkách a dále věk a vztah k menopauze. Prognostické faktory určují, jakou míru rizika onemocnění představuje pro délku života pacientky. Dále se sledují prediktivní faktory léčebné odpovědi, mezi které jsou řazeny: exprese HER2/neu je prediktivním faktorem účinnosti léčby trastuzumabem, zvýšená exprese proteinu p53

(způsobená mutací genu TP53) je prediktorem chemosenzitivity k chemoterapeutické léčbě založené na antracyklinech či mitomycin (4).

1.2.3 Léčba karcinomu prsu

Základním předpokladem úspěšné léčby pacientek s onemocněním karcinomem prsu je správně zvolená léčebná strategie. Mezi léčebné modalitty u karcinomu prsu je řazena chirurgická léčba, radioterapie, chemoterapie, hormonální terapie a biologická léčba.

V průběhu chirurgické léčby se provádí modifikovaná radikální mastektomie doplněná o axilární lymfadenektomii a exstirpaci sentinelové uzliny. U lokálně pokročilých stadií se provádí prostá mastektomie. V posledních letech je ze strany pacientek preferovány prs zachovávající operace, při které je odstraněn buď příslušný kvadrant s nádorem (kvadrantektomie) nebo pouze nádor s minimálně centimetrovým okrajem zdravé tkáně (lumpektomie). Pacientky, které podstoupily modifikovanou radikální mastektomii z důvodu karcinomu *in situ* mohou podstoupit bezprostřední rekonstrukci prsu, u ostatních pacientek je doporučováno tento výkon odložit o 6 – 24 měsíců od poslední chemoterapie či radioterapie a to z důvodu vysokého rizika komplikací radioterapie po rekonstrukčním výkonu s autologním i heterologním implantátem. U pacientek s prokázanou mutací v genech BRCA1 a BRCA2 se provádí profylaktická bilaterální mastektomie a ovariectomie.

Karcinom prsu nepatří mezi radiosenzitivní nádory, i přesto se k jeho léčbě používá adjuvantní radioterapie. Nejčastěji využívané formy radioterapie představují brachyterapie (ozáření na krátkou vzdálenost s využitím intersticiálních jehel), lokoregionální aktinoterapie a teleterapie (zevní ozáření).

Karcinom prsu je v současné době považován za systémové onemocnění, proto v jeho léčbě dominuje chemoterapie. Při indikaci chemoterapie se bere v úvahu rozsah nádoru, dávkování cytostatik, načasování chemoterapie a možnost vzniku rezistence na jednotlivá cytostatika. Existují tři hlavní indikační skupiny chemoterapie prsu a to adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní. Adjuvantní chemoterapie je aplikována ženám po předchozí radikální léčbě (chirurgické nebo radiační) odstraňující celý nádor a v době, kdy je pacientka bez aktuálních známek nádorové choroby s cílem odstranit minimální reziduální chorobu. Používají se chemoterapeutika s CMF a režimy na základě antracyklinů, taxanů a vinorelbinu. Neoadjuvantní chemoterapie je indikována u žen s pokročilým operabilním nádorem, jejímž cílem je zmenšit lokálně nádor a eventuálně provést prs zachovávající výkon nebo zlepšit operabilitu. Pro léčbu pacientek s pokročilým (generalizovaným) neléčitelným nádorem prsu neexistuje standardní léčebný postup. Systémová léčba kombinující chemoterapii, hormonální

terapii a symptomatickou léčbu si klade za cíl zachovat dobrou kvalitu a prodloužit život pacientky. I když existuje více jak 40 dosud známých cytostatik účinných pro léčbu karcinomu prsu, nejčastěji používanými jsou cyklofosfamid, metotrexát, 5-fluorouracil, doxorubicin, vinorelbin, paklitaxel, docetaxel, gemcitabin, kapecitabin, cisplatina a karboplatina. Tato cytostatika působí na různé fáze buněčného cyklu a liší se svým mechanismem účinku. Používají se v monoterapii, ale stále více se používají různé kombinace potencující účinnost léčby. Mezi nejstarší způsob léčby pacientek s nádorem prsu patří hormonální léčba. Ta je indikována u pacientek s přítomností estrogenových a progesteronových receptorů na povrchu nádorových buněk. Hormonální léčba blokuje růst nádorových buněk závislých na stimulaci estrogenu (blokace estrogenních receptorů) nebo dochází k cytostatickému či cytocidnímu působení hormonálních přípravků přímo na nádorové buňky prostřednictvím růstových faktorů. Mezi způsoby hormonální léčby je řazena ablativní léčba odstraňující zdroj produkující hormony se stimulačním účinkem na karcinom prsu (ovariectomie), kompetitivní léčba využívající inhibici přirozeného hormonu antihormonem (antiestrogeny – tamoxifen) a inhibiční léčba, při které je blokována tvorba estrogenu v periferních tkáních a nadledvinkách pacientek (inhibitory aromatáz a progestiny).

V posledních letech se velmi uplatňuje biologická léčba, která cíleně ovlivňuje specifickou cílovou molekulu a tím selektivně ničí nádorové buňky. Cílovými molekulami v současnosti schválené biologické léčby u karcinomu prsu jsou receptor HER2 a vaskulární endoteliální faktor (VEGF). Největší klinický význam z těchto léků má monoklonální protilátka proti HER2 trastuzumab (Herceptin). Dále je používán lapatinib, který je indikován pro léčbu pokročilých karcinomů prsu po selhání terapie trastuzumabem. Lapatinib (Tyverb) působí jako intracelulární duální inhibitor HER1 a HER2 receptoru. Nádory větší než 1 cm vyžadují cévní zásobení, ke kterému je nezbytná proliferace endotelových buněk a indukce vrůstání nových cév do nádoru. Proto některé nádory produkují VEGF. Bevacizumab (Avastin) je monoklonální protilátka působící neutralizací VEGF, čímž dochází k zablokování angiogeneze a zástavě nádorového růstu. Bevacizumab je indikován v 1. linii léčby metastatického karcinomu prsu v kombinaci s paklitaxelem. Všechny výše zmíněné léčebné modalities jsou vzájemně kombinovány a sestavovány do standardních léčebných postupů, které navazují na světový a evropský standardní postup (4).

1.3 Cirkulující nádorové buňky

1.3.1 Historie cirkulujících nádorových buněk

Cirkulující nádorové buňky jsou buňky, které se již při časně tvorbě a růstu primárního nádoru z něj uvolňují a následně vstupují do krevního či lymfatického oběhu, jímž se šíří do vzdálených orgánů. Právě tyto buňky jsou zdrojem pro vznik metastáz v životně důležitých orgánech (játra, plíce, kostní dřeň, lymfatické uzliny, CNS).

První zmínka o CTC byla publikována Thomasem Ashworthem v roce 1869, který upozoroval v krvi pacienta s metastatickým karcinomem prostaty buňky morfoloicky podobné buňkám primárního nádoru. O dvě desetiletí později byla Stevem Pagetem (1889) vyslovena tzv. „seed and soil“ hypotéza, podle které proces metastazování závisí na komplexu interakcí nádorových buněk („the seed“) s mikroprostředím specifických orgánů („the soil“). Rozšíření této teorie (Schackert a Fidler) poukázalo na skutečnost, že některé nádory vykazují selektivní predispozici k zakládání metastatických ložisek v jednotlivých orgánech. U karcinomu prsu a prostaty představují kostní metastázy nejčastější místo pro výskyt metastáz a to více než u 68 % pacientů. Nádory prsu, močového měchýře, tlustého střeva, ledvin, nádory hlavy a krku a kožní nádory – všechny tyto nádory mají sklon k tvorbě plicních metastáz. Právě hustá cévní plocha plic představuje velmi atraktivní mikroprostředí pro podporu vzniku a růstu metastáz (8).

1.3.2 Biologie cirkulujících nádorových buněk

Cirkulující nádorové buňky získané z periferní krve pacientů s nádorovým onemocněním představují heterogenní skupinu nádorových buněk. Tyto buňky přežívají v cirkulaci 1 až 2,4 hodiny. V periferní krvi je možné prokázat životaschopné ale i apoptické CTC, které vykazují absenci či výjimečně expresi nukleárního proteinu Ki-67, jež je asociován s buněčnou proliferací. Podskupina CTC, která vyazuje absenci exprese tohoto proteinu, představuje nedělící-se buňky označované jako tzv. dormantní. Tyto dormantní buňky nereagují na některá chemoterapeutika, což může napomáhat k tomu, že určitá subpopulace CTC je schopna přežít v organismu i v průběhu léčby (9). V současné době je pojem „dormantní“ založen na pozorováních a hypotézách. Definice vzniklá na základě pozorování popisuje dormanci jako prodlouženou latentní fázi (nejméně 5 let), kterou je možné pozorovat u některých pacientů mezi léčbou primárního nádoru a progresí onemocnění podloženou klinickými důkazy. Samostatný pojem „dormance“ se datuje k první polovině 20. století a byl poprvé představen patologem Rupertem A. Willisem (10). Na základě výzkumů

s využitím buněčných linií a zvířecích modelů bylo zjištěno, že proces dormance probíhá na dvou odlišných úrovních. Jednotlivé dormantní buňky jsou definovány jako buňky se sníženými proliferačními a apoptotickými procesy a zastaveným buněčným cyklem (v $G_0 - G_1$ fázi). Jakmile však dojde ke změně mikroprostředí nebo změně genové exprese, dormantní buňky začínají proliferovat. Druhou úroveň dormance nádorových buněk představuje mikrometastatický model. Ten ji definuje jako stav rovnováhy mezi apoptózou a proliferací mikrometastáz. Dormantní nádorové buňky mikrometastázy jsou schopné proliferace a růstu, přičemž nádorová masa však nepřekročí určitou velikost. Tato rovnováha je regulována růst stimulujícími a inhibujícími faktory sekretovanými mikroprostředím, imunitními buňkami a samotnými nádorovými buňkami (11). Dormantní nádorové buňky představují riziko vzniku relapsu primárního onemocnění a nasvědčují, že subpopulace těchto reziduálních buněk musí být tedy schopná uniknout imunitnímu systému pacienta. Mechanismus úniku nádorových buněk zahrnuje ztrátu exprese antigenů a/nebo prezentace imunosupresivních faktorů sekretovaných nádorovými buňkami, toleranci T-lymfocytů v důsledku potlačení kostimulace, vyčerpání T-lymfocytů vlivem chronické antigenní stimulace, stejně jako stimulaci regulačních T-lymfocytů. Preferenčním místem usídlení dormantních nádorových buněk představuje kostní dřeň. Dormantní nádorové buňky jsou rezistentní k T-lymfocyty mediované lýze a mají nižší schopnost stimulovat cytotoxické T-lymfocyty k sekreci interferonu gama a tumor nekrotizujícího faktoru alpha. Dormantní buňky jsou ve většině případů velmi pomalu proliferujícími buňkami. Konvenční chemoterapeutická léčba působí na vysoce proliferativní buňky, což může způsobit selhání cytotoxické adjuvantní léčby u některých pacientek s karcinomem prsu a je třeba zvažovat dodatečnou léčebnou strategii (12).

1.3.3 Osud cirkulujících nádorových buněk v metastatickém procesu

Šíření nádorových buněk představuje složitý a komplexní proces, který je stále velmi intenzivně studován. Metastatický proces se skládá z řady procesů zahrnujících růst nádoru, angiogenezi, únik nádorových buněk, epiteliální – mezenchymální tranzici (EMT), intravazaci, přežívání nádorových buněk v krevních a lymfatických cestách a embolizaci, extravazaci, mezenchymální-epiteliální tranzici (MET), růst makrometastázy (13).

Invaze nádorových buněk

Iniciačním a současně kritickým krokem metastatického procesu je invaze nádorových buněk do krevních či lymfatických cest. V průběhu tohoto kroku dochází ke změnám

v mezibuněčné adhezi (cell-to-cell) stejně jako v adhezi buněk k extracelulárnímu matrix (ECM). Adherence nádorových buněk k ECM je zprostředkována prostřednictvím integrinů, zatímco za mezibuněčnou adhezi je zodpovědná skupina cadherinů, které umožňují vázat buňky přes homofilické proteinové interakce jejich extracelulárních domén. Invazi nádorových buněk usnadňuje dále proteolytická degradace ECM pomocí matrixových metaloproteináz (MMPs) a urokinázového aktivátoru plazminogenu (uPA). Navázáním uPA na receptor uPA (uPAR) dochází ke štěpení plazminogenu, což aktivuje plazmin a následně vede k degradaci složek ECM a aktivaci MMP (14, 15).

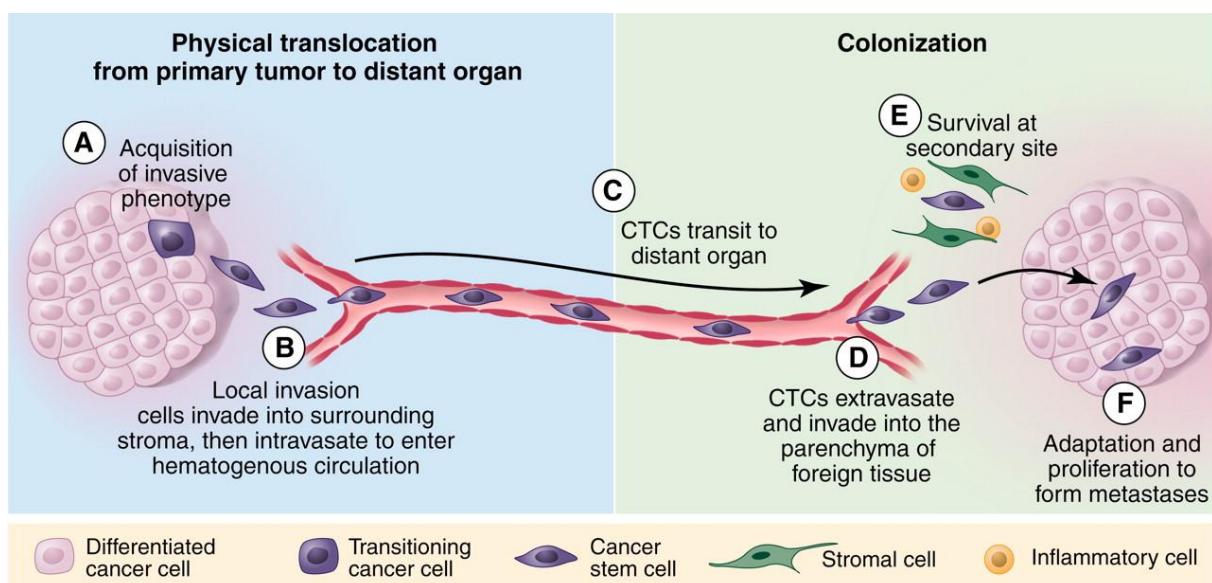
Invaze a migrace nádorových buněk může probíhat dvěma způsoby v závislosti na zapojení odlišných buněčných signálních drah. Prvním způsobem invaze je améboidní pohyb (pohyb jedné buňky). Tento pohyb je založen na uvolnění vazby nádorových buněk na ECM a ztrátě jejich buněčné polarity vedoucí k rychlému pohybu buněk cestou nejmenšího odporu, což je dáno tvarem buněk a bariérami tkání. Jak bylo ukázáno na 3D-modelu lymfomu, při améboidní invazi se neuplatňují pevná integrinová spojení, ale zapojují se aktinová vlákna umožňující klouzavý pohyb nádorových buněk (16). Druhým způsobem invaze je tzv. kolektivní migrace (pohyb skupiny buněk). Tento způsob do určité míry vyžaduje pokračující prezentaci mezibuněčných spojení. Nádorové buňky invadují, intravazují a šíří se ve formě shluků. Tyto shluky buněk velmi účinně embolizují lymfatické nebo krevní cesty a snáze přežívají v cirkulaci (17).

Pohyb většiny nádorových buněk je tedy dynamickým procesem, který jim umožní vcestovat do krevních či lymfatických cest. Tok nádorových buněk nemusí být jednosměrný. Pravděpodobně dochází k tomu, že CTC mohou být uvolňovány z metastatického nádoru a mohou tak proniknout zpět do původního místa nádoru. Tento proces je označován jako „self seeding“ a vyžaduje dvě odlišné funkce. Jednou z nich je schopnost nádoru přilákat své vlastní cirkulující potomstvo a druhou představuje schopnost CTC neinfiltrovat primární nádor. Tato koncepce může napomoci objasnit příčinu vzniku lokálních relapsů u pacientek s kompletním odstraněním nádoru prsu (18).

Přežívání nádorových buněk v cirkulaci

Krevní systém představuje pro již uvolněné (cirkulující) nádorové buňky velmi nepříznivé prostředí pro jejich přežití v důsledku působení fyzikálních sil, přítomnosti buněk imunitního systému a nedostatku substrátu (19). Buňky, které se oddělily z primárního ložiska, v krevním systému nejčastěji podléhají buněčné smrti označované jako anoikis. Anoikis je proces biochemicky odpovídající apoptóze, který je indukován ztrátou kontaktu se

sousedními buňkami ve tkáni nebo s ECM. Nedostatečná signalizace vede k aktivaci kaspázových proteáz za spoluúčasti mitochondrií způsobující buněčnou smrt. Předpokládá se, že anoikis přispívá k metastatické neúčinnosti (20). Exprese různých receptor tyrozinových kináz a signalizačních molekul v průběhu invaze způsobuje rezistenci nádorových buněk k anoikis *in vitro* a může tak přispět k přežívání nádorových buněk v cirkulaci. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že koagulační faktory hrají velmi důležitou roli v procesu metastazování a zvyšují progresi nádorů prsu. Vazbou nádorových buněk na koagulační faktory zahrnující tkáňový faktor, fibrinogen a trombin dochází k tvorbě embolu, který snáze přilne ke kapilárám a následně může dojít ke vzniku metastázy. V průběhu výzkumu metastatického procesu bylo zjištěno, že ne všechny kapiláry jsou stejné. Endoteliální buňky z různých orgánů exprimují odlišné povrchové proteiny. Ke studiu povrchových proteinů byla využita metoda biopanningu využívající vláknitých bakteriofágů *E. coli* ke genetické úpravě, tak aby na jejich povrchu byly exprimovány různé proteiny představující tzv. knihovnu sekvencí. Následně dochází ke specifické selekci fágů s exponovaným proteinem, které jsou poté infikovány do bakterie, z nichž je izolována DNA pro sekvenci příslušného proteinu. Pomocí tohoto způsobu byl identifikován protein, metadherin, který zprostředkovává usidlování nádorových buněk v plicích ne však v kůži, ledvinách či jiných orgánech. Prezentace různých povrchových proteinů může tedy napomáhat nádorovým buňkám preferenčně kolonizovat různé tělesné orgány (21).



Obrázek 4: Šíření nádorových buněk v průběhu metastatického procesu. Převzato a upraveno podle Chaffer CL and Weinberg RA, Science 2011.

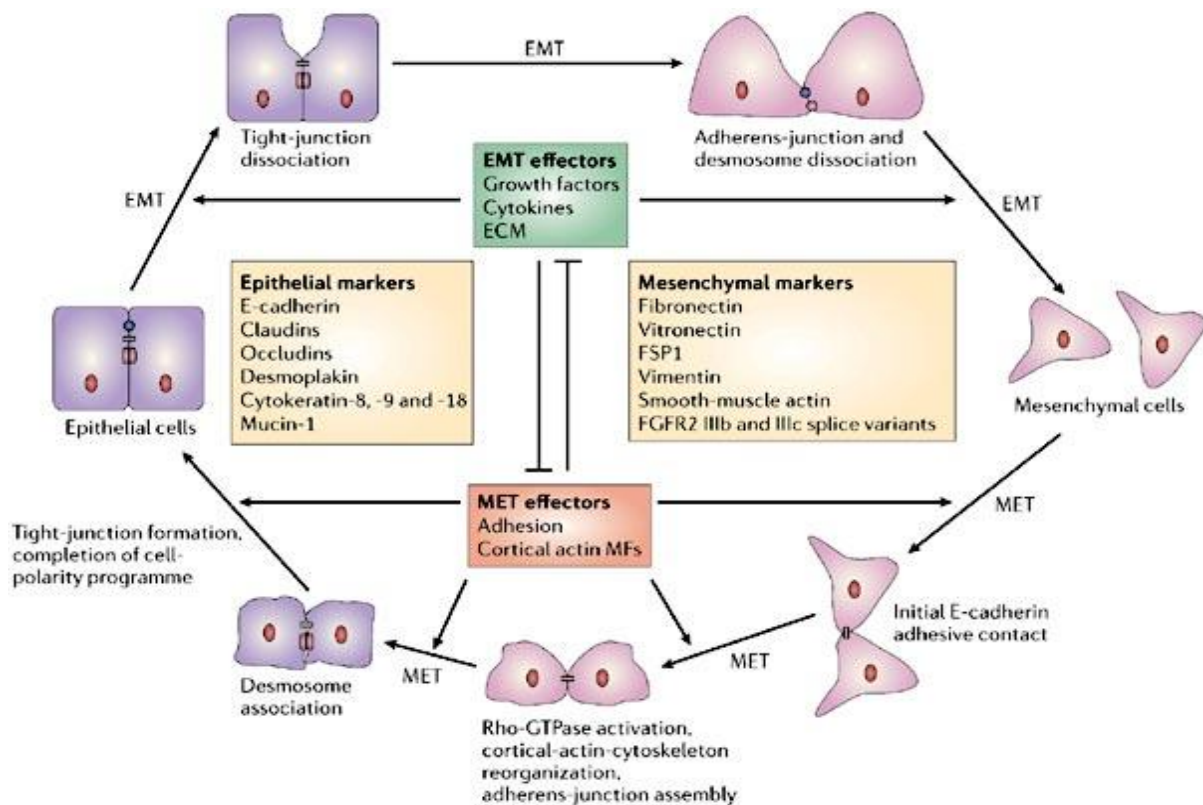
Uvolněné a přežívající buňky mohou vytvořit samostatné sekundární nádorové ložisko v novém prostředí hostitelského orgánu. CTC zde mohou podstoupit apoptózu nebo přetrvat v inaktivovaném tzv. dormantním stavu po řadu let. CTC, které extravazací pronikly do nového mikroprostředí, zde přežívají ve formě tzv. diseminovaných nádorových buněk (DTC). Tyto DTC se mohou transformovat do více agresivních forem a vyrůst tak do značné metastázy a/nebo mohou recirkulovat do dalších sekundárních orgánů nebo dokonce se vrátit zpět do místa primárního nádoru. Existují dva modely šíření nádorových buněk. U lineárního modelu dochází k šíření buněk v pozdní fázi, kdy primární nádor dosáhne kritického množství buněk a získá tak vysoce agresivní fenotyp. Naopak u paralelního modelu, může k šíření buněk docházet již v časně fázi, a to i když zhoubný nádor dosahuje malé velikosti. U lineárního modelu může následně postupně docházet k progresi nádoru, zatímco u paralelního modelu dochází k usazení CTC/DTC ve vzdálených orgánech, které zde mohou vytvářet klony buněk, které se rozvíjí souběžně s primárním nádorem (22).

Kolonizace

Úspěšná kolonizace významně závisí na interakci mezi mikroprostředím („soil“) vzdálených orgánů. Nedávné výsledky studie poukázaly, že hematopoetické progenitorové buňky tvořené v kostní dřeni mohou vést ke vzniku pre-metastatického místa přitahujícího nádorové buňky a podporujícího vznik metastázy. Charakteristika těchto buněk kostní dřene a přerušení interakce mezi nimi a nádorovými buňkami může zabránit metastatické kolonizaci (23). Pro růst metastázy v jakékoli tkáni je nezbytné cévní zásobení poskytující kyslík, růstové faktory, nutriety a metabolity nádorovým buňkám. V průběhu angiogeneze dochází k formaci nového krevního zásobení z již existujícího vaskulárního systému. Řada faktorů stimuluje endoteliální buňky indukující angiogenezi, zahrnujících vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), angiopoetin, ephrin, růstový faktor krevních destiček, transformující růstový faktor a růstový faktor fibroblastů (24). Mezi nejčastěji kolonizované orgány u pacientek s karcinomem prsu patří mozek, játra, kosti. U pacientek s metastatickým karcinomem prsu a s HER2 overexpresí, které jsou léčeny trastuzumabem, je incidence mozkových metastáz dvakrát častější než u ostatních pacientek (25). Existují dva základní typy kostních metastáz. U pacientek s karcinomem prsu se objevují osteoklastické léze, zatímco u pacientů s karcinomem prostaty jsou nalézány osteoplastické léze (26).

Úloha EMT v metastatickém procesu

Invaze je doprovázena přepnutím (switch) exprese cadherinů nádorovými buňkami. Jedná se o proces nazývaný jako epiteliální – mezenchymální tranzice. V průběhu tohoto přechodu epiteliální buňky ztrácí své epiteliální charakteristiky a místo toho získávají mezenchymální fenotyp. EMT proces zvyšuje metastatický a invazivní potenciál nádorových buněk tím, že dochází ke ztrátě mezibuněčných kontaktů a ke snížení buněčné polarity. Zásadní charakteristikou EMT je snížení regulace epiteliálních markerů jako je cytokeratin a E-cadherin a naopak zvýšení regulace mezenchymálních markerů (vimentin, N-cadherin a cadherin 11). Hlavní regulační roli EMT mají vedle transformujícího růstového faktoru β také transkripční faktory Twist, Snail, Slug a Sip1 (14, 27). EMT proces byl dlouho chápán jako soubor molekulárních změn v nádorových buňkách vedoucí k jejich zvýšené motilitě a k indukci proteáz zapojených do degradace ECM a usnadňující invazi a intravazaci do krevního oběhu. Vedle této tradiční definice, existuje nová hypotéza, podle které EMT musí mít úlohu ve vytváření určité frakce CTC a následně v jejich udržování. Doposud bylo publikováno omezené množství dat spojujících CTC s EMT procesem. Pomocí RT-PCR byla hodnocena exprese markerů asociovaných s EMT (TWIST, AKT2 a PI3K α) v CTC, jejichž obohacená frakce byla získána na základě exprese EpCAM těmito buňkami. 62% CTC bylo pozitivních pro alespoň jeden z EMT markerů (28). Dále bylo zjištěno, že CTC exprimují fosforylované signální kinázy (EGFR, HIF1 α , HER2 a PI3K/Akt). Právě tyto signální dráhy se uplatňují v EMT procesu (27, 29).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Obrázek 5: Plasticita nádorových buněk v průběhu epiteliálního-mezenchymálního přechodu. Převzato a upraveno podle Thiery *et al.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006

EMT je navíc asociován s fenotypem kmenových buněk a rezistencí k apoptickým signálům u CTC. Tudiž EMT odvozené CTC jsou pravděpodobně mnohem více schopné extravazace, kolonizace a přežívání v cizím prostředí vzdálených orgánů (30-32). Je to díky tomu, že EMT přispívá jednak ke zvýšené regulaci adhezivních molekul zajišťujících přilnutí nádorových buněk k endoteliu a umožnění prostupu přes tuto vrstvu a dále také vyvolává angiogenní změnu, při které dochází k růstu nových cév v novém mikroprostředí. Více jak 60 % CTC exprimuje marker NOTCH1 (gen asociovaný se sebeobnovou nádorově iniciačních buněk) a téměř 70 % CTC exprimuje ALDH1 (gen asociovaný s nádorovými kmenovými buňkami) (33, 34). Pro kmenové buňky karcinomu prsu je typický nález triple negativity (ER, PR, HER2) (28). CTC mohou vykazovat i částečný EMT fenotyp, tzn. že exprimují epiteliální a mezenchymální antigeny. Zdá se, že mezenchymální charakter buněk umožňuje časná stadia metastazování, zatímco epiteliální charakter buněk je zodpovědný za pozdní stadia kolonizace a nádorové progresse. Heterogenita populace CTC výrazně ovlivňuje jejich hodnotu jako biomarkeru a silně závisí na použité detekční metodě (19).

Nádorové buňky v průběhu extravazace do sekundárních orgánů podléhají opačnému procesu tedy tzv. mezenchymální-epiteliální tranzici (MET). Nádorové buňky jsou zpětně diferencovány na buňky s epitheliálním fenotypem, které tvoří metastázy s obdobnou histologickou charakteristikou primárního nádoru. Není zcela dosud zřejmé, zda diseminované nádorové buňky podléhají MET a ztrácí mezenchymální fenotyp a/nebo fenotyp kmenových nádorových buněk nebo frakce mezenchymálních a/nebo kmenových nádorových buněk dává vznik diferencovanému potomstvu během kolonizace. Nicméně, v obou případech by toto vedlo ke vzniku buněk s diferencovaným, epitheliálním nádorovým fenotypem (35).

1.3.4 Molekulární charakteristika CTC

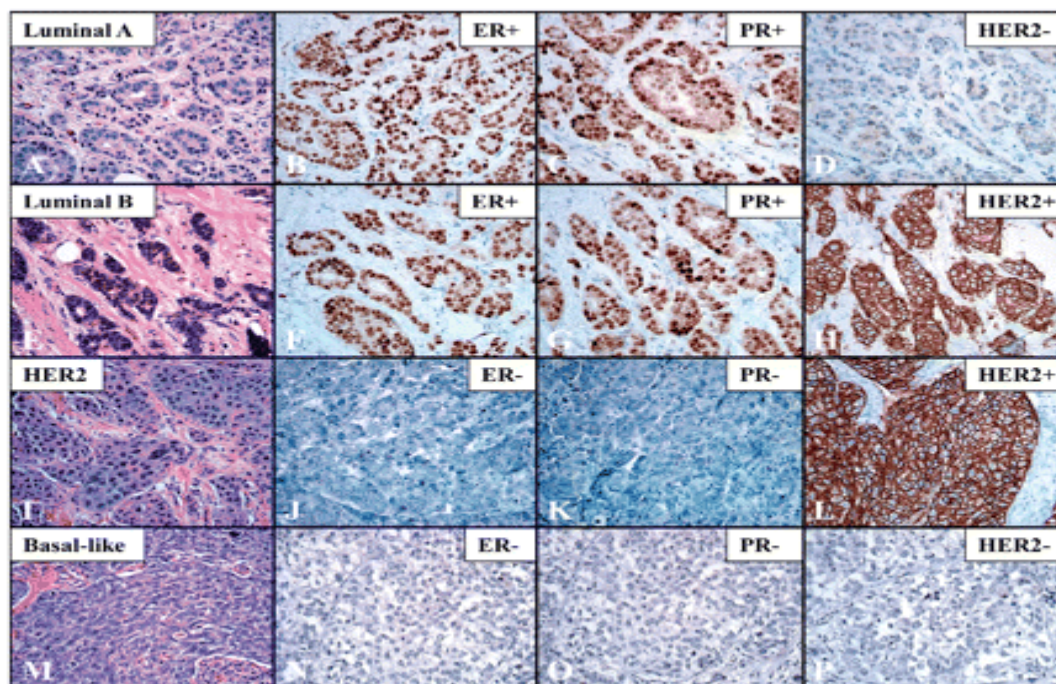
V současné době molekulární charakterizace CTC představuje rozsáhlé téma ve výzkumu nádorových onemocnění, jejímž cílem je nejen potvrdit maligní původ CTC, ale také identifikovat diagnosticky a terapeuticky vhodné markery exprimované těmito buňkami. Charakterizace CTC může přispět k prokázání přítomnosti metastatických kmenových buněk (cancer stem cells - CSC) mezi ostatními CTC. Zjištění kompletního genomového profilu a expresních zákonitostí je velmi důležité z hlediska pochopení biologických vlastností a molekulárních charakteristik CTC a jejich spojitost s CSC. CTC jsou velmi různorodé, jak již bylo prokázáno prostřednictvím zobrazovacích a molekulárních metod. Zvláště důležité je to v případě, kdy CTC exprimují markery, které nejsou přítomny v primárním nádoru. Různorodost CTC však není doposud plně klinicky využívána. Molekulární charakterizace CTC u karcinomu prsu za poslední desetiletí prošla velkým vývojem. Při charakterizaci CTC se sledují/stanovují následující markery: epitheliální markery (cytokeratin 8, 18, 19, EpCAM, MUC1), přítomnost estrogenových a progesteronových receptorů (ER, PR), HER-2 status, markery kmenových buněk a EMT (CD44, CD24, ALDH1, TWIST-1, vimentin, N-cadherin), angiogenní markery (VEGF, VEGF-2, HIF1-alpha), markery signálních dráhy PIK3CA (EGFR, HER2, PIK3K, pFAK), mammaglobin a DNA metylační markery (CST6, BRMS1, SOX17).

Cirkulující nádorové buňky jsou detekovány na základě průkazu jádra (DAPI), cytokeratinů (CK 8, 18 a 19) a nepřítomnosti CD45. CTC jsou z periferní krve separovány na základě exprese EpCAM (Epithelial Cell-Adhesion Molecule). MUC1 je vysokomolekulární glykoprotein, jehož cytoplasmatickou i membránovou expresi je možné detekovat v nádorové tkáni prsu.

Receptor epidermálního růstového faktoru 2 (HER-2) je transmembránový protein tyrozin kinázového růstového receptoru, který je kódován protoonkogenem lokalizovaným na chromozomu 17q21. HER2 protoonkogen je amplifikován a over-exprimován u přibližně 20 – 25% invazivních primárních nádorů prsu. Pozitivní HER-2 status je spojován s agresivním chováním nádoru a rezistencí k cytotoxické a endokrinní léčbě. Pacientky s HER-2 amplifikací/over-expresí jsou indikovány k léčbě trastuzumabem (Herceptin®) – monoklonální protilátka proti HER-2 receptoru. Blokadí tohoto receptoru dochází k inhibici proliferace neoplastických buněk *in vivo* a *in vitro* a k zesílení chemosenzitivity těchto buněk (36).

Estrogenový receptor α (ER) a progesteronový receptor (PR) jsou dalšími markery společně s HER-2, které se stanovují při diagnostice karcinomu prsu. Tyto receptory jsou za normálních okolností přítomny v buňkách zdravé prsní žlázy. Přítomnost těchto receptorů v nádorových buňkách znamená, že nádor je stále závislý na regulaci ženskými pohlavními hormony. Jejich prognostická a prediktivní hodnota je využívána k efektivnímu podání hormonální systémové léčby (Tamoxifen, inhibitory aromatázy). Proto jejich přesné a spolehlivé stanovení má stále prvořadý význam. Stanovení ER a PR se provádí nejen ve vzorku primárního nádoru, který je imunohistochemicky vyšetřen, ale současně se přítomnost těchto receptorů vyšetřuje v CTC pomocí RT-PCR metody. ER a PR v kombinaci s HER-2 slouží k identifikaci základních podtypů karcinomu prsu pomocí DNA microarray. Pomocí této metody bylo charakterizováno 5 základních podtypů karcinomu prsu:

1. ER a/nebo PR pozitivní / HER-2 negativní (tzv. **Luminal A**)
2. ER a/nebo PR pozitivní / HER-2 pozitivní (tzv. **Luminal B**)
3. ER i PR negativní / **HER-2 pozitivní**
4. ER i PR negativní / HER-2 negativní / EGFR pozitivní a/nebo cytokeratin 5/6 pozitivní (tzv. **Basal like** – typická je vysoká proliferační aktivita, vysoký grade a špatná prognóza)
5. ER i PR negativní / HER-2 negativní / EGFR negativní / cytokeratin 5/6 negativní (tzv. **Normal like – triple negativní**).



Obrázek 6: Expres ER, PR, HER2 receptoru u jednotlivých subtypů karcinomu prsu. Převzato od Sandhu R Labmedicie 2010.

Jak bylo již zmíněno, epiteliální – mezenchymální tranzice se velmi významně uplatňuje na změně fenotypových charakteristik nádorových buněk v průběhu metastatického procesu. Nejčastěji sledovanými markery souvisejícími s EMT jsou vimentin, N-cadherin, TGF β a transkripční faktory jako Twist, Snail, Slug and Sip1. Vimentin, patřící do skupiny intermediálních filament, je za běžných podmínek exprimován mezenchymálními buňkami a zapojuje se do migrace epiteliálních buněk v průběhu jejich vývoje (37). Expres vimentinu v nádorových buňkách zvyšuje jejich migraci a invazivitu a současně je charakteristikou epiteliálních buněk, které podstupují EMT (38). V důsledku EMT dochází v nádorových buňkách ke změně exprese E-cadherinu na expresi N-cadherinu. Mohou nastat i situace, kdy se expres E-cadherinu významně nezmění, ale buňky i přesto zvýšeně exprimují N-cadherin. V některých případech může také dojít k tomu, že ostatní cadheriny nahradí nebo jsou současně exprimovány s E-cadherinem (např. R-cadherin, cadherin 11, T-cadherin a P-cadherin). Přítomnost nevhodných cadherinů může modifikovat chování nádorových buněk (39). TWIST1 je transkripční inhibitor genu pro E-cadherin. U řady nádorových buněk byla zjištěna zvýšená expres TWIST1 vedoucí k rezistenci těchto buněk k paklitaxelu a vinkristinu prostřednictvím vazby na Akt promotor a zvýšení jeho transkripční aktivity (40). Zvýšená regulace TWIST1 navíc podporuje expresi VEGF uplatňující se v procesu novotvorby krevního zásobení nádoru. Dále pak HIF-1 α reguluje expresi TWIST1

prostřednictvím přímé vazby na hypoxický responzivní element v proximálním promotoru TWIST1 (29).

Dalším specifickým molekulárním markerem pro detekci CTC u pacientek s karcinomem prsu je mammaglobin A. Přítomnost buněk s pozitivitou CK19mRNA a MGB1mRNA v periferní krvi predikuje horší DFS u žen s časným karcinomem prsu. Pomocí tohoto markeru by bylo možné monitorovat pacientky během a po ukončení léčby (41). Nedávná studie poukázala na vliv epigenetického působení na tumor supresorové a metastatické supresorové geny v CTC izolovaných z periferní krve pacientek s karcinomem prsu. Metylační analýza DNA získané EpCAM dependentní imunomagnetickou separací CTC prokázala, že cystatin M (CST6) působí jako nádorový supresor u karcinomu prsu, stejně jako BRMS1 (breast cancer metastasis suppressor 1) a SOX17. Tyto molekuly sehrávají tumor supresorovou úlohu prostřednictvím potlačení signalizační dráhy Wnt a právě promotorové sekvence těchto molekul jsou vysoce metylovány (42-44). Tyto výsledky přispěly novým rozměrem k molekulární charakterizaci CTC a mohou pomoci při objasnění získávání maligních vlastností včetně fenotypu kmenových buněk.

1.3.5 Izolační a detekční systémy CTC

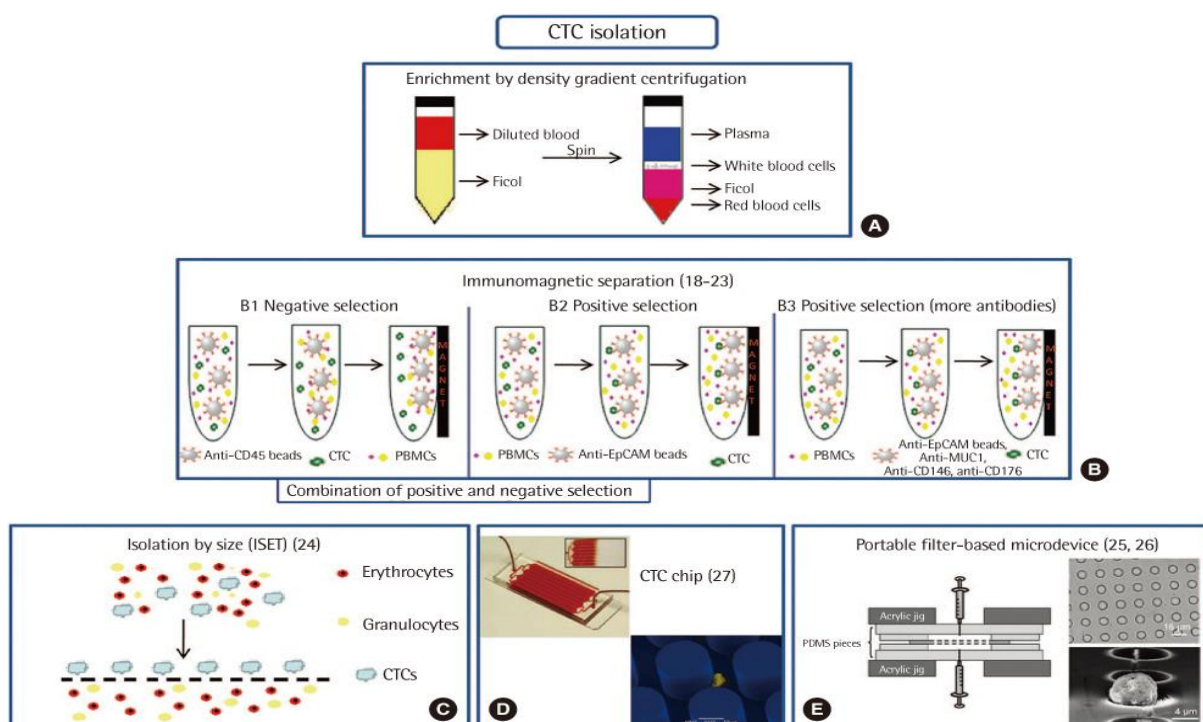
Stanovení a molekulární charakteristika cirkulujících nádorových buněk představují novou diagnostickou oblast zejména u pacientek s pokročilým stadiem nádoru prsu, ale stále více pozornosti se věnuje i pacientkám s časným nádorem prsu. Vzhledem k tomu, že CTC jsou v periferní krvi ve velmi nízké koncentraci a dostupnost vzorků v dostatečném množství je omezená, metody používané pro jejich izolaci a detekci se potýkají s řadou nelehkých analytických a technických překážek. V klinických aplikacích využívajících detekce ojediněle se vyskytujících nádorových buněk je důležité, aby použitá metoda byla schopná detekovat buňky v omezeném objemu a rozlišit tyto buňky od ostatních buněk včetně buněčného odpadu (zbytků apoptických buněk). CTC jsou velmi ojedinělé a jejich rozložení odpovídá Poissonově distribuci. Poissonova distribuce se uplatňuje v případě, kdy náhodně rozložené objekty (buňky) jsou počítány v určitém intervalu nebo objemu. V případě CTC, limit detekce není omezen přidáním dodatečných identifikátorů nebo vylepšením přístroje, ale množstvím krve, která je použita pro stanovení přítomnosti CTC. S tímto omezením musí být tedy počítáno před začátkem jakékoli analýzy a zejména v případě časných stádií nemoci (45).

Současný pokrok ve vývoji nových technologií umožňuje rozdělit tyto metody do dvou základních skupin dle využití fyzikálních (velikost, hustota, elektrický náboj, atd.) a biologických vlastností CTC (exprese povrchových proteinů, životaschopnost). Většina

technologií pro specifickou detekci CTC využívá kombinace dvou kroků: obohacení (enrichment) a detekci CTC.

Metodické přístupy k obohacení CTC

Metody využívající fyzikálních vlastností buněk umožňují získat obohacené frakce buněk bez jejich označení a narušení buněčného povrchu, čímž jsou získány životaschopné buňky. Mezi tyto metody patří: gradientová centrifugace využívající rozdělení buněk dle jejich hustoty pomocí separačního média o známé hustotě (např. Ficoll, OncoQuick), filtrace buněk s využitím speciálních filtrů (ISET metoda – izolace epiteliálních nádorových buněk dle jejich velikosti, ScreenCell® - filtrace CTC přes mikroporézní membránu), biochip využívající rozdílnost ve velikosti a deformovatelnosti nádorových buněk (jsou větší a tužší ve srovnání s krevními buňkami), mikrofluidní průtokové frakcionační zařízení (pMOFF) – CTC jsou izolovány na základě hydrodynamických sil a velikosti buněk od krevních buněk na chipu s dilatačními/expanzivními mikrokánálky, fotoakustický průtokový cytometr a separace buněk pomocí dielektroforézy (DEP) – umožňuje separaci živých buněk na základě jejich odlišné odpovědi na DEP kvůli rozdílné velikosti a membránových vlastnostech.



Obrázek 7: Přehled metod používaných k separaci CTC z periferní krve. Převzato a upraveno podle Lianidou E and Markou A, Lab Med Online 2012.

Další skupinu metod používaných pro obohacení CTC představuje imunomagnetická separace. Metoda využívá imunitní reakci založenou na interakci mezi specifickými protilátkami a tumor-asociovanými antigeny případně antigeny epiteliálního původu (pozitivní selekce) nebo povrchových antigenem leukocytů CD45 (negativní selekce). Protilátky jsou konjugovány s magnetickými kuličkami a vzniklý komplex protilátky a antigenu je následně izolován v prostředí magnetického pole. Tyto metody nejčastěji používají protilátku proti EpCAM molekule. Nicméně, některé nádorové buňky vykazují velmi nízkou nebo dokonce žádnou expresi EpCAM, v tomto případě nemohou být detekovány EpCAM negativní CTC. Nově bylo publikováno použití kombinace anti-CD146 a EpCAM pro zlepšení detekce CTC u pacientek s nádorem prsu (46). Ke zvýšení míry detekce došlo i při použití protilátky anti-CD176 (47). Mezi metody založené na EpCAM patří: CellSearch® System (Veridex) – jediná technologie povolená FDA v USA pro detekci CTC u pacientek s metastatickým karcinomem prsu a označovaná jako zlatý standard pro všechny nové metody stanovující CTC. Dalším příkladem je AdnaTest® BreastCancer (Adnagen) využívající pro separaci CTC magnetické kuličky konjugované s dvojicí protilátek – anti-MUC1 a anti-EpCAM. Vedle těchto nejrozšířenějších technologií byla vyvinuta další vysoce senzitivní a reprodukovatelná metoda založená na použití protilátky anti-CK samostatně nebo v kombinaci s anti-EpCAM. K zobrazení a analýze CTC je použito automatické snímání obrázku buněk na skleněných sklíčkách pomocí Ariol® systému (48).

Jinou možnost získání obohacené frakce CTC představuje MagSweeper technologie. Ta je založena na imunomagnetická separaci cirkulujících epiteliálních nádorových buněk (CEpCs), které mohou být následně použity pro molekulární analýzu. V průběhu separačního procesu jsou nejdříve krevní vzorky naředěny a pre-inkubovány s magnetickými kuličkami. Vzorky jsou poté rozděleny do jamek. Do těchto jamek jsou následně ponořeny magnetické tyče obalené plastovým obalem. Tyče se v jamkách pohybují v soustředných kruhových smyčkách na úrovni 1,5 mm nad dnem jamky. V průběhu tohoto pohybu dochází k zachycení označených buněk na tyto magnetické tyče. Jakmile dojde k projití celého prostoru jamky, opláštěné magnety jsou omyty, tak aby došlo k odstranění kontaminujících, neoznačených a adherujících buněk. Magnetické tyče se dále umístí do nového pufru a uvolní se z plastových obalů. Vnější magnety umístěné pod jamkami umožní zakoncentrování označených buněk (49).

V současné době dochází k rozvoji nejmodernějších analytických mikrofluidních zařízení (CTC chipů) pro zachycení CTC při práci s velmi malými objemy krve. Tyto chipy využívají laminárního proudění, které kontroluje a manipuluje s kapalinou proudící skrz toto

zařízení. Chip je vyroben litografickou metodou a na povrchu má speciálně vytvořené mikrosploty nebo nověji povrchové brázdy nebo struktury ve tvaru rybích kostí (herringbone-chip)(50). Tyto struktury jsou strategicky umístěny ve tvaru rovnostranného trojúhelníku na chipu, tak aby byl maximalizován kontakt mezi spoty a procházejícími buňkami. Prvním mikrofluidním zařízením byl chip obsahující mikrosploty pokryté anti-EpCAM protilátkou (51). Nedávno byl představen nový chip „Ephesia“, obsahující sloupce s biofunkčními superparamagnetickými kuličkami samostatně uspořádanými v mikrofluidním kanálu na něž působí magnetické pasti. Ephesia umožňuje nejen imunomagnetické třídění buněk, ale i konfokální a fluorescenční mikroskopii v kombinaci s morfologickou a imunofenotypovou analýzou jedné buňky (52). Nejnověji byl představen mikrofluidní chip založený na mikro-Hall detektoru, který umožňuje přímo měřit jednotlivé, imunomagneticky označené buňky v přítomnosti velkého množství krevních buněk a nenavázaných reaktantů, přičemž nepotřebuje žádný promývací či purifikační proces. Navíc je zde použit panel magnetických nanopartikulí, které se odlišují svými jedinečnými magnetickými vlastnostmi. Tento panel umožňuje současně stanovit biomarkery EpCAM, HER2/*neu* a EGFR na úrovni jedné buňky (53). Pro třídění CTC s nedostatečnou expresí EpCAM je používán koktejl protilátek proti různým epiteliálním povrchovým antigenům (HER2, MUC1, EGFR, TROP-2), mezenchymálním antigenům či antigenům kmenových buněk (c-MET, N-cadherin, CD318)(54).

Vedle mikrofluidních zařízení se objevují i mikrofiltrační zařízení pro rozdělení buněk dle jejich velikosti. Účinnost této metody je na rozdíl od mikrofluidních zařízení limitována poměrně širokým rozmezím velikosti CTC, které mohou u jednoho pacienta mít v průměru 4 – 30 μm . Navíc při filtračním procesu dochází často ke kontaminaci frakce CTC leukocyty. CTC, které jsou menší než je otvor na membráně, jím mohou projít a proto často mohou být v průběhu procesu ztraceny. Proto byl navržen nový způsob, při kterém je většina CTC pokryta velkým počtem mikrokuliček, které zvětšují jejich velikost a tím usnadňují jejich odlišení od leukocytů. K dosažení účinného a selektivního označení CTC z periferní krve byl použit mikrofluidní mixér. Vytvořením sekundárního vířivého proudu (tzv. Taylor-Gortler – proud kolmý na přímý tok v mikrofiltračním zařízení) byly CTC pokryty mikrokuličkami konjugovanými s anti-EpCAM. Po nepřetržitém značení, zvětšené CTC byly zachyceny na mikrofiltru, zatímco všechny leukocyty jím prošly (55).

Mikrofluidní a mikrofiltrační zařízení představují *in vitro* (*ex vivo*) metodologický přístup izolace a detekce CTC v periferní krvi pacientů. V nedávné době byl vyvinut *in vivo* způsob záchytu CTC. Tento systém využívá nerezového lékařského drátku o průměru 0,5 mm

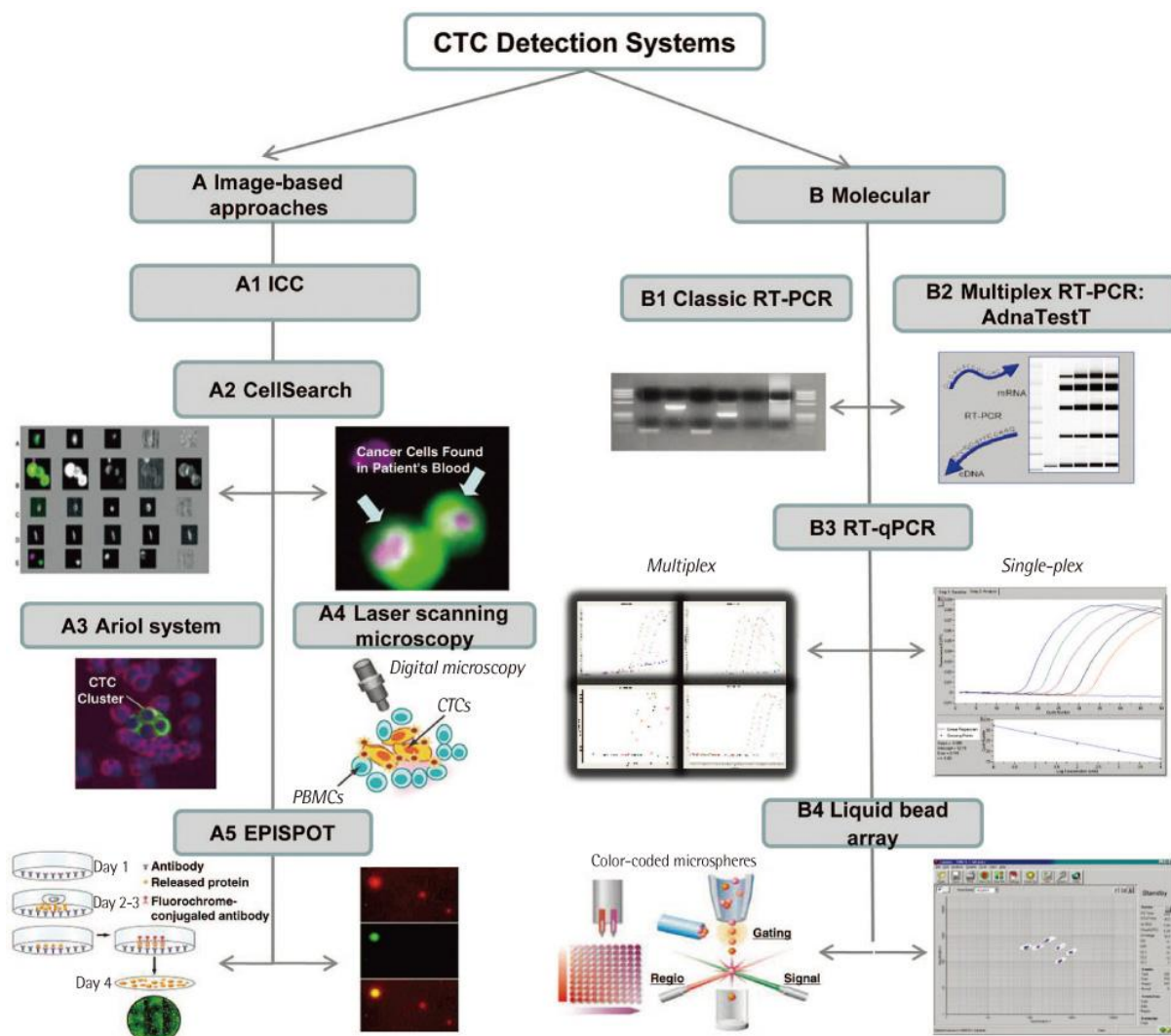
a délce 160 mm. Prvních 20 mm drátku je potaženo 2 μ m silnou vrstvou zlata, na kterou je nanášena vrstva hydrogelu. Karboxylové skupiny přítomné v hydrogelu jsou aktivovány EDC (1-ethyl-3-(3-dimethyl-)karbodiimidu) a NHS (N-hydroxysukcimidu) a umožňují navázat prostřednictvím kovalentní vazby chimerické protilátky anti-EpCAM. Tento zdravotnický prostředek je zaveden přes standardní kanylu do loketní žíly, kde je ponechán po dobu 30 minut. Nádorové buňky cirkulující v periferní krvi pacientů jsou vychytávány z proudící krve *in vivo*. Poté je prostředek odstraněn ze žíly a CTC jsou identifikovány imunocytochemickým barvením za použití protilátky proti EpCAM a/nebo cytokeratinu a jádra a jsou kvantifikovány (56).

Metodické přístupy k detekci CTC

Získaná obohacená frakce CTC obvykle stále obsahuje neurčité množství leukocytů a je tedy potřebné použít metodu, která je schopná identifikovat CTC na úrovni jedné buňky a odlišit nádorovou buňku od kontaminujících buněk periferní krve. Detekce CTC probíhá nejčastěji těmito způsoby: 1) imunocytochemická (ICC) detekce specifických antigenů; 2) molekulární analýza nukleových kyselin CTC; 3) detekce nádorově specifických proteinů produkovaných CTC.

Imunocytochemická detekce charakterizuje izolované CTC prostřednictvím fluorescenčně značených protilátek zejména proti epiteliálnímu antigenu jako je CK-19. Pro jejich zobrazení se nejčastěji používá Ariol systém nebo laserová skenovací cytometrie (LSC). Nejčastěji používaným systémem založeným na kombinaci ICC a imunofluorescence je CellSearch system®. Pro detekci CTC jsou použity markery pro: cytokeratin (CK-19), leukocyty (CD45) a buněčné jádro (DAPI). Pomocí vícebarevné zobrazovací analýzy za použití fluorescenčního mikroskopu jsou CTC definovány jako CK⁺/CD45⁻/DAPI⁺ buňky. Tento systém získal povolení FDA pro detekci CTC u metastatického nádoru kolorekta, prostaty a prsu. Dále je dostupná metoda LSC kombinující rychlost průtokové cytometrie s možností morfologické analýzy každé pozitivní buňky. Pomocí této metody je možné analyzovat až 50 tisíc buněk během 30 minut. Enrichment metodou (magnetická separace) bylo dosaženo zakoncentrování buněk 10 tisíc krát (57). Kromě těchto metod byla nově vyvinuta imunofluorescenční protokol pro multimarkerovou zobrazovací analýzu využívající DyLight technologie. Díky tomuto novému způsobu je možné použít několik protilátek značených fluorochromy odlišných barev a pomocí spektrální zobrazovací analýzy rozdělit jejich barevná spektra. Tento protokol může usnadnit detekci a fenotypovou charakteristiku

diseminovaných nádorových buněk. Kromě toho přidáním dalších markerů by bylo možné zhodnotit expresi určitých terapeutických cílů u různých subpopulací CTC (58).



Obrázek 8: Přehled metod používaných k detekci a charakterizaci CTC. Převzato a upraveno podle Lianidou E and Markou A, Lab Med Online 2012.

Molekulární detekce je zaměřena na stanovení specifické mRNA a představuje velice používanou alternativní metodu k imunocytochemickému stanovení CTC. Tento přístup umožňuje analyzovat velké množství genů. V klinických studiích je nejčastěji používaná mRNA kódující CK. Limitací této metody představuje skutečnost, že některé transkripty (např. CK18, CK19, CK20, MUC1 a PSA) mohou být produkovány normálními buňkami krve či kostní dřeně (59). Použití kvantitativní PCR (qPCR) s přesně stanovenými hodnotami cut-off napomáhá vyřešit tento problém. Navíc exprese některých genů může být v CTC snížena např. v důsledku EMT procesu (60). Často je tedy vhodné použít multimarkerovou

analýzu. Díky molekulární detekci je možné stanovit nízké počty CTC prostřednictvím vysoce senzitivních esejí. Zatím není možné tímto přístupem stanovit přesné počty CTC přítomných v analyzovaném vzorku. Největší uplatnění nachází při sledování molekulárních charakteristik nádorových buněk. V řadě evropských studií zaměřených na detekci CTC je používán komerčně dostupný test založený na stanovení specifické mRNA CTC. Jedná se o AdnaTest™ (Adnagen). Tento test je kombinací imunomagnetická separace CTC z periferní krve a multiplex RT-PCR detekující transkripty epiteliálních či nádorově specifických genů. Detekce CTC je založena na průkazu nejméně jednoho z genů HER2, MUC1 a EpCAM(61). Nedávno byl popsán nový způsob multimarkerové analýzy CTC pomocí liquid bead array. Princip metody spočívá v použití fluorescenčně značených polystyrenových kuliček (mikrosfér) konjugovaných se specifickou próbou. mRNA izolovaná z imunomagneticky obohacených CTC je podrobena multiplex PCR pro CK19, HER2, MGB1, MAGEA3, TWIST-1, HMBS. Inkubací označené próby s biotinylovaným amplikonem vzniká komplex, který je následně dekódován před kuličky průtokovým cytometrem Luminex. Tato metodu umožňuje současně stanovit 6 genů ve velmi malém množství vzorku (62).

V současné době existují a nově vznikají panely genů používané ke stanovení rizika rekurence onemocnění a k individualizaci léčebného postupu. U pacientek s nádorem prsu jsou k dispozici šest prognostických genomických testů. Mezi ně patří Oncotype Dx™, MammaPrint®, Genomic Grade Index, PAM50 (ROR-S), Breast Cancer Index a EndoPredict. Ze stanoviska pracovní skupiny IMPAKT 2012 vyplývá, že pouze Oncotype Dx™ a MammaPrint® mají dostatečnou analytickou a klinickou validitu. Zatím ale žádný z výše uvedených testů neprokázal zásadní důkazy o jejich klinické prospěšnosti. Nebylo dokázáno, že by změna léčby na základě výsledku testu vedla ke zlepšení klinických výsledků (63). Oncotype Dx™ umožňuje stanovit 16 tumor-asociovaných genů a 5 referenčních genů a podstatně rozsáhlejší MammaPrint® analyzuje 70 genů. Uvedené panely genů sledují nejčastěji geny uplatňující se proliferaci a onkogenní transformaci, potlačující expresi růstových faktorů, ovlivňující získání rezistence vůči apoptóze, měnící metabolismus buněk v hypoxickém mikroprostředí, působící nekontrolovatelný buněčný cyklus, snižující expresi angiogenních faktorů, zodpovědná za tkáňovou invazi a metastazování, geny pro estrogenové a progesteronové receptory a HER2 a řadu dalších (64).

V průběhu stanovení CTC je velmi důležité zjistit, zda detekované CTC jsou životaschopné či apoptické. Jen životaschopné buňky mohou přispět k metastatickému procesu. Pomocí EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT) technologie je možné detekovat pouze životaschopné CTC a stanovit nádorově specifické proteiny uvolněné těmito sekretujícími

buňkami. Imunospoty představují proteinové otisky prstů vytvořené pouze životaschopnými buňkami. Tento způsob zamezuje přímému kontaktu s cílovými buňkami, může být kombinován s jakoukoli enrichment metodou a vyžaduje pouze krátkodobou kultivaci (24 – 48h) pro zhodnocení sekrece proteinů (65). Použitím této metody bylo sledováno, zda CK19, jeden z hlavních cytoskeletálních proteinů epitelálních buněk, je z životaschopných nádorových buněk uvolněn ve zkrácené nebo skutečné délce. Studie ukázala, že životaschopné CTC uvolňují CK19 ve skutečné délce a tyto buňky mohou představovat biologicky aktivní podskupinu nádorových buněk prsu s vysokým metastatickým potenciálem (66). Některé z výše uvedených metod jsou detailněji popsány v Příloze č. 1.

1.4 Klinické využití cirkulujících nádorových buněk

1.4.1 Cirkulující nádorové buňky u nádorových onemocnění

Cirkulující nádorové buňky poskytují novou příležitost, pomocí které, by bylo možné hodnotit biologické rysy nádoru opakovaně v průběhu vývoje onemocnění a urychlit tak výběr nejhodnější specifické léčebné modalit pro individuálního pacienta (67).

Klinický význam CTC může být potvrzen prostřednictvím klinických studií specificky navržených tak, aby poskytl dostatek důkazů, že průkaz CTC může být použit pro:

1. odhad rizika metastatického relapsu nebo progresi metastazování (CTC jako prognostický a prediktivní marker),
2. stratifikaci pacientů a monitorování účinnosti léčby v reálném čase (CTC jako marker odpovědi na léčbu),
3. identifikaci a charakteristiku potenciálních terapeutických cílů,
4. vznik rezistence k léčbě a její mechanismus,
5. pochopení metastatického vývoje u pacientů s nádorovým onemocněním.

Počet CTC v krevním oběhu u pacientů s metastatickým nádorovým onemocněním má prognostický význam pro celkové přežití, jak bylo prokázáno klinickými studiemi zejména u metastatického karcinomu prsu, prostaty a kolorektální karcinomu (68-70). První prognosticky významnou studii zaměřenou na prognostickou hodnotu CTC u pacientek s metastatickým karcinomem prsu publikovala skupina Massima Cristofanilliho v roce 2004. Výskyt CTC byl u 177 pacientek s metastatickým karcinomem prsu testován před zahájením nové linie léčby (hormonální, chemoterapeutické nebo jiné) a dále pak při první návštěvě sledování. Zjistili, že pacientky s hladinou CTC ≥ 5 na 7.5ml krve ve srovnání s pacientkami

s hladinou CTC <5 na 7.5 ml krve mají kratší PFS (2.7 měsíce vs. 7 měsíců, $P < 0.001$) a kratší OS (10.1 měsíce vs. >18 měsíců, $P < 0.001$). Multivariační analýzou, zahrnujících molekulární a klinické prognostické faktory, zjistili, že počet CTC je silným nezávislým prognostickým faktorem (71).

U metastatického karcinomu prostaty proběhla klinická studie IMMC38 zahrnující 164 pacientů před zahájením první linie chemoterapeutické léčby (81 % léčeno docetaxelem, zbývající část léčena režimem obsahujícím docetaxel). Počet CTC ≥ 5 na 7.5 ml krve před zahájením léčby byl asociován s významně zkráceným přežíváním ve srovnání s pacienty s CTC <5 na 7.5 ml krve (11.5 měsíce vs. 21.7 měsíců, $P < 0.001$). Navíc bylo prokázáno, že počet CTC je lepším indikátorem přežití než hladina prostatického specifického antigenu (PSA) (70, 72). V rámci studie IMMC38, byla jako první provedena korelace počtu CTC s klinickým výsledkem. Pacienti s mCRPC, kteří měli před zahájením léčby vyšší počet CTC a po chemoterapii došlo k jejich výraznému poklesu, měli výrazně lepší klinický výsledek než pacienti, jejichž počet CTC se v průběhu léčby nezměnil. Tyto výsledky byly validovány v randomizované klinické studii 3. fáze, která vedla ke schválení používání CYP-17 inhibitoru abirateronu (Zytiga, Janssen, Biotech) (73).

U pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem byla publikována prospektivní studie zahrnující 430 pacientů sledovaných před zahájením nové linie chemoterapeutické léčby, kteří byli stratifikováni dle detekovaného počtu CTC ≥ 3 na 7.5 ml krve a < 3 na 7.5 ml krve. U pacientů s nepříznivou prognózou byl zjištěno zkrácené celkové přežívání (9.4 měsíce vs. 18.5 měsíců, $P < 0.0001$) a také doba přežití bez progresu (4.5 měsíce vs. 7.9 měsíců, $P < 0.001$).

Výsledky klinického ověření prognostické hodnoty CTC byly publikovány nově již u pokročilých stádií dalších nádorových onemocnění a to např. u nádoru plic (74, 75), melanomu (76), nádorů v oblasti hlavy a krku (77) a nádor slinivky břišní (78).

Dříve se předpokládalo, že pouze z invazivních nádorů může docházet k uvolňování izolovaných nádorových buněk do krevního oběhu a lymfatických cest. Nejnovější studie poukazují na možnou diseminaci nádorových buněk dokonce u karcinomů *in situ* (79, 80). To by znamenalo, že nádorové buňky mohou diseminovat již z pre-invazivních mammárních lézí nebo ze skrytých invazivních nádorů nebo dokonce se může jednat o časný krok mikroinvaze z pre-invazivních lézí. Proto se v současné době výzkumné aktivity zaměřují na detekci a charakterizaci CTC u časných stádií nádorových onemocnění. Jako příklad je možné uvést studii zahrnující 735 pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří byli indikováni z léčebných

důvodů k chirurgickému zákroku. U pacientů s detekovatelnými CTC bylo zjištěno významně horší celkové přežití a zkrácen čas do relapsu nemoci (81).

Z výše uvedených publikací je zřejmé, že detekce CTC je silným prognostickým parametrem u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním a dynamika změn CTC může napomoci ke stratifikaci těchto pacientů. U časných stádií nádorových onemocnění zatím ještě není dostatek klinicky podložených výsledků, nicméně je možné, že v budoucnosti bude možné použít detekci CTC jako nástroj pro monitorování minimální reziduální choroby.

1.4.2 Klinický význam CTC u patientek s karcinomem prsu

Prognostická hodnota CTC

U patientek s metastatickým karcinomem prsu je používána prognostická cut-off hranice odpovídající 5 CTC v 7.5 ml periferní krve. U časných stádií karcinomu prsu jsou počty detekovatelných CTC často výrazně nižší a mnohdy nepřesáhnou 5 CTC v 7,5 - 10 ml krve (82). Bylo prokázáno, že přítomnost pouze jedné nádorové buňky u časného nádoru prsu je asociována se zvýšeným rizikem metastáz (83). Německá studie SUCCESS poukázala, že u 10 % patientek před zahájením adjuvantní léčby je možné detekovat více než jednu CTC. U 7 % patientek byla zjištěna perzistentní negativita CTC při opakovaných odběrech související s výrazně lepší prognózou onemocnění. Do této studie bylo zahrnuto více než 1700 patientek jak s pozitivitou lymfatických uzlin také i vysoce rizikových patientek s negativitou lymfatických uzlin bez metastáz indikovaných k adjuvantní chemoterapeutické léčbě taxany (84).

CTC jako marker odpovědi na léčbu

Vliv protinádorové terapie na změny počtu CTC je velmi intenzivně studován v řadě klinických studií, jejichž cílem je ověření použití detekce CTC jako nástroje pro sledování léčebné odpovědi. Ukázalo se, že přetrvávání CTC v průběhu léčby může reflektovat selhání systémové terapie (85). Naopak, dojde-li k poklesu nebo je-li udržován stejný počet CTC, je možné toto považovat za ukazatel dobré léčebné odpovědi. Dále bylo zjištěno, že CK19mRNA pozitivní CTC po adjuvantní léčbě patientek s časným nádorem prsu jsou nezávislým rizikovým faktorem pro rezistentní reziduální chorobu (86). Ve studii REMAGUS02 počet CTC u patientek s nemetastatickým karcinomem prsu před a po primární systémové léčbě byl nezávislým prognostickým faktorem pro kratší MFS (metastasis free survival) (87).

Ve studii GEPARQuattro, bylo sledováno, zda je možné CTC použít jako indikátor účinnosti léčby. Výsledky naznačují, že prevalence pacientek s pozitivitou CTC před zahájením neoadjuvantní léčby byla 22% a po jejím ukončení došlo k poklesu na 11% (88). Časná detekce progresu onemocnění založená na průkazu CTC může napomoci při změně léčebného postupu u individuálních pacientek. Řada probíhajících studií se snaží zhodnotit potenciální klinický prospěch vycházející ze změny terapeutického režimu právě na základě detekce CTC. Randomizovaná studie SWOGS0500 hodnotila změnu léčebného postupu u pacientek s metastatickým karcinomem prsu. Pacientky byly v první linii léčeny anti-HER2 (trastuzumab terapií a následně duální anti-EGFR a anti-HER2 terapií (lapatinib). Změna v terapii vedla k depleci EGFR-pozitivních CTC a byla pozorována odpověď primárního nádoru. Progrese nádoru souvisela s rekurencí CTC, které byly HER2 a EGFR negativní (89).

Výběr léčby a monitorování vzniku rezistence

Tradiční metoda stratifikace pacientů dle rizika vzniku vzdálených metastáz je založena na klinických a patologických rysech primárního nádoru (grade, velikost, postižení lymfatických uzlin). Díky molekulární charakterizaci jsou pro primární nádory získávány navíc informace o expresi specifických genů a hladinách nádorových markerů, na jejichž základě je možné identifikovat agresivní nádory s vysokou proliferační aktivitou. Nově objevené nádorové specifické geny jsou zdrojem pro vývoj cílených protinádorových léčiv, jejichž účinky jsou testovány v řadě klinických zkoušek zaměřených na personalizovanou medicínu. Právě stanovení CTC je často také součástí klinických zkoušek, jejichž závěry stanoví, zda detekce a charakterizace CTC bude vhodným nástrojem pro hodnocení odpovědi na léčbu nebo její selhání (CTC jako náhradní (surrogate) marker).

Detekce CTC sehrává velkou úlohu v individualizaci léčebného procesu a to zejména jako vhodný způsob pro sekvenční monitorování průběhu nemoci jednotlivých pacientek a molekulární charakterizaci CTC zejména pro terapeutické cíle (HER2, EGFR, VEGF) nebo mutace zodpovědné za rezistenci k cílené biologické léčbě. U části pacientek, které jsou léčeny anti-HER2 terapií může v adjuvantním režimu dojít k selhání léčby projevující se jako recidiva či progresu onemocnění. V rezistenci na trastuzumab se uplatňuje snížená exprese proteinu PTEN. Trastuzumab v senzitivních nádorových buňkách narušuje vazbu Src na HER2, čímž umožní inhibici AKT proteinem PTEN. Dochází tak k zastavení růstu buněk. Pacientky s deficitem PTEN měly omezený prospěch z léčby trastuzumabem, ve srovnání s pacientkami s normální aktivitou tohoto proteinu. Rezistence na trastuzumab může být mimo jiné způsobena i aktivací alternativních signálních drah. Jedná se např. o signální dráhu

insulinového růstového faktoru (IGF). Aktivací receptoru pro IGF dochází k buněčné proliferaci a procesu metastazování. Právě IGF-IR může být mediátorem vzniku této rezistence (90).

Molekulární charakterizace CTC

CTC představují cenný zdroj pro molekulární charakterizaci nádorů u jednotlivých pacientů. Genomické a proteomické analýzy jsou používány pro detekci přítomnosti či absence klíčových signálních orogenních aberací právě v CTC. Pomocí cytogenetických studií založených na fluorescenční *in situ* hybridizaci byla odhalena variabilita mezi CTC, nádorovou metastázou a primárním nádorem při sledování změny počtu kopií studovaného genu (91). Specifická analýza transkriptomu CTC ukázala, že během léčby pacientek s karcinomem prsu je možné detekovat relativní změny v expresi epiteliálních a mezenchymálních markerů v CTC a tento nálezn byl korelován s odpovědí na léčbu a prognózou nemoci (92).

Je známo, že nádor obsahuje subpopulace nádorových buněk lišících se fenotypovými i genotypovými vlastnostmi. V důsledku působení systémové léčby na tyto buňky může docházet ke změnám vedoucím k vzniku lékové rezistence. Tato informace může být důležitá, pokud bychom chtěli hodnotit přítomnost prediktivního markeru v určitý specifický čas podání nové linie léčby nebo bychom chtěli vyšetřit bioptický vzorek nádoru odebraného v časném stádiu onemocnění. Studie zahrnující 254 pacientek s karcinomem prsu se zaměřila na stanovení exprese HER2 v CTC. Výsledky ukázaly, že u téměř třetiny pacientek byla detekována zvýšená exprese HER2 ve srovnání s expresí HER2 v primárním nádoru. Toto zjištění má velký klinický význam, vzhledem k tomu, že HER2 je prediktivním markerem odpovědi na léčbu anti-HER2 terapií u karcinomu prsu (93, 94).

1.4.3 Potenciál cirkulujících nádorových buněk v budoucnosti

Perspektivní využití cirkulujících nádorových buněk spočívá zejména na molekulární charakterizaci těchto buněk. V personalizované medicíně nebude pro ošetřujícího lékaře dostatečná informace o přítomnosti a počtu nádorových buněk, ale právě molekulární charakter nádorových buněk. Získáním informací týkajících se exprese specifických genů těmito buňkami, mutací onkogenů a tumor supresorových genů, epigenetických změn či chromozomálních aberací usnadní identifikaci nových terapeutických cílů. Tyto nové terapeutické cíle napomohou k vývoji cílených léčiv zabráňujících metastatické šíření nádorových buněk a preventivně působících proti metastatickému relapsu onemocnění.

Odhalení a studium těchto terapeutických cílů napomůže k pochopení mechanismu vzniku rezistencí k léčebným modalitám a také k porozumění biologických procesů metastatického vývoje u pacientů s nádorovým onemocněním. Vzhledem ke stále se zvyšujícímu počtu nově vyvíjených metod pro detekci a charakterizaci buněk bude nezbytné zavedení systému externí kontroly kvality včetně validace v rámci mezilaboratorního srovnávání. Bude nezbytné stanovit nejvhodnější metodu pro enumeraci a charakterizaci CTC a také vybrat klinicky akceptovatelný přístup jejich stanovení. Dosud stále zůstává nenaplněnou klinickou potřebou stanovení heterogenity buněk uvnitř nádoru jako nástroje pro individualizaci léčebných postupů. Pomocí nových technologií, jako je Next Generation Sequencing (NGS) a proteomika, bude možné odhalit heterogenní mutaci a sledovat vývoj jednotlivých subpopulací nádorových buněk. Předpokládá se, že tyto cenné informace přispějí k pochopení, proč u pacientů s nádorovým onemocněním nacházíme odlišné odpovědi na léčbu v různých metastatických ložiscích při podávání cílené terapie. Analýza CTC, jako minimálně invazivní přístup, napomůže k individualizaci léčebných postupů a k personifikaci přístupu k nemocným (102).

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Karcinomem prsu je v současné době ohrožena každá osmá žena v České republice. V současné době je karcinom prsu považován za systémového onemocnění, proto může docházet i u pacientek s velmi malým solidním nádorem k časně diseminaci nádorových buněk. Tyto nádorové buňky mohou setrvávat v krevním či lymfatickém oběhu (cirkulující nádorové buňky – CTC) a mohou tak přispět k progresi onemocnění, nebo naopak přetrvávat v klidovém stavu v kostní dřeni (diseminované nádorové buňky – DTC). Až po několika letech mohou přispět k relapsu nemoci. Proto identifikace a molekulární charakterizace u pacientek s časným nádorem prsu může mít výrazný vliv na stanovení prognózy a individualizaci léčebných postupů.

Prognostická hodnota a význam stanovení CTC u metastatického karcinomu prsu a nově i u časného karcinomu prsu jsou podloženy výsledky řady studií. Díky rozsáhlému výzkumu a použitím nových technologií v oblasti nádorových buněk, je v současné době možné detekovat CTC v periferní krvi pacientek v rozmezí 9 – 50 %. Jednotlivé studie se však liší použitím odlišných detekčních přístupů a zařazením pacientek s různými klinickými stádii nemoci.

Odběr periferní krve představuje neinvazivní způsob získání vzorku a oproti odběru kostní dřene pro pacientku je podstatně méně invazivním a bolestivým. Opakované odběry periferní krve pro detekci CTC mohou být použity k monitorování změny či úplného vymizení CTC z krevního řečiště. Vzhledem k tomu, že CTC v cirkulaci přežívají jen krátkou dobu (2,4h), je nepravděpodobné, detekovat CTC v po sobě následujících odběrech periferní krve, pokud by nedocházelo k trvalému uvolňování nádorových buněk z primárního nádoru do krevního oběhu.

Metody stanovení CTC v periferní krvi se potýkají se dvěma zásadními problémy. Jedním z nich je velmi nízká koncentrace CTC v porovnání s vysokou koncentrací ostatních buněk periferní krve. Pomocí imunomagnetické separace dochází k obohacení frakce nádorových buněk a odstranění nežádoucích krevních buněk. Druhý problém spočívá v nelegitimní expresi nádorově specifické RNA jinými jadernými buňkami (např. trombocyty, leukocyty). Využití qPCR pro analýzu expresních profilů CTC v kombinaci s imunomagnetickou separací představuje vysoce senzitivní a specifický způsob stanovení a molekulární charakterizace CTC.

Molekulární charakterizace CTC může poskytnout důležité informace k odhalení nových terapeutických cílů a mechanismů rezistence nádorových buněk k systémové léčbě.

Možnost pravidelného hodnocení vývoje onemocnění pomocí průkazu CTC by mohlo být užitečné ke stratifikaci pacientek a monitorování účinku systémové léčby v reálném čase.

Základním cílem této práce bylo popsání problematiky cirkulujících nádorových buněk u karcinomu prsu. Součástí této práce byla prospektivní studie zaměřená na molekulární charakterizaci cirkulujících nádorových buněk, jejímiž hlavními cíly byly:

Zavedení a optimalizace nové metody stanovení exprese vybraných genů – TOP1, TOP2, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktinu pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR).

Hypotéza č. 1: Podle dostupných poznatků jsme chtěli zavést a optimalizovat qPCR metodu umožňující stanovení exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktinu (referenční gen) a rozšířit tak spektrum vyšetřovaných genů v cirkulujících nádorových buňkách. Stanovení takovéto kombinace genů nebylo zatím provedeno. Předpokládali jsme, že nádorové buňky jednotlivých pacientek budou vykazovat odlišné expresní profily.

Porovnání míry exprese genů TOP1, TOP2, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktinu mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a mononukleárními buňkami separovanými z periferní krve pacientek s časným karcinomem prsu.

Hypotéza č. 2: Prokázaná nelegitimní exprese nádorové RNA jinými buňkami krve může vést k ovlivnění výsledku stanovení, který neodpovídá skutečnosti. U pacientek se tak mohou objevit falešně pozitivní výsledky. Předpokládali jsme, že exprese nádorové RNA bude v mononukleárních buňkách periferní krve minimální a pokud bude zvýšena, je to způsobeno nelegitimní expresí. Proto jsme se rozhodli, že zanalyzujeme a porovnáme mezi sebou míry exprese sledovaných genů exprimovaných cirkulujícími nádorovými buňkami a mononukleárními buňkami periferní krve, a zjistíme tak rozdíly mezi expresemi a odhalíme nepatrnou minimální expresi genu jinými krevními buňkami.

Prospektivní studium dynamiky cirkulujících nádorových buněk v periferní krve pomocí metody kombinující imunomagnetickou separaci s multiplexovou polymerázovou řetězovou reakcí.

Hypotéza č. 3: V naší studii jsme chtěli sledovat dynamiku změn CTC v periferní krvi opakovaně odebírané v průběhu léčby pacientek s operabilním a inoperabilním karcinomem prsu podle léčebného schématu. Předpokládali jsme, že z primárního nádoru může i v časně fázi onemocnění docházet k uvolňování nádorových buněk, které je možné detekovat v periferní krvi pacientek a jejich přítomnost může být ovlivněna podávanou léčbou. Na základě toho, jsme chtěli stanovit míru detekce CTC u pacientek v České republice a porovnat ji s výsledky publikovaných studií. Dále jsme provedli prospektivní monitorování CTC v průběhu léčby a zajímali jsme se o změny přítomnosti CTC mezi jednotlivými odběry. Vzhledem k tomu, že CTC vykazují značnou heterogenitu v expresi nádorově-asociovaných genů, zajímalo nás, jaké bude zastoupení HER2, MUC1 a GA733.2 použitých pro detekci CTC v našem souboru pacientek.

Zhodnocení přítomnosti cirkulujících nádorových buněk ve vztahu ke klinicko-patologické charakteristice a typu podávané léčby u studované skupiny.

Hypotéza č. 4: Na základě dostupných poznatků jsme předpokládali, že přítomnost CTC bude korelovat s užívanými prognostickými faktory jako je velikost uzlin, postižení lymfatických uzlin, exprese hormonálních receptorů s HER2 receptorem a přítomnost CTC se bude měnit v průběhu léčby pacientek s karcinomem prsu.

2 MATERIÁL A METODIKA

2.1 Kritéria pro zařazení patientek do studie

Výběr patientek do této studie probíhal na Onkologické klinice VFN a 1. LF UK v Praze pod odborným vedením doc. MUDr. Petry Tesařové, PhD. Patientky byly vybírány podle následujících kritérií:

- histologicky potvrzený karcinom prsu
- rizikový věk (medián 36 let)
- bez předchozího podstoupení chirurgického zákroku
- bez předchozího podání chemoterapeutické, hormonální a biologické léčby.

Patientky, které splňovaly některé z níže uvedených kritérií, nemohly být zařazeny do této studie. Jednalo se o:

- předchozí léčbu karcinomu prsu
- předchozí podstoupení chirurgického zákroku pro karcinom prsu
- předchozí podání chemoterapeutické, hormonální a biologické léčby.

Pacientkám splňujícím vstupní kritéria, a které vyslovily souhlas se vstupem do studie, byl předložen k podpisu informovaný souhlas schválený lokální Etickou komisí VFN (č.j.: 156/08 – GAUK – 1. LF UK).

2.2 Charakteristika patientek zařazených do studie

Do studie bylo celkem zařazeno 54 patientek s časným nádorem prsu. Medián věku patientek byl 36 let (věkové rozmezí 22 – 72 let). Více jak 62 % patientek bylo při zařazení ve věku do 39 let a tato skupina představovala velmi rizikovou skupinu patientek pro vznik metastatického onemocnění nádoru prsu.

Kompletní soubor patientek byl charakterizován dle klinicko-patologických charakteristik primárního nádoru. Více jak 35% patientek mělo při vstupní diagnóze primární nádor větší než 2 cm a ne však větší než 5 cm v největším rozměru (odpovídá T2). U 34 patientek nebyly v regionálních mízních uzlinách prokázány metastázy. U žádné patientky nebyly nalezeny vzdálené metastázy při vstupu do studie. Více jak 83% patientek mělo histologicky potvrzený nález invazivní duktálního karcinomu (IDC). Histologická struktura

IDC je velmi variabilní struktura vykazující solidně trabekulární, tubulární, kribriformní a glandulární růst. Stromální komponenta u některých nádorů může být výrazně desmoplastická nebo jindy naopak s ložisky elastózy a hyalinizace. Někdy může být stromatu jen velmi málo. Ke stanovení histopatologického gradingu invazivního karcinomu byla použita tzv. Nottinghamská klasifikace (modifikace podle Elstona a Ellise). Jedná se o modifikaci zlatého standardu pro grading karcinomu prsu popsanou Bloomem a Richardsonem. Tato klasifikace vychází z kvantifikace a skórování tří morfologických parametrů a to: tvorby tubulů (tvoří většinu nádoru > 75% / střední množství 10-75% / málo nebo žádné <10%), jaderné polymorfie (malá a pravidelná jádra / středně velká a mírně polymorfní jádra / výrazně polymorfní jádra) a počtu mitóz (0 – 3 / 4 – 6 / > 6). Každý parametr je ohodnocen určitým počtem bodů a na základě dosaženého počtu bodů je stanoven grading. Grade II (6-7 bodů) byl stanoven u 26 pacientek a grade III (8-9 bodů) u 21 pacientek.

V primárním nádoru byly imunohistochemicky stanoveny estrogenové (ER) a progesteronové receptory (PR). 29 pacientek bylo hodnoceno jako ER a PR negativní. U 25 pacientek byla stanovena pozitivita obou receptorů, což představovalo prediktivní faktor pro podání anti-hormonální terapie. Dále byla vyšetřena přítomnost HER2/neu receptoru, který je považován za negativní prognostický a prediktivní faktor u karcinomu prsu. V případě, že byla stanovena pozitivní imunohistochemicky reakce se skóre 2+ a 3+, bylo u pacientek indikovaných k léčbě trastuzumabem doplněno vyšetření amplifikace genu HER2/neu metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Ve studované skupině pacientek bylo 37% HER2/neu pozitivních a zbytek HER2/neu negativních. U všech pacientek s pozitivitou HER2/neu dle IHC byla provedena konfirmace metodou FISH, která potvrdila pozitivitu HER2/neu pouze u 22 % pacientek. Navíc u 12 pacientek byla prokázána mutace v genu BRCA1. Rozložení pacientek do skupin dle imunohistochemického podtypu nádoru prsu bylo následující: 40% pacientek bylo triple-negativních (ER, PR, HER2/neu negativní); 16% HER2/neu pozitivních (ER, PR negativní, HER2/neu pozitivní) a hormonálně-dependentních (ER a/nebo PR pozitivní) pacientek bylo 44%.

Klinická data v době prvního vyšetření jsou uvedena v tab. 2. Při vstupu do studie byl soubor rozdělen na dvě podskupiny podle plánované indikace k léčbě. První skupina pacientek byla indikována k chirurgickému odstranění primárního nádoru (skupina S1) a druhá skupina byla indikována k podstoupení neoadjuvantní léčby (skupina S2).

Tabulka 2: Klinicko-patologická charakteristika pacientek

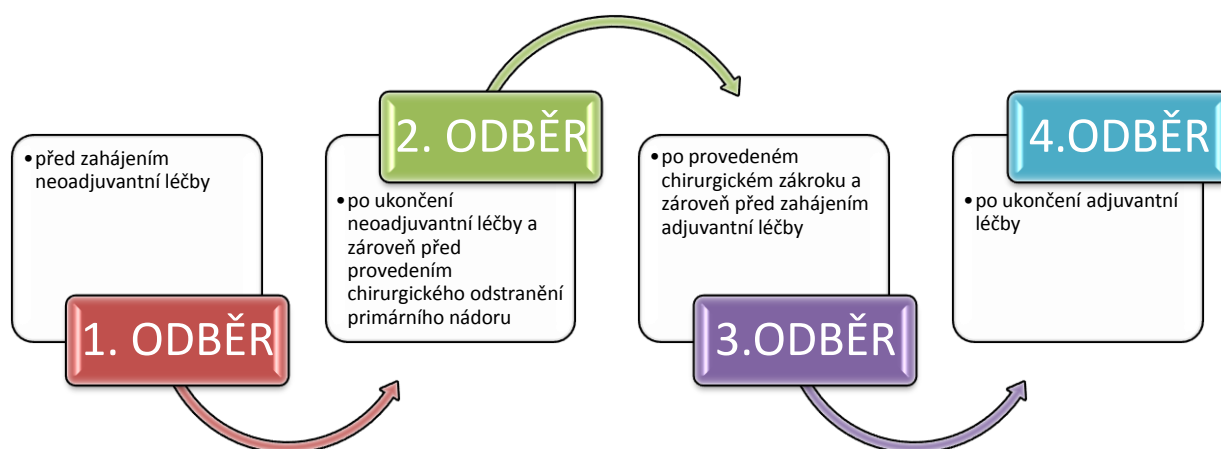
	Kompletní skupina	Skupina S1	Skupina S2
Klinicko-patologická charakteristika			
Věk	36 (22 – 72 let)	34 (22 – 43 let)	38 (32 – 72 let)
Celkem	54	27	27
Velikost nádoru			
T1	15	5	10
T2	21	13	8
T3	10	4	6
T4	5	3	2
Tis	3	2	1
Status lymfatických uzlin			
pozitivní	34	16	18
negativní	20	11	9
Histologický typ			
duktální	45	23	22
lobulární	4	2	2
ostatní	5	2	3
Grading			
I	7	1	6
II	26	13	13
III	21	13	8
Estrogenový receptor			
negativní	29	13	16
pozitivní	25	14	11
Progesteronový receptor			
negativní	29	15	14
pozitivní	25	12	13
HER2/neu receptor			
negativní	34	18	16
pozitivní	20	9	11
Imunohistochemický subtyp			
ER-,PR-,HER2-	22	13	9
ER-,PR-,HER2+	8	2	6
ER+ a/nebo PR+	24	12	12

2.3 Schéma odběru vzorků periferní krve

Celkem 54 pacientkám splňujícím vstupní kritéria, byly odebrány 2 vzorky periferní krve o objemu 5 ml do zkumavek BD Vacutainer EDTA (celkem 10 ml krve).

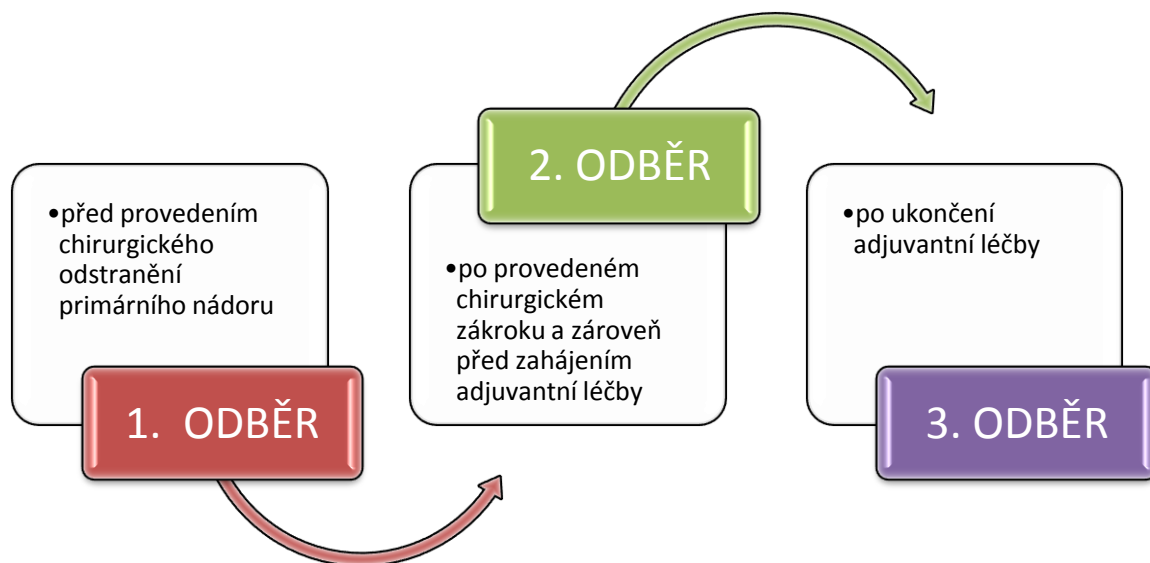
Tyto vzorky byly ihned po odběru transportovány při teplotě 4°C do laboratoře, kde byly okamžitě zpracovány. Pokud nebylo možné zajistit okamžité zpracování vzorků, byla periferní krev odebírána do speciálních zkumavek AdnaCollect, které umožnily zpracování vzorku do 24 hodin od provedení odběru. Do té doby byly vzorky uchovávány při teplotě 4°C a ve tmě.

Pacientkám s inoperabilním karcinomem prsu byly odebrány v časovém sledu celkem 4 vzorky periferní krve. Odběry pro stanovení cirkulujících nádorových buněk byly provedeny před zahájením neoadjuvantní léčby (1. odběr), po ukončení neoadjuvantní léčby a zároveň před provedením chirurgického odstranění primárního nádoru (2. odběr), před zahájením (3. odběr) a po ukončení adjuvantní léčby (4. odběr).



Obrázek 9: Schéma odběru vzorků u pacientek s inoperabilním karcinomem prsu.

Pacientkám s operabilním karcinomem prsu byly odebrány celkem 3 vzorky periferní krve a to před chirurgickým odstraněním primárního nádoru (1. odběr), před zahájením (2. odběr) a po ukončení adjuvantní léčby (3. odběr).



Obrázek 10: Schéma odběru vzorků u pacientek s operabilním karcinomem prsu.

Zpracování patientských vzorků a veškeré laboratorní vyšetření bylo prováděno v Laboratoři klinické imunologie a alergologie, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze pod odborným vedením prof. MUDr. Tomáše Zimy, DrSc., MBA.

2.4 Stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi

2.4.1 Separace cirkulujících nádorových buněk

Cirkulující nádorové buňky byly izolovány z 5 ml periferní krve pomocí komerčně dodávaného diagnostického kitu *AdnaTest BreastCancer*TM (AdnaGen AG, Langenhagen, Německo). Obohacená frakce nádorových buněk byla získána na základě imunomagnetické separace využívající přítomnost epiteliálních a nádorově-asociovaných antigenů na povrchu nádorových buněk. Připravená směs monoklonálních protilátek proti epiteliálnímu glykoproteinu GA733-2 (EpCAM) a epiteliálnímu antigenu MUC1, která byla konjugovaná s magnetickými kuličkami (Dynabeads), byla přidána do patientské periferní krve. Vzorek byl následně inkubován a poté byl pomocí magnetického separátoru získán komplex magnetických kuliček s navázanými nádorovými buňkami. Nádorové buňky byly následně lyzovány. Buněčný lyzát byl zamražen při -20°C maximálně po dobu 14 dní.

2.4.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk

Z buněčného lyzátu byla následně izolována mRNA pomocí *AdnaTest BreastCancer Detect kitu*TM (Adnagen AG, Langenhagen, Německo). Izolace mRNA byla provedena za použití superparamagnetických kuliček, na kterých byly kovalentně navázané oligo(dT)

sekvence. Izolace probíhala na základě párování bazí mezi poly (A)⁺ konci izolované mRNA a oligo (dT) sekvencemi na povrchu kuliček. V prvním kroku izolace docházelo k promytí kuliček prostřednictvím Lysis/Binding Buffer, které byly následně přidány k patientskému buněčnému lyzátu a inkubovány 10 min při laboratorní teplotě na rotátoru. Směs kuliček s navázanou mRNA byla po inkubaci celkem čtyřikrát promyta, aby byly odstraněny kontaminující druhy RNA (např. ribozomální RNA, transferová RNA, mikroRNA, malá nukleolární RNA, malá cytoplazmatická RNA). V posledním kroku izolace byla provedena eluce mRNA do RNase free vody. mRNA pro následné analýzy stále zůstávala navázána na superparamagnetické kuličky.

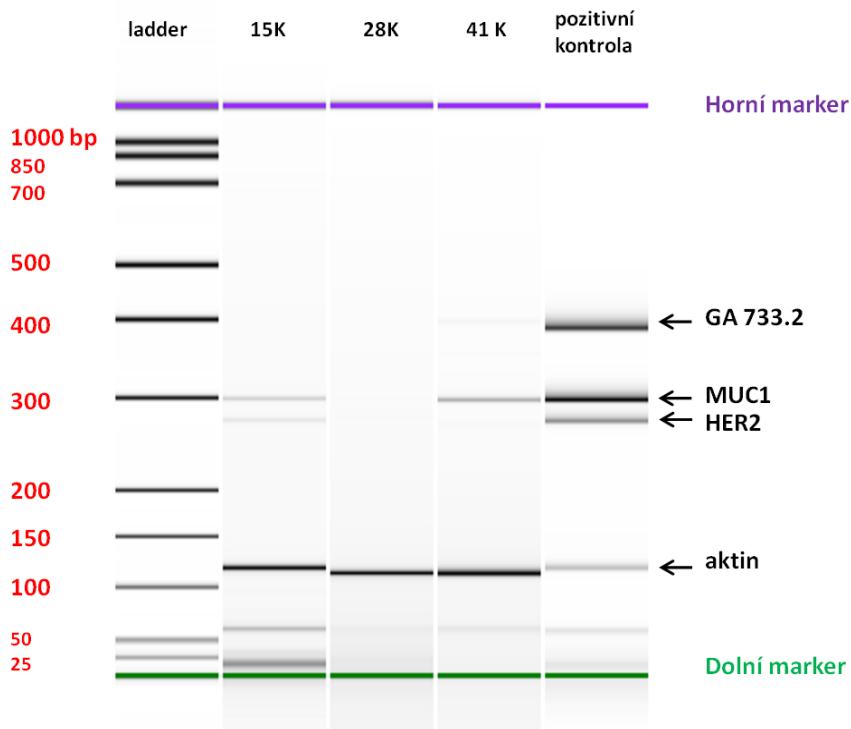
Následně byla mRNA reverzně přepsána do komplementární DNA (cDNA) použitím Sensiscript® Reverse Transcriptase kitu (Qiagen, Hilden, Německo). Vzniklá cDNA sloužila jako templát v multiplex PCR reakci. Pomocí multiplex PCR byla sledována amplifikace nádorově-specifických a tumor-asociovaných markerů v izolovaných nádorových buňkách. Jednalo se o epiteliální glykoprotein GA733-2 (EpCAM), receptor epidermálního růstového faktoru 2 (Her-2) a Mucin 1 (MUC1). Jako vnitřní pozitivní kontrola PCR byl stanovován β -aktin.

Vizualizace a kvantitativní hodnocení amplifikovaných PCR produktů byly provedeny na přístroji 2100 Bioanalyzer za použití DNA 1000 kitu (Agilent Technologies, Německo). Výsledek byl hodnocen jako pozitivní v případě, že byl jasně detekován alespoň jeden ze sledovaných PCR produktů o následujících velikostech:

GA733-2:	395 bp
MUC1:	299 bp
Her-2:	265 bp
Aktin:	120 bp. (vnitřní kontrola)

Píky s koncentrací vyšší než 0,30 ng/ul byly hodnoceny jako pozitivní. Píky nedetekovatelné nebo s koncentrací nižší než 0,15 ng/ul byly negativní. Píky, jejichž koncentrace byla v rozmezí 0,15 – 0,30 ng/ul byly hodnoceny jako neprůkazné a bylo nutné provést stanovení CTC v novém vzorku odebraném s odstupem 3 – 4 týdnů. Při vyhodnocení musel být ve všech patientských vzorcích detekován PCR produkt β -aktinu. U negativní PCR kontroly a RT negativní kontroly nesměly být přítomny píky o velikosti vyšší než 80 bp. V případě, že se objevil fragment větší než 1kb, znamenalo to, že vzorek byl kontaminován genomovou DNA a takovýto výsledek musel být z dalších analýz vyřazen. Na obr. 11 je zobrazeno stanovení amplifikovaných PCR produktů sloužících pro průkaz CTC v periferní

krvi. První linie odpovídá DNA ladderu sloužícímu ke stanovení velikosti detekovaných PCR produktů. Linie 2 – 4 odpovídá patientským vzorkům a linie 5 pozitivní kontrole. Vzorek 15 K je pozitivní pro HER2 a MUC1, vzorek 28K je negativní a vzorek 41K je pozitivní pro MUC1. U všech vzorků byl detekován aktin, což indikuje správně provedené stanovení. V pozitivní kontrole jsou zřejmé všechny čtyři sledované PCR produkty.



Obrázek 11: Vyhodnocení výsledek stanovení CTC pomocí AdnaTestu® na přístroji Bioanalyzer 2100 za použití DNA 1000 kitu (Agilent Technologies).

2.5 Porovnání exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL a KRT 19 mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a mononukleárními buňkami periferní krve

Cirkulující nádorové buňky je možné izolovat z frakce mononukleárních buněk získaných po centrifugaci s použitím gradientového separačního média (např. Ficoll, Leucosept). V našem případě byly CTC separovány na základě výše uvedeného způsobu, při kterém zůstalo dostatečné množství periferní krve pro další výzkumné účely. Bylo zjištěno, že mononukleární buňky periferní krve u onkologických pacientů mohou exprimovat některé nádorově-specifické geny vlivem např. současně probíhající infekce či zánětlivého procesu. Aby bylo zjištěno genové pozadí periferní krve pro sledované geny, byla provedena izolace mononukleárních buněk periferní krve (PBMC).

2.5.1 Izolace mononukleárních buněk periferní krve

Mononukleární buňky periferní krve byly izolovány z 5 ml periferní krve po CTC izolaci. K získání frakce PBMC byl použita centrifugace v hustotním gradientu pomocí média Histopaque® (hustota 1,077 g/ml, Sigma-Aldrich Corp., St. Luis, MO, USA). Do 50 ml Falcon zkumavky naplněné 20 ml Histopaque médiem byla přidána periferní krev a zkumavka byla centrifugována 30 minut při 400g. Po centrifugaci došlo k oddělení jednotlivých frakcí (erytrocyty a krevní destičky – separační médium – PBMC – plazma). Interfáze obsahující PBMC byla promyta v PBS a centrifugována 15 minut při 400g.

2.5.2 Izolace celkové RNA z mononukleárních buněk periferní krve

Celková RNA (total RNA, tRNA) byla izolována z PBMC pomocí TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH). Alikvot obsahující 10×10^6 PBMC byl homogenizován v 1 ml TRI Reagentu. K homogenátu bylo přidáno 0,2 ml chloroformu a rychle zvortexováno po dobu 15 sekund. Směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugována 15 minut při 12 000g a teplotě 4°C. Vodná fáze obsahující tRNA byla přenesena do nové zkumavky a smíchána s 0,5 ml izopropanolu. Vzorek byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugován 8 minut při 12 000g a teplotě 4°C. RNA precipitát byl promyt 75% etanolem a centrifugován 5 minut při 7 500g a teplotě 4°C. RNA peleta byla následně vysušena ponecháním 5 minut v laminárním boxu a poté byla rozpuštěna ve RNase free vodě a inkubována 10 – 15 minut při 55 – 60°C.

2.5.3 Kontrola kvality RNA

Pomocí mikrofluidního zařízení Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) byla provedena kvantifikace a kontrola integrity izolované RNA. K analýze RNA byl použit Agilent RNA 6000 Nano Kit podle instrukcí výrobce. Integrita RNA byla hodnocena na základě stanovení RIN (RNA Integrity number). Hodnota RIN 10 odpovídala intaktní RNA. Snižující se hodnoty RIN odpovídaly míře degradace RNA (mírně až silně degradované RNA). Vzorky RNA byly následně uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.

2.5.4 Reverzní transkripce

Pomocí metody reverzní transkripce byla z izolované celkové buněčné RNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy připravena komplementární DNA (cDNA), která byla následně metodou PCR amplifikována. cDNA sloužila jako templát pro amplifikaci studovaných genů.

100 ng tRNA bylo inkubováno po dobu 10 min při 65°C v se směsí náhodných hexanukleotidů sloužících jako primery (60μM). Ihned po inkubaci byl vzorek zchlazen a následně inkubován při 25°C 10 min a při 55°C 30 min ve 20μl reakci obsahující 1x Transcriptor RT pufr, směs DNTP (1mM každý), 20U Protector RNase inhibitoru a 10U Transcriptor reverzní transkriptázy. Reverzní transkriptáza byla inaktivována při 85°C po dobu 5 min. Poté byla reakce zchlazena a zamražena při -20°C. K syntéze jednovláknové cDNA byl použit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

2.5.5 Analýza exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT 19

Pro analýzu exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL a KRT19 byla použita jako templát jednovláknová cDNA. Jednotlivé fragmenty studovaných genů byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím nově navržených specifických primerů uvedených v tab. 3. Návrh primerů pro všechny studované geny byl proveden pomocí Primer-BLAST softwaru. Eseje pro jednotlivé geny byly navrženy tak, aby primery nasedaly v místě exon/exon, čímž se zabránilo nežádoucí amplifikaci možné kontaminace genomovou DNA.

Tabulka 3: Primery navržené pro amplifikaci studovaných genů.

Gen	Referenční sekvence mRNA	Umístění genu	Sekvence primeru 5' → 3'	Délka ampliconu
TOP1	NM_003286.2	20q12-q13.1	CAAGGTTACTTGGCTGGTTT CGAGCAGTCTCGTATTTCTG	120 bp
TOP2A	NM_001067.3	17q21-q22	AGTGAAGAAGACAGCAGCAA AGGATCAGGCTTTTGAGAGA	127 bp
CTSD	NM_001909.4	11p15.5	TACCTCGTTTGACATCCACT AGACCTGCCTCTCCACTTT	131 bp
ST6GAL	NM_030965.1	1p31.1	AGACTGGCAAAGACAGGAAG GGGCACCATGCCATAAACATT	110bp
KRT19	NM_002276.4	17q21.2	GCCACTACTACACGACCATC TCCGTCTCAAACCTTGGTTC	133bp

Amplifikace sledovaných genů probíhala v 10 µl reakční směsi, která obsahovala 2 µl cDNA. Pro každý gen byly prováděny dvě reakce s odlišnou vstupní templátovou cDNA. První reakce obsahovala cDNA získanou přepisem z celkové RNA izolované z mononukleárních buněk periferní krve. Druhá reakce obsahovala cDNA získanou izolací z cirkulujících nádorových buněk. Amplifikací cDNA z PBMC jsme stanovili genetické pozadí studovaných genů v nenádorových buňkách, které jsme poté využili ke srovnání s výsledky amplifikace studovaných genů v nádorových buňkách. Do reakční směsi byly dále přidány primery (0,4 µl F/R primeru), 5 µl IQ SYBR Green Supermixu a 2,6 µl vody.

Proces amplifikace podle teplotního protokolu a byl nastaven v programu Bio-Rad CFX Manager 2.0. V prvním kroku byla zahájena iniciační denaturace trvající 3 min při 95°C. Poté došlo ke snížení teploty a následovala amplifikace. Amplifikace zahrnovala denuraci 15 sec při 95°C, přisednutí primerů (annealing) 20 sec při teplotě 60°C a fázi elongace 20 sec při teplotě 72°C. Po elongačním kroku docházelo k měření fluorescence. Ve třetím kroku byla teplota snížena na 65°C po dobu 5 sec. Následně ve čtvrtém kroku byla teplota gradientově zvyšována na teplotu 95°C. Postupné zvyšování teploty bylo použito pro kontrolu vzniklých ampliconů a odhalení vzniku nespecifických produktů ve formě primer-dimer. Primer-dimery jsou tvořeny kratšími sekvencemi, a proto denaturují při nižších teplotách než cílová sekvence. Jejich tvorbu bylo možné odhalit pomocí zhodnocení křivky teploty tání (krok 4).

K měření genové exprese byl použit přístroj CFX96 Real-Time System, C1000 Thermal Cycler od firmy Bio-Rad.

2.5.6 Statistická analýza dat

Pro vyhodnocení získaných dat genové exprese byla použita komparativní C_T metoda (známá též jako $2^{-\Delta\Delta C_T}$). Exprese jednotlivých sledovaných genů byla vyjádřena jako násobek exprese genu v CTC v porovnání s PBMC. Studentův t -test byl použit pro statistické vyhodnocení významnosti rozdílu v expresi sledovaných genů. Korelace klinicko-patologické charakteristiky studované skupiny s výsledkem vyšetření CTC a zjištěnou expresí genů byly hodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitneova testu a Kruskal-Wallisova testu. Statistická analýza byla provedena pomocí programu STATISTICA12. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

3 VÝSLEDKY

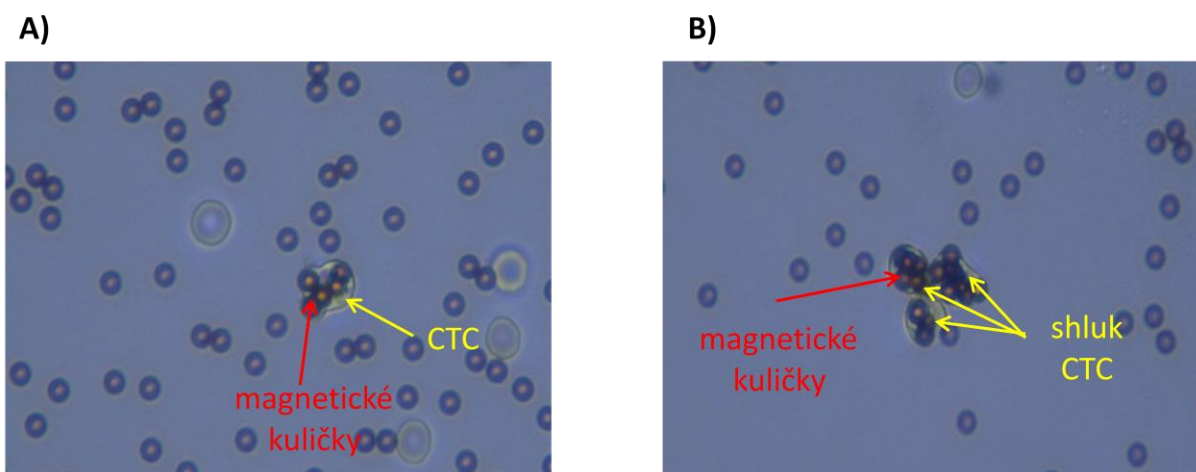
3.1 Validace a ověření výtěžnosti AdnaTestu

Před zahájením vyšetřování patientských vzorků byla nejdříve provedena verifikace AdnaTestu® BreastCancer Select/Detect opatřeného značkou CE. Cílem bylo potvrdit výrobcem uvedený limit detekce tohoto testu a ověřit proveditelnost testu za běžných podmínek rutinní laboratorní činnosti. AdnaTest® je výrobcem validován na obohacení cirkulujících nádorových buněk z periferní krve a následnou analýzu tumor-asociované genové exprese u karcinomu prsu. Výrobce uvádí specificitu detekce 90 %. Pět buněk v 5 ml periferní krve je pomocí tohoto testu detekováno s výtěžností 90%, zatímco u dvou nádorových buněk v 5 ml periferní krve je výtěžnost nejméně 70%.

Před zahájením vyšetřování patientských vzorků nás zajímalo:

1. jak vypadají komplexy CTC se superparamagnetickými kuličkami před lyzačním krokem v průběhu jejich separace z periferní krve,
2. jak se mění koncentrace PCR fragmentů tumor-asociovaných genů používaných pro detekci CTC v závislosti na počtu nádorových buněk v 5 ml periferní krve,
3. jaká je výtěžnost testu,
4. jaká je opakovatelnost měření PCR fragmentů pomocí Bioanalyzeru 2100.

Pro zodpovězení výše uvedených otázek jsme provedli následující experimenty. Pomocí imunomagnetické separace byla získána z periferní krve obohacená frakce cirkulujících nádorových buněk navázaných na magnetické kuličky. Standardní protokol v posledním kroku využívá lyzační roztok, který způsobí přerušení vazeb mezi CTC a kuličkami. My jsme v našem experimentu tento krok neprovedli a rovnou jsme frakci buněk nanesli na sklíčko a mikroskopicky hodnotili přítomnost komplexů. Obr. 12A zobrazuje superparamagnetické kuličky navázané na nádorovou buňku. Obr. 12B zobrazuje separované shluky nádorových buněk pokrytých navázanými superparamagnetickými kuličkami.



Obrázek 12: Komplex super-paramagnetických kuliček navázaných na nádorových buňkách.

Vzhledem k tomu, že při selekčním kroku je použita kombinace dvou markerů (HER2, MUC1) a v detekčním kroku 3 markerů (HER2, MUC1 a EpCAM) bylo nezbytné vhodně zvolit nádorovou linii exprimující všechny tyto markery. Pro tento experiment byly použity dvě nádorové linie MCF-7 a MDA-MB-231, u nichž bylo možné stanovit sledované markery. Nádorové linie byly kultivovány dle návodu výrobce. Po úspěšné kultivaci byly buňky sklizeny a alikvóty obou buněčných liniích byly smíchány a následně spočítány v Bürkově komůrce. Ze směsi buněk byla připravena šesti bodová koncentrační řada odpovídající následujícímu počtu buněk v 1 ml: 0 – 2 – 20 - 200 - 2000 – 20 000. Buněčné suspenze o těchto koncentracích byly přidány do 5 ml periferní krve získané od dobrovolného zdravého dárce. Vzorke byly následně zpracovány a analyzovány dle pracovního protokolu výrobce. Vyhodnocení PCR fragmentů bylo provedeno na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent). Naměřené údaje jsou uvedeny v tab. 4.

Tabulka 4: Naměřená koncentrace PCR fragmentů dle počtu nádorových buněk obsažených v 5 ml periferní krve.

<i>Počet nádorových buněk v 5 ml periferní krve</i>	<i>PCR fragmenty tumor-asociovaných genů</i>				<i>Hodnocení</i>
	Aktin	HER2	MUC1	EpCAM	
0	5,19	0	0	0	Negativní
2	4,43	0,27	0,24	0,14	Pozitivní
20	5,32	1,59	0,95	0,81	Pozitivní
200	4,20	18,6	3,89	1,1	Pozitivní
2000	4,97	24,18	4,07	1,59	Pozitivní
20000	5,87	31,43	5,79	1,78	Pozitivní

Pro stanovení opakovatelnosti měření PCR fragmentů pomocí přístroje Bioanalyzer 2100 jsme provedli měření 4 vzorků s odlišnou koncentrací a zastoupení PCR fragmentů. Tyto vzorky byly třikrát opakovaně měřeny. Z naměřených hodnot jsme poté vypočítali průměr, směrodatnou odchylku a variační koeficient. V následující Tabulce 5 jsou uvedeny naměřené hodnoty. Z výsledků měření vyplývá, že i přes vysoké hodnoty SD u některých měřených PCR fragmentů, toto neovlivní hodnocení výsledku CTC.

Tabulka 5: Opakovatelnost měření PCR fragmentů tumor-asociovaných genů pomocí přístroje Bioanalyzer 2100.

		průměr (ng/ul)	SD (%)	CV (%)
vzorek 1 - pozitivní	Aktin	13,36	72	51,9
	HER2	7,43	12	1,5
	MUC1	13,16	21	4,6
	GA733.2	0,25	0	0
vzorek 2 – pozitivní	Aktin	9,41	23	5,3
	HER2	0,63	2	0
	MUC1	0,79	2	0
	GA733.2	0,18	0	0
vzorek 3 – hraniční	Aktin	11,65	48	22,6
	HER2	0	0	0
	MUC1	0,22	1	0
	GA733.2	0	0	0
vzorek 4 – negativní	Aktin	5,07	21	4,3
	HER2	0,01	0	0
	MUC1	0	0	0
	GA733.2	0	0	0

Na základě výše provedených experimentálních pokusů jsme zjistili, že:

- i) test je proveditelný při přesném dodržení pracovního postupu daného výrobcem v našich laboratorních podmínkách – ve všech analyzovaných vzorcích byl jasně detekován kontrolní gen Aktin. Přítomnost tohoto genu zaručuje správné a přesné provedení celé analýzy.
- ii) u vzorku periferní krve neobsahující žádnou nádorovou buňku, nebyl detekován PCR fragment ani jednoho ze tří tumor-asociovaných genů;
- iii) ve vzorcích obsahujících dvě a více nádorových buněk byla zjištěna přítomnost PCR fragmentů sledovaných genů. Koncentrace PCR fragmentů pro jednotlivé body koncentrační řady vykazovaly vzrůstající tendenci.

iv) Pomocí AdnaTestu® jsme v našich laboratorních podmínkách detekovali 2 nádorové buňky v 5 ml periferní krve.

3.2 Stanovení přítomnosti CTC před zahájením a v průběhu léčby

Stanovení přítomnosti CTC v periferní krvi jsme provedli u 54 pacientek s karcinomem prsu, které byly vybrány podle vstupních kritérií uvedených v kapitole 3.1. Celkem bylo v průběhu této studie vyšetřeno 195 vzorků, z nichž 6 bylo stanoveno opakovaně. CTC pozitivita byla zjištěna ve 38 vzorcích periferní krve (19 %), zatímco CTC negativních vzorků bylo 157 (80%).

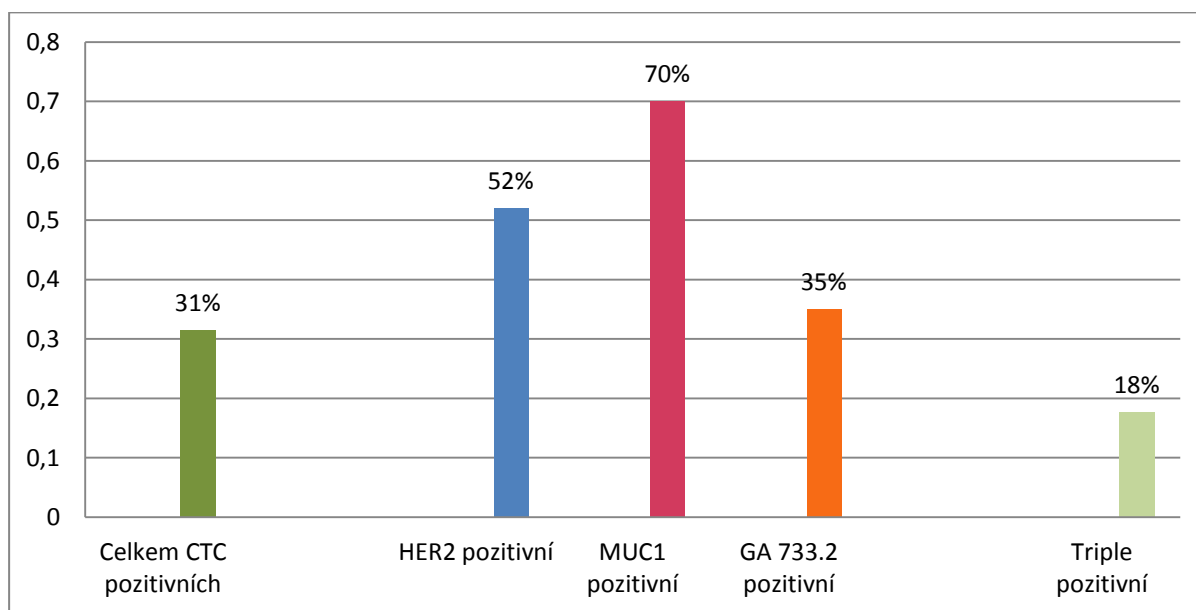
Přítomnost CTC ve studované populaci byla prokázána u 31 % pacientek před zahájením léčby. Provedli jsme korelaci CTC positivity a klinicko-patologickými charakteristikami primárního nádoru. Z tabulky č. 5 vyplývá, že jsme neprokázali statisticky významnou korelaci stavu CTC s velikostí primárního nádoru, postižením lymfatických uzlin, histologickým typem nádoru, gradem ani stavem ER, PR a HER2/neu receptorů. Více jak polovina CTC pozitivních pacientek však měla při vstupním vyšetření velikost nádoru T2, zasažené lymfatické uzliny, histologicky potvrzený invazivní duktální karcinom s gradem III a negativním HER2/neu receptorem.

Tabulka 6: CTC u všech pacientek před zahájením léčby.

	Celkem	CTC-pozitivita	P¹	P²
Klinicko-patologická charakteristika				
Věk	36 (22 – 72 let)			
Délka sledování	7 (1-20 měsíců)			
Celkem	54	17/54 (31)		
Velikost nádoru				0,468
pT1	15	5/15 (33)	0,892	
pT2	21	9/21 (43)	0,353	
pT3	10	2/10 (20)	0,465	
pT4	5	1/5 (20)	0,594	
Tis	3	0/3 (0)	0,246	
Status lymfatických uzlin				
Pozitivní	34	11/34 (32)	0,932	0,835
Negativní	20	6/20 (30)	0,903	
Histologický typ				
Duktální	45	15/45 (33)	0,844	0,798
Lobulární	4	1/4 (25)	0,787	
Ostatní	5	1/5 (20)	0,594	
Grading				0,111
I	7	1/7 (14)	0,348	
II	26	6/26 (23)	0,437	
III	21	10/21 (48)	0,191	
ER status				
Negativní	29	8/29 (32)	0,712	0,514
Pozitivní	25	9/25 (36)	0,691	
PR status				
Negativní	29	9/29 (31)	0,967	0,514
Pozitivní	25	8/25 (32)	0,963	
HER2/neu				
Negativní	34	11/34 (32)	0,932	0,835
Pozitivní	20	6/20 (30)	0,903	
Imunohistochemický subtyp				
ER-,PR-,HER2-	22	5/22 (23)	0,445	0,644
ER-,PR-,HER2+	8	3/8 (38)	0,734	
ER+ a/nebo PR+	24	8/24 (33)	0,872	

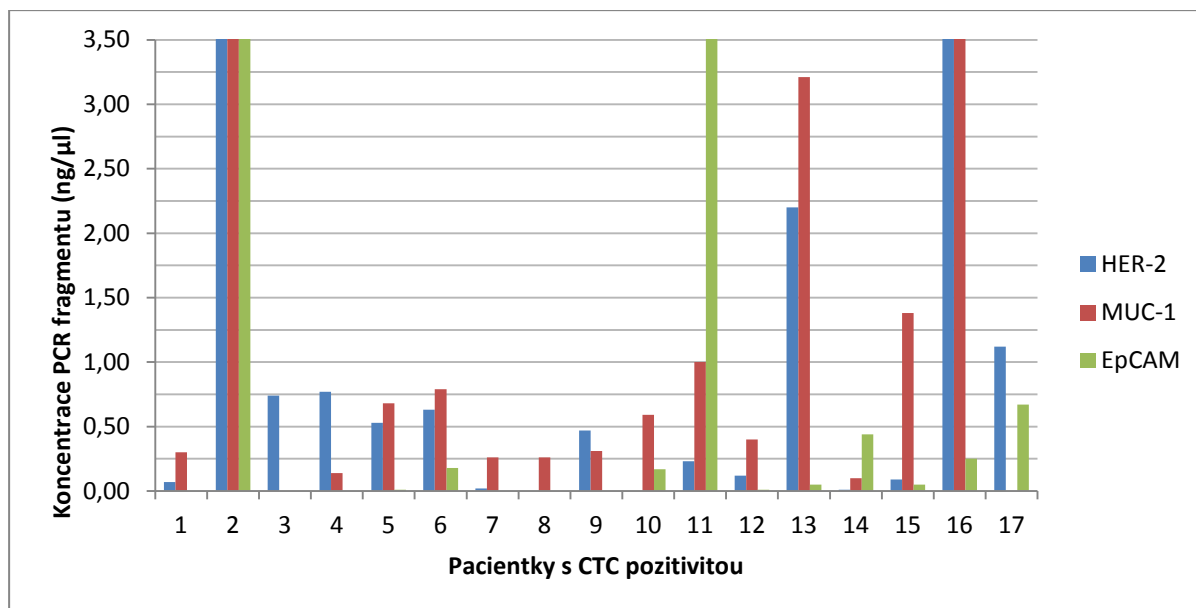
Heterogenita exprese nádorově-asociovaných genů v CTC

Pro detekci a charakterizaci obohacené frakce CTC byla použita metoda multiplex PCR. Pomocí této metody za použití směsi specifických primerů byly vytvořeny PCR produkty nádorově-asociovaných genů HER2, MUC1 a EpCAM. Přítomnost či absence těchto PCR produktů byla vyhodnocena kvantitativně pomocí kapilární elektroforézy. V průběhu vyhodnocení CTC pozitivních vzorků, odebraných před zahájením léčby, jsme zjistili značnou rozdílnost exprese amplifikovaných genů. U více jak 70 % vzorků byl prokázán PCR produkt pro gen MUC1. PCR produkt pro HER2 gen byl přítomen v 52 % vzorcích. Nejméně často byl přítomen PCR produkt pro EpCAM a to u 35 % vzorků. Vzhledem k možnostem biologické léčby, bylo zajímavé porovnání HER2 pozitivita CTC s HER2 pozitivitou primárního nádoru. Zjistili jsme, že u celkem 9 pacientek byla zjištěna HER2 pozitivita CTC, z nichž 6 pacientek mělo HER2 negativní primární nádor. U zbývajících třech pacientek byla nalezena shoda HER2 pozitivita CTC vs. primární nádor. U třech pacientek, jejichž primární nádor byl HER2 pozitivní, byly nalezeny CTC s HER2 negativitou.



Obrázek 13: Heterogenita v expresi sledovaných markerů cirkulujícími nádorovými buňkami.

Zhodnocení vzorku jako CTC pozitivní bylo stanoveno na základě detekce jednoho PCR produktu u 10 vzorků, dvou PCR produktů u 4 vzorků. U 3 vzorků byla prokázána přítomnost všech tří PCR produktů sledovaných genů. Jednotlivé expresní profily u CTC pozitivních pacientek jsou zobrazeny na obr. 14. Je patrné, že jednotlivé vzorky se lišily nejen přítomností či absencí jednotlivých PCR produktů ale také jejich koncentrací.



Obrázek 14: Expresní profily CTC u jednotlivých pacientek při vstupním vyšetření periferní krve.

Monitorování CTC v průběhu léčby

Pacientky byly v průběhu sledování rozděleny do dvou skupin podle léčebného schématu. Do skupiny S1 byly zařazeny pacientky indikované k odstranění primárního nádoru a podstoupení adjuvantní léčby. Skupinu S2 tvořily pacientky na počátku s inoperabilním karcinomem prsu indikované k neoadjuvantní léčbě a následně k chirurgickému odstranění operabilního nádoru a k podstoupení adjuvantní léčby.

Skupina S1

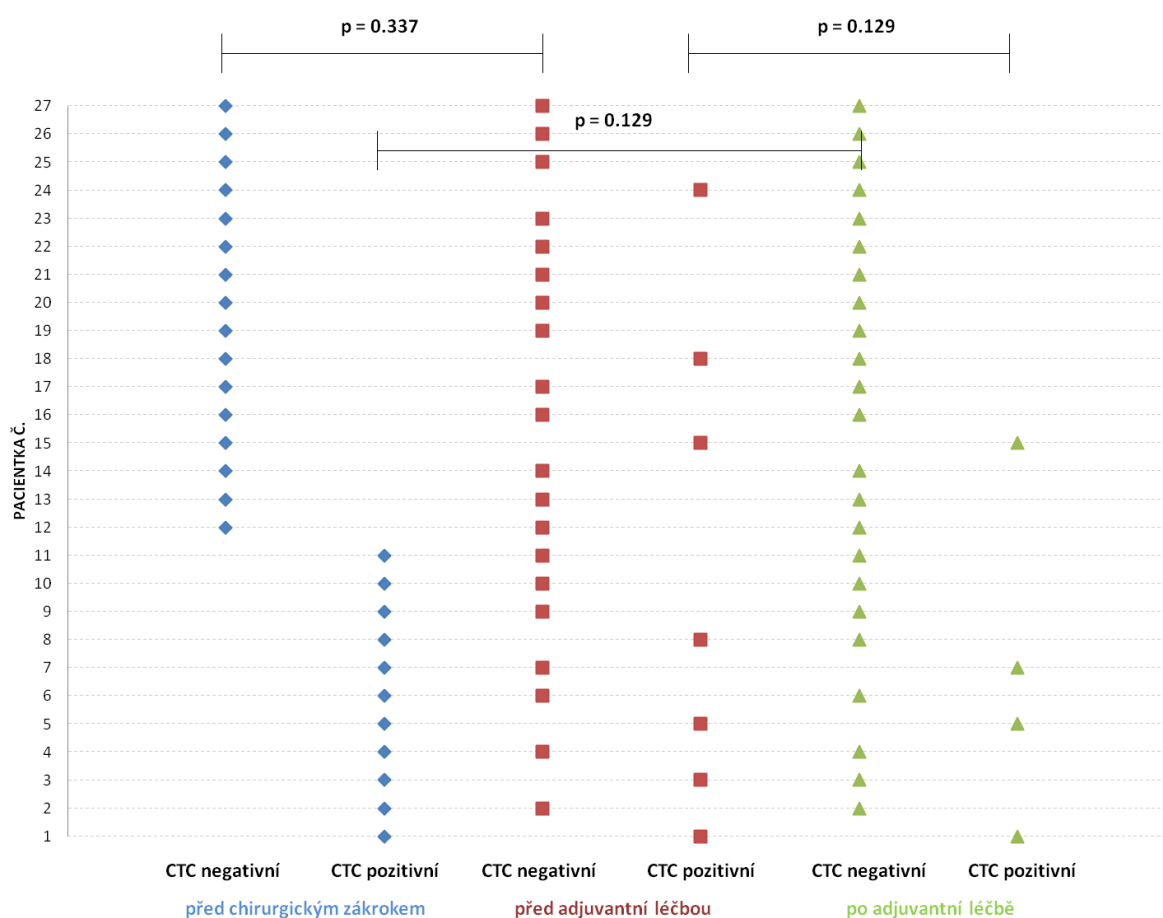
Druhý odběr periferní krve byl proveden u skupiny S1 před zahájením podávání adjuvantní terapie. Pozitivita CTC byla prokázána u 6 pacientek, z nichž u čtyř nebyly před chirurgickým zákrokem detekovány CTC. U zbývajících dvou pacientek přetrvávaly CTC i po chirurgickém zákroku. U čtyř pacientek došlo k vymizení CTC po provedeném chirurgickém zákroku. Pacientky nejčastěji podstoupily ablaci v kombinaci s exanterací axily a biopsií sentinelové lymfatické uzliny.

Tabulka 7: Přítomnost CTC v jednotlivých časových bodech u pacientek skupiny S1.

1. časový bod	2. časový bod	3. časový bod
před chirurgickým zákrokem	po chirurgickém zákroku - před adjuvantní léčbou	po adjuvantní léčbě
CTC pozitivita 6 pacientek	CTC pozitivita	CTC pozitivita 1 pacientka
	2 pacientky	CTC negativita 1 pacientka
	CTC negativita	CTC pozitivita 0 pacientek
	4 pacientky	CTC negativita 4 pacientky
CTC negativita 21 pacientek	CTC pozitivita	CTC pozitivita 1 pacientka
	4 pacientky	CTC negativita 3 pacientky
	CTC negativita	CTC pozitivita 0 pacientek
	17 pacientek	CTC negativita 17 pacientek

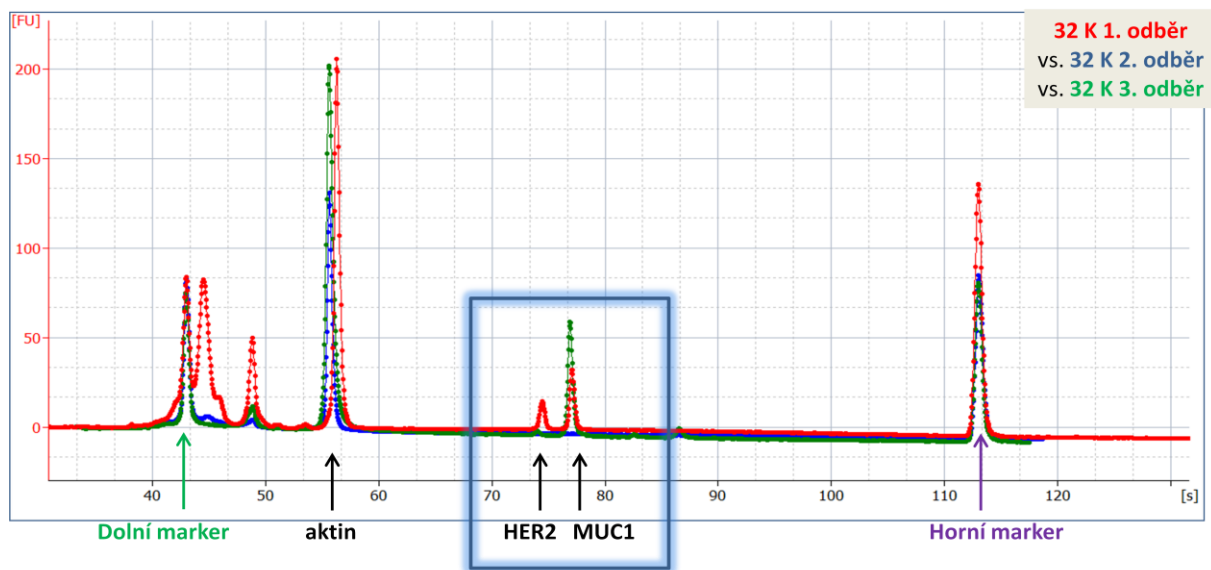
Třetí odběr periferní krve byl u skupiny S1 proveden po ukončení adjuvantní léčby. Pacientky byly léčeny systémovou pooperační léčbou zahrnující podávání hormonální léčby v kombinaci s chemoterapeutiky u hormonálně dependentních pacientek (ER⁺ a/nebo PR⁺), u hormonálně independentních podání chemoterapeutik (AC, FEC, T) v kombinaci s biologickou léčbou (trastuzumab). Ve skupině S1 po ukončení adjuvantní léčby byly prokázány CTC pouze u dvou pacientek, přičemž jedna pacientka měla přetrvávající přítomnost CTC a u druhé byly CTC prokázány již před zahájením ale i po ukončení adjuvantní léčby. U této pacientky byla zjištěna rezistence na podávanou léčbu, a proto byla převedena na jiný léčebný režim. U pacientky s perzistencí CTC byly prokázány vzdálené metastázy ve skeletu a bylo zahájeno podávání paliativní léčby zahrnující chemoterapii antracykliny v kombinaci s bisfosfonáty. U více jak 90% pacientek nebyly po ukončení adjuvantní léčby prokázány CTC v odebraném vzorku periferní krve. Pro skupinu S1 byl toto poslední vyšetřovaný odběr periferní krve.

U skupiny pacientek S1 jsme provedli testování hypotézy zda, dynamika CTC je závislá na typu léčby. Pro testování byl použit chí-kvadrát test (χ^2) porovnávající námi stanovené četnostmi CTC pozitivních resp. CTC negativních výsledků v jednotlivých odběrech periferní krve v průběhu sledování pacientek s očekávanými četnostmi. Pro skupinu S1 nebyl potvrzen statisticky významný vliv jednotlivých typů léčby na přítomnost či vymizení CTC. Následující obr. 15 zobrazuje výsledky stanovení CTC u pacientek ze skupiny S1 ve všech provedených odběrech. Výsledky chí-kvadrát testu jsou uvedeny v horní části obrázku.



Obrázek 15 Asociace nálezu CTC v průběhu léčby u skupiny pacientek S1

Na obr 16 je zobrazeno porovnání výsledků vyšetření přítomnosti CTC v periferní krvi během třech různých odběrů u jedné pacientky. Z elektroforeogramu je patrné, že v prvním odběru byla prokázána CTC pozitivita (HER2 a MUC1 pozitivní CTC), druhý odběr byl negativní a ve třetím odběru byla opět prokázána přítomnost CTC (MUC1 pozitivní CTC).



Obrázek 16: Porovnání výsledku vyšetření přítomnosti CTC ve třech odběrech provedených u jedné pacientky.

Skupina S2

Druhý odběr periferní krve byl proveden po ukončení neoadjuvantní léčby. Pro léčbu pacientek byly použity tyto cytostatické režimy: AC/docetaxel (doxorubicin, cyklofosfamid a následně docetaxel), TAC (docetaxel, doxorubicin, cyklofosfamid), AT (doxorubicin a paklitaxel) a AC/TH (doxorubicin, cyklofosfamid, paklitaxel a trastuzumab). Neoadjuvantní chemoterapie byla podávána pacientkám po dobu 8 – 12 cyklů léčby. Po ukončení neoadjuvantní léčby byly CTC prokázány u 7 pacientek (26%). U čtyř pacientek i po podání této léčby byla prokázána perzistence CTC. Naopak u tří pacientek byly detekovány CTC až po ukončení neoadjuvantní léčby. Sedmi pacientkám již nebyly po absolvování léčby CTC v periferní krvi detekovány. Tato skupina pacientek byla léčena v režimu podávání AC/docetaxel a navíc u jedné pacientky byl v důsledku přítomnosti HER2 podáván trastuzumab. Všechny pacientky byly následně indikovány k chirurgickému odstranění nádorové tkáně prsu.

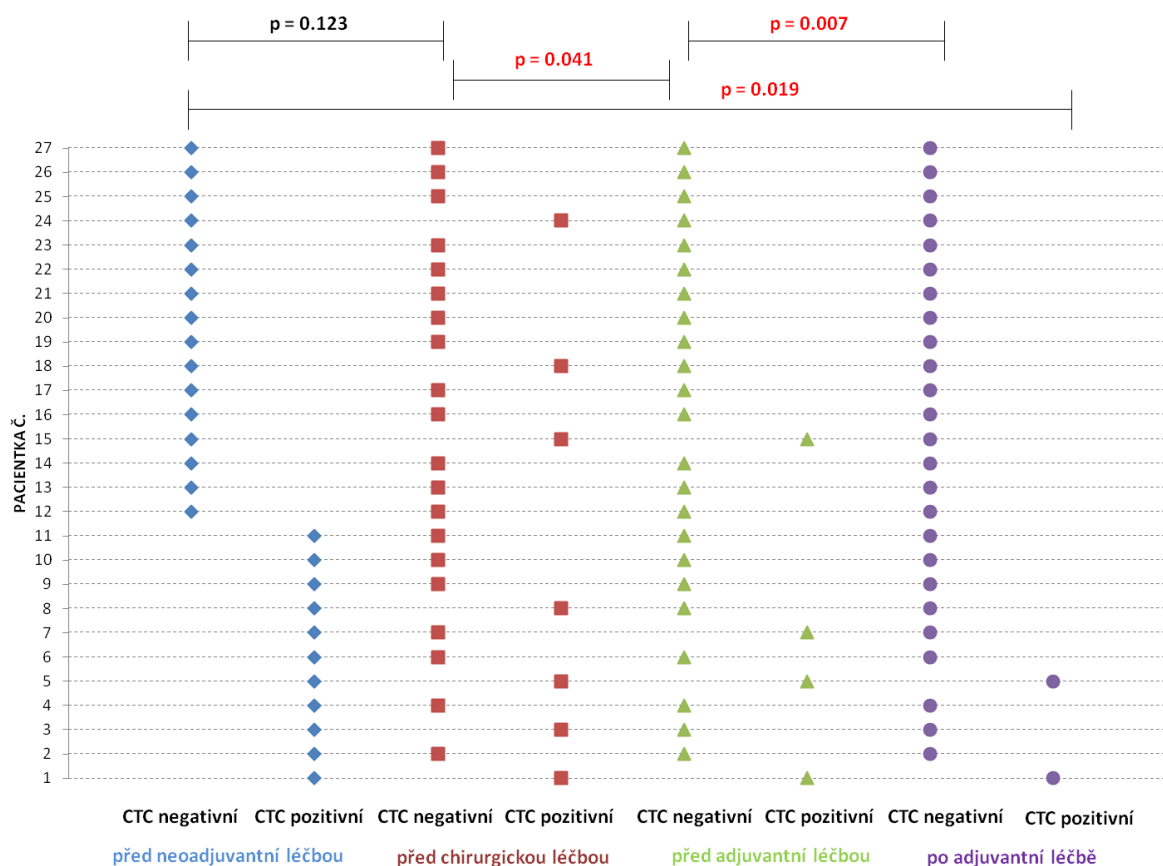
Tabulka 8: Přítomnost CTC v jednotlivých odběrech periferní krve u pacientek skupiny S2.

1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr
před neoadjuvantní léčbou	po neoadjuvantní léčbě - před chirurgickým zákrokem	po chirurgickém zákroku - před adjuvantní léčbou	po adjuvantní léčbě
CTC pozitivita 11 pacientek	CTC pozitivita 4 pacientky	CTC pozitivita 2 pacientky	CTC pozitivita 2 pacientky
		CTC negativita 2 pacientky	CTC negativita 0 pacientek
	CTC negativita 7 pacientek	CTC pozitivita 1 pacientka	CTC pozitivita 0 pacientek
		CTC negativita 6 pacientek	CTC negativita 1 pacientka
CTC negativita 16 pacientek	CTC pozitivita 3 pacientky	CTC pozitivita 1 pacientka	CTC pozitivita 0 pacientek
		CTC negativita 2 pacientky	CTC negativita 1 pacientka
	CTC negativita 13 pacientek	CTC pozitivita 0 pacientek	CTC pozitivita 0 pacientek
		CTC negativita 13 pacientek	CTC negativita 0 pacientek
			CTC negativita 2 pacientky
			CTC negativita 6 pacientek
			CTC negativita 2 pacientky
			CTC negativita 13 pacientek

Třetí odběr periferní krve proveden po chirurgickém odstranění nádoru. U osmi pacientek byl proveden parciální chirurgický výkon a u 19 pacientek byla provedena kompletní ablace prsu. Pacientkám po parciálním výkonu byla z důvodu vysokého rizika vzniku lokoregionálních a systémových relapsů indikována pooperační radioterapie. U skupiny pacientek s ablací prsu bylo přistoupeno k podání adjuvantní hormonální léčby, která

byla u 4 pacientek doplněna o podání trastuzumabu. Pozitivita CTC byla před zahájením adjuvantní léčby nalezena u čtyř pacientek. U dvou pacientek přetrvávaly CTC již od vstupního vyšetření. U dalších dvou pacientek došlo k progresi onemocnění.

U skupiny S2 byl čtvrtý odběr periferní krve proveden po dokončení adjuvantní léčby. Pouze u dvou pacientek z této skupiny byly detekovány CTC. Jednalo se o pacientky do 35 let s vysoce agresivním typem nádoru („triple negativní“), které neodpovídaly na indikované léčebné režimy. U těchto pacientek byly prokázány vzdálené metastázy ve více jak dvou orgánech (CNS, skelet, játra), které byly příčinou jejich úmrtí. U 5 pacientek došlo k recidivě onemocnění. U 13 pacientek bylo v průběhu monitorování dosaženo kompletní patologické remise. Zbývající pacientky jsou v dispenzární péči pro karcinom prsu.



Obrázek 17 Asociace nálezu CTC v průběhu léčby u skupiny pacientek S2

Stejně jako pro skupinu S1, také i pro skupinu S2 jsme provedli testování hypotézy vlivu léčby na změny v přítomnosti CTC. Pomocí chí-kvadrát statistického testu (χ^2) jsme zjistili, že neoadjuvantní léčba neměla statisticky významný vliv změnu přítomnosti CTC. Naopak kombinace chirurgického odstranění primárního nádoru společně s podáním adjuvantní léčby

měla statisticky významný vliv na vymizení CTC z periferní krve u vyšetřovaných pacientek. Dále jsme také zjistily, že léčebné schéma zahrnující neoadjuvantní chemoterapii, chirurgické odstranění nádoru s následným podáním adjuvantní léčby má statisticky významný vliv na odstranění CTC z krevního řečiště. Dynamika změn v přítomnosti CTC u pacientek ze skupiny S2 včetně výsledku χ^2 je uvedena na obr 17. Je třeba zdůraznit, že statistické testování bylo provedeno na souboru 27 pacientek a z důvodu menšího statistického souboru, mohou být výsledky zkresleny.

Dynamika změn přítomnosti či absence CTC v průběhu léčby

U skupiny S1 byla přítomnost CTC prokázána ve 22 % případech (u 6 pacientek), zatímco u skupiny S2 byla pozitivita CTC u více než 40 % případů (u 11 pacientek) před zahájením léčebné intervence. Po chirurgickém zákroku u skupiny S1 míra positivity setrvala na 22 % a po podání adjuvantní chemoterapie došlo k poklesu na 10 %.

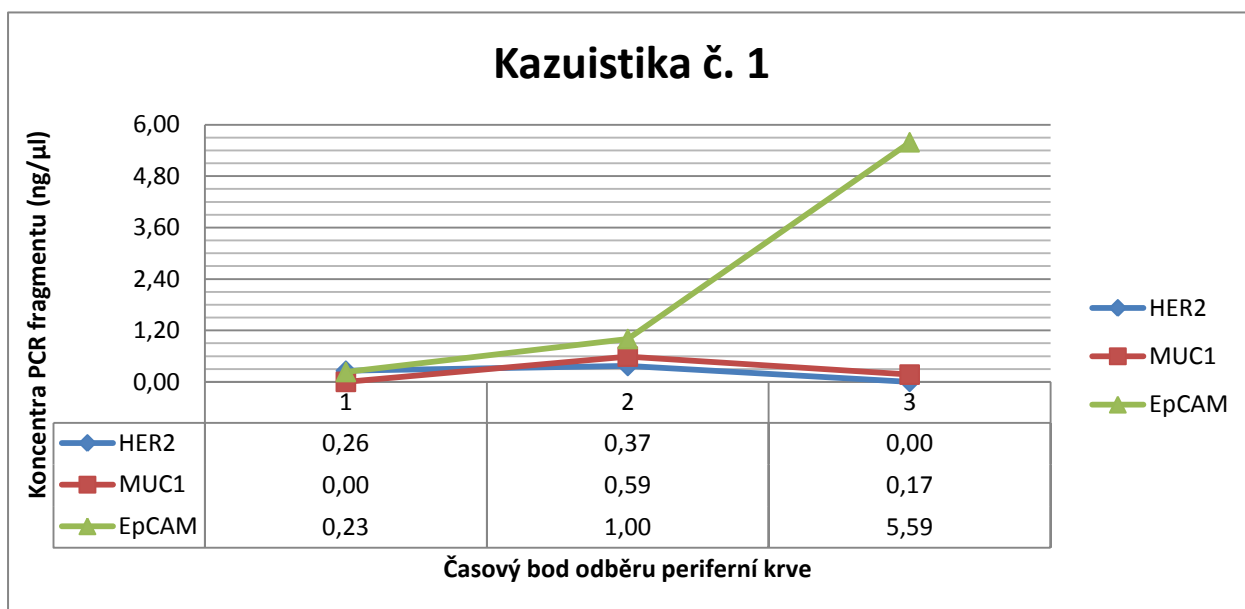
Tabulka 9: Pozitivita CTC v periferní krvi pacientek před chirurgickým zákrokem, adjuvantní chemoterapií a po jejím ukončení.

Skupina	Pacientky (N)	CTC pozitivita před chirurgickým zákrokem	CTC pozitivita před adjuvantní chemoterapií	CTC pozitivita po adjuvantní chemoterapii
S1	27	6 22%	6 22%	2 10%
S2	27	7 31 %	4 15%	2 10%

U skupiny S2 byla míra positivity před provedením chirurgického zákroku 31 %, po odstranění primárního nádoru došlo k poklesu na 15 % a po ukončení podávání adjuvantní léčby došlo k poklesu na 10 %. V celkové skupině pacientek byla permanentní pozitivita CTC ve všech provedených odběrech pozorována u 6 % pacientek, zatímco zcela negativní nález v průběhu sledování byl zjištěn u 55 % pacientek. Při porovnání výsledků stanovení CTC před a po podání neadjuvantní chemoterapie jsme zjistili, že u 16 % pacientek došlo ke změně stavu z CTC negativní na CTC pozitivní, zatímco ke změně z CTC pozitivní na CTC negativní došlo v 38 %. Obdobné srovnání bylo provedeno pro odběry před a po chirurgickém zákroku. Zjistili jsme, že u 11 % pacientek došlo ke změně z CTC negativity na CTC pozitivitu a u 38 % pacientek nebyly CTC ve vzorku detekovány, i když před chirurgickým zákrokem byl nález pozitivní. V průběhu podávání adjuvantní chemoterapie jsme u žádné pacientky neprokázaly nově CTC a u 38 % pacientek došlo k znegativnění výsledku CTC (viz Příloha č. 2).

3.3 Vybrané kazuistiky pacientek

Jak již bylo uvedeno, léčba pacientek s časným karcinomem prsu vychází z charakteristiky primárního nádoru (velikost nádoru, postižení axilárních lymfatických uzlin, grade nádoru, přítomnost hormonálních receptorů v nádorových buňkách a hormonální stav pacientky). Většina pacientek se stadiem I a II je léčena pro onemocnění karcinomem prsu kombinací chirurgické, chemoterapeutické, hormonální a biologické léčby v režimu adjuvantním či neoadjuvantním. Pro zhodnocení účinnosti zvolené léčby a pro sledování odpovědi pacientek na jednotlivé režimy bylo provedeno prospektivní monitorování průběhu onemocnění s využitím stanovení CTC v jednotlivých klíčových bodech léčby pacientek. Na základě vybraných kazuistik pacientek bychom rádi demonstrovali možný způsob sledování účinnost terapie hodnocené prostřednictvím detekce CTC v periferní krvi.



Obrázek 18: Prospektivní monitorování dynamiky CTC u pacientky s operabilním karcinomem prsu.

3.3.1 Kazuistika I

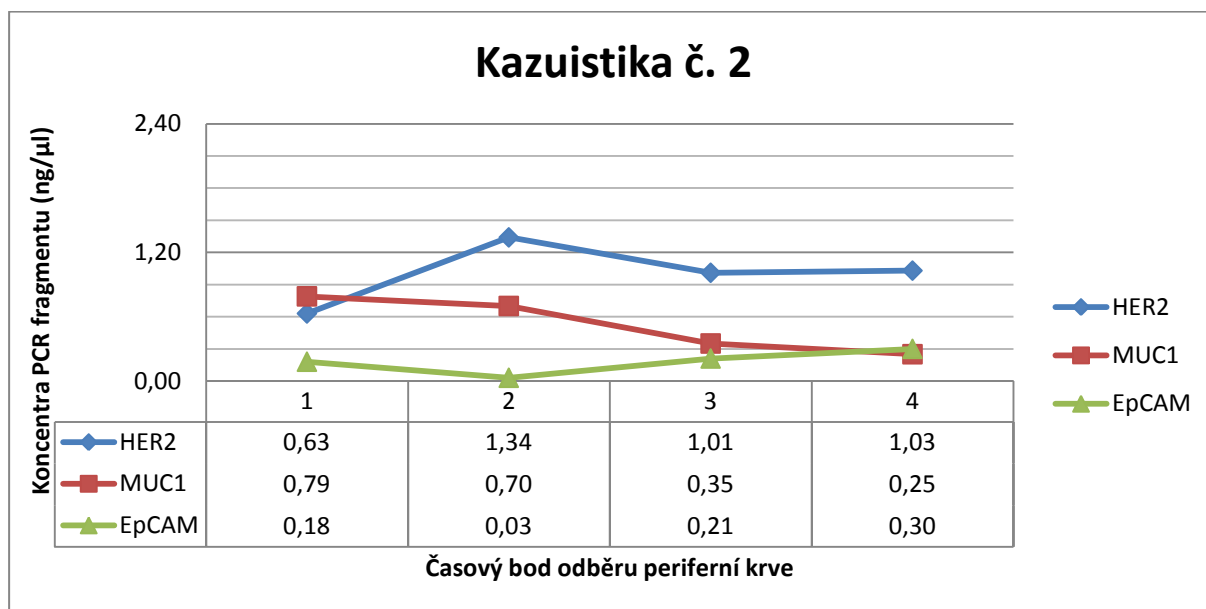
Pacientce při vstupu do studie bylo 34 let. Z důvodu operability primárního nádoru o velikosti T1c (větší než 1 cm, ne však více než 2 cm v největším rozměru), byla indikována k provedení kvadrantektomie. První odběr pro vyšetření CTC byl proveden před chirurgickým zákrokem. Výsledek vyšetření byl hraničně pozitivní pro markery HER2 a EpCAM. Z histopatologického a imunohistochemického vyšetření primárního nádoru bylo zjištěno, že se jedná o invazivní duktální karcinom, který je málo diferencovaný (G3) a nevykazuje přítomnost hormonálních receptorů a expresi HER2 na povrchu nádorových buněk. Pacientce byla aplikována adjuvantní radioterapie a chemoterapie sestávající z 6 cyklů FEC (5-

fluorouracil, epirubicin, cyklofosfamid). Před vlastní aplikací cytostatik byl proveden druhý kontrolní odběr periferní krve. Výsledek vyšetření byl pozitivní pro všechny sledované markery. V průběhu chemoterapeutické léčby byla zjištěna přítomnost lokoregionální recidivy. Pacientce byla následně provedena ablace prsu. Třetí odběr periferní krve byl proveden po ukončení adjuvantní léčby a výsledek výskytu CTC byl opět pozitivní. Pacientka měsíc po provedené ablaci zemřela. Jednalo se o vysoce agresivní typ karcinomu prsu, který se velmi rychle šířil a jeho léčba byla neúčinná. Již při prvním a následně druhém odběru byla zjištěna exprese HER2 v CTC. Toto zjištění mohlo vést k indikaci léčby trastuzumabem. Ze studií vyplývá, že u pacientek s HER2 negativním primárním nádorem mohou být v průběhu léčby prokázány nádorové buňky exprimující HER2. Tyto pacientky by mohly být vhodnými kandidátkami na léčbu trastuzumabem v případě, že zvolená léčebná strategie není účinná.

3.3.2 Kazuistika II

32leté pacientce byl diagnostikován karcinom prsu. Dle TNM klasifikace se jednalo o stádium IIB (T3N0M0). Pacientce byl objeven nádor větší než 5 cm. Histopatologické vyšetření primárního nádoru potvrdilo invazivní duktální karcinom s nízkou diferenciací nádorových buněk (G3). Imunohistochemické vyšetření prokázalo povrchovou expresi HER2 a hormonální nezávislost nádorových buněk. Pacientka podstoupila neoadjuvantní chemoterapeutickou léčbu (4x AC, 4x TH, Herceptin v monoterapii). Před zahájení léčby bylo provedeno vyšetření CTC. Výsledek prokázal pozitivní CTC (HER2, MUC1 pozitivní, EpCAM pozitivní - hraniční). Po 4 cyklech neoadjuvantní léčby byl proveden druhý odběr. Stanovení potvrdilo opětovnou přítomnost CTC. Ve srovnání s prvním odběrem došlo k nárůstu exprese HER a mírnému poklesu exprese MUC1 a k negativitě EpCAM. Po ukončení neoadjuvantní léčby (před chirurgickým zákrokem) byl proveden třetí odběr krve, jehož výsledek byl také pozitivní. Oproti předchozímu vyšetření došlo k poklesu exprese HER2 a MUC1 a k mírnému nárůstu EpCAM (z negativity na pozitivní – hraniční). Pacientka podstoupila ablaci prsu s exanterací axily a sentinelové uzliny a byla následně léčena v adjuvantním režimu cílenou léčbou (trastuzumab v monoterapii) a následně jí byla podávána hormonální léčba (goserelin). Pacientce i v po provedeném chirurgickém zákroku byla zjištěna přítomnost CTC. I přes podávání cílené léčby došlo u pacientky k progresi onemocnění ve formě metastatických ložisek postihujících játra a skelet. Vzhledem k velikosti primárního nádoru je možné se domnívat, že metastatický proces probíhal již od časného stádia onemocnění a docházelo ke kontinuálnímu uvolňování nádorových buněk do krevního oběhu. U pacientky nebyly prokázány metastázy v lymfatických uzlinách. Po celou

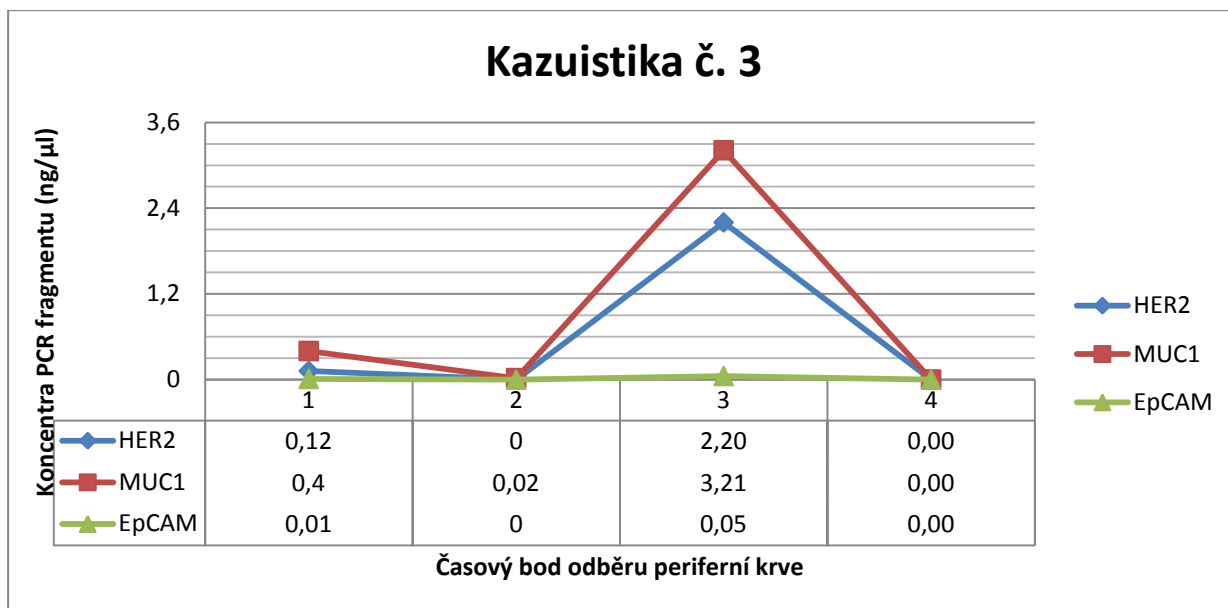
dobu léčby této HER2 pozitivní pacientky byly prokázány HER2 pozitivní CTC. Jejich přítomnost může být známkou rezistence pacientky na léčbu trastuzumabem. Léčebný efekt by mohl být pozorován po podávání lapatinibu, který má duální účinek na blokaci HER2 ale i HER1 receptoru. Pacientka zemřela v důsledku přítomnosti vzdálených metastáz.



Obrázek 19: Prospektivní monitorování dynamiky CTC u pacientky s inoperabilním karcinomem prsu.

3.3.3 Kazuistika III

Pacientce ve věku 42 let byl diagnostikován hormonálně dependentní karcinom prsu ve stadiu I (T1cN0M0). Jednalo se o invazivní duktální karcinom s gradem G3. Nádorové buňky ve vyšetřovaném vzorku nevykazovaly povrchovou expresi HER2. Pacientce byl před zahájením neoadjuvantní léčby proveden odběr periferní krve. Ve vzorku nebyla prokázána přítomnost CTC. Pacientka byla léčena 4 cykly AC a 4 cykly D. Po ukončení neoadjuvantní léčby byl proveden druhý odběr krve. Ani v tomto vzorku nebyly prokázány CTC. Pacientka poté podstoupila bilaterální ablaci s exanterací sentinelové uzliny. Před zahájením adjuvantní hormonální léčby byl proveden třetí odběr krve, který prokázal přítomnost CTC. Pacientka byla dlouhodobě léčena goserelinem a tamoxifenem. Poslední odběr pro vyšetření CTC byl proveden po 6 měsících podávání hormonální terapie. Vyšetření neprokázalo přítomnost CTC. Podáním hormonální systémové léčby došlo k potlačení diseminace nádorových buněk.

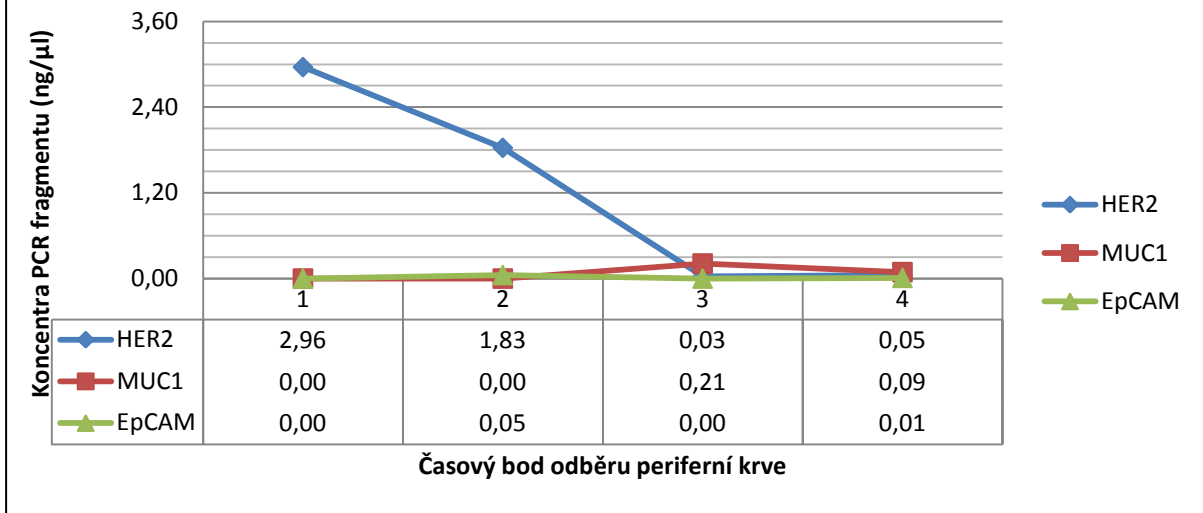


Obrázek 20: Prospektivní monitorování dynamiky CTC u pacientky s inoperabilním karcinomem prsu.

3.3.4 Kazuistika IV

22leté pacientce s diagnózou karcinomu prsu ve stadiu IIA (T2N0M0) byl histopatologicky verifikován invazivní duktální karcinom s nízkou diferenciací nádorových buněk. Imunohistochemicky byla potvrzena triple-pozitivita pro ER, PR a HER2. Pacientka podstoupila léčbu neadjuvantním podáváním 4 cyklů AC a 4 cyklů TH. Následně pacientka podstoupila exanteraci axily a marginální biopsii. V průběhu adjuvantní léčby podstoupila léčbu radioterapií a hormonální terapií v kombinaci s cílenou biologickou léčbou. Při vstupním vyšetření periferní krve byly prokázány HER2 pozitivní CTC, které přetrvávaly i po 4. cyklu neadjuvantní léčby. Třetí odběr byl vyšetřen po ukončení neadjuvantní léčby s Herceptinem®. Tento vzorek byl negativní na přítomnost CTC. Pacientka byla dále sledována po provedeném chirurgickém zákroku. V tomto vzorku opět nebyly CTC přítomny. Z opakovaného monitorování léčby prostřednictvím vyšetření CTC je zřejmé, že podáním cílené léčby proti HER2 receptoru je možné odstranit HER2 pozitivní CTC.

Kazuistika č. 4

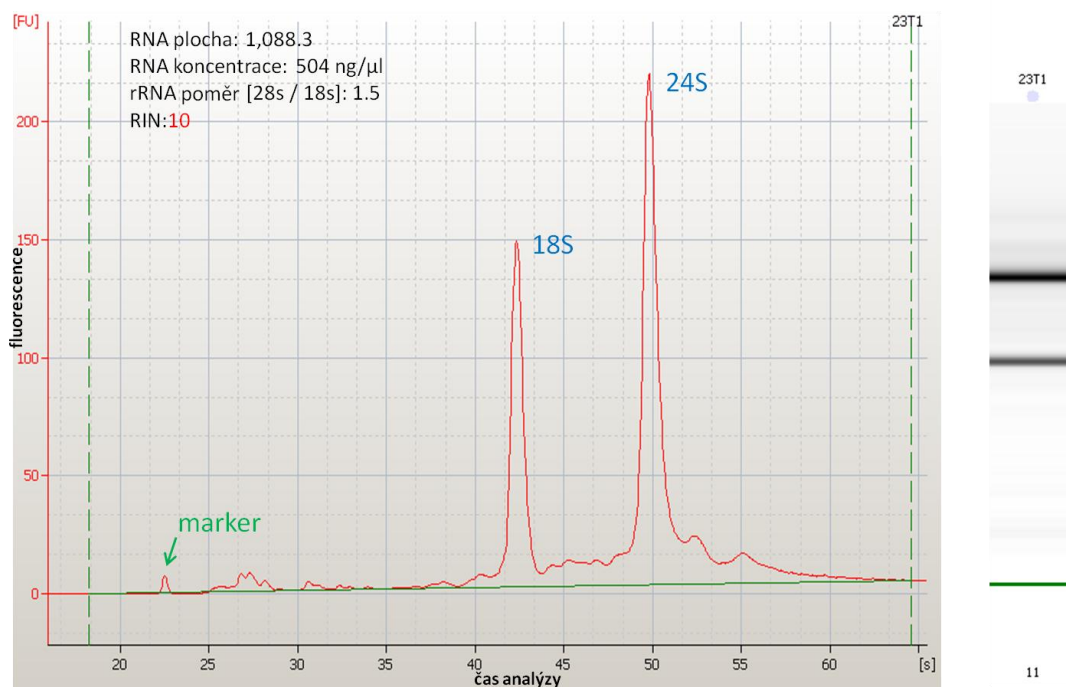


Obrázek 21: Prospektivní monitorování dynamiky CTC u pacientky s inoperabilním karcinomem prsu.

3.4 Sledování heterogenity CTC pomocí analýzy genové exprese vybraných nádorově specifických genů.

3.4.1 Stanovení koncentrace a kvality celkové RNA získané z PBMC

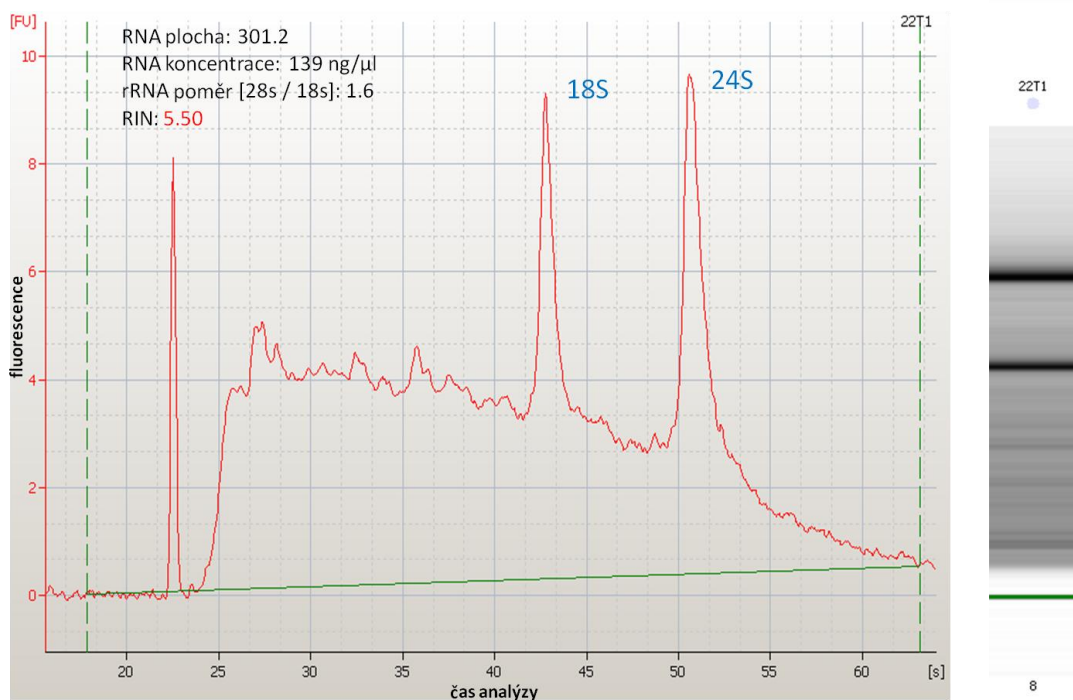
Hodnocení kvality a stanovení koncentrace celkové RNA, která byla izolovaná z mononukleárních buněk periferní krve, bylo provedeno s využitím tzv. mikrofluidní lab-on-chip technologie prostřednictvím přístroje Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Obr. 21 představuje charakteristický záznam analýzy vzorku RNA. Na elektroforeogramu jsou patrné dva píky odpovídající 18S a 24S bandům ribozomální RNA. Kvalita RNA je hodnocena pomocí RIN, což je softwarový nástroj, který automaticky přiřazuje číslo integrity celkové eukaryotické RNA.



Obrázek 22: Kontrola integrity a stanovení koncentrace izolované RNA pomocí RNA Nano kitu na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) - INTAKTNÍ RNA.

V případě obr. 21 je RIN rovno 10, což zaručuje intaktní RNA. U obr. 22 je RIN rovno 5.5 a z charakteru elektroforeogramu je patrné, že vzorek celkové RNA obsahuje fragmentované úseky způsobené degradací RNA. Vedle elektroforeogramu je obrázek gelu s jednotlivými fragmenty ribozomální RNA.

Pro analýzu exprese sledovaných genů byly vybrány vzorky RNA, jejichž hodnoty RIN byly v rozmezí 6 – 10.



Obrázek 23: Kontrola integrity a stanovení koncentrace izolované RNA pomocí RNA Nano kitu na přístroji Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) - ČÁSTEČNĚ DEGRADOVANÁ RNA.

3.4.2 Optimalizace qPCR analýzy pro sledované geny

Před vlastní analýzou genové exprese patientských vzorků jsme provedli stanovení specificity námi navržených primerů pro geny TOP1, TOP2, CSTD, ST6GAL, KRT19 a referenční gen aktin a účinnosti polymerázové řetězové reakce.

Pro jednotlivé studované geny byly připraveny standardní křivky pomocí několikanásobného ředění vzorku s neznámou koncentrací templátu cDNA. Ředící řada byla získána 10-ti násobným ředěním zásobního roztoku, čímž byly získány následující koncentrace od $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^2$ a $1 \cdot 10^1$. Pro každé ředění bylo pipetováno v replikátech. Standardní křivka byla sestrojena jako závislost log neznámé koncentrace templátu cDNA proti C_q hodnotám získaných během amplifikace pro jednotlivá ředění. U jednotlivých standardních křivek byla hodnocena její linearita ($R^2 > 0,980$), amplifikační účinnost (80 – 100%) a shoda mezi replikáty. Ředící řada by za ideálních podmínek měla poskytnout amplifikační křivky, jejichž jednotlivé fluorescenční křivky by měly být rovnoměrně rozloženy podle rovnice:

$$2^n = \text{diluční faktor}$$

Pro standardní křivky s dilučním faktorem 10 by hodnoty C_q měly být odděleny 3,32 cykly. Obr. 23 – 28 zobrazuje standardní a amplifikační křivka pro každý sledovaný gen. Účinnost primerů byla vypočítána dle vztahů:

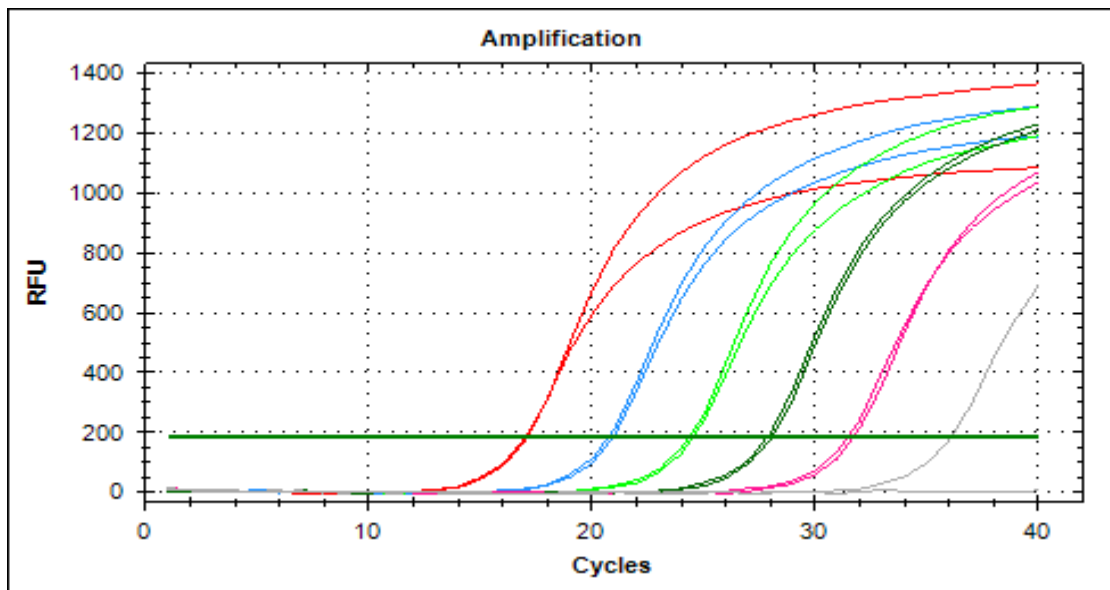
$$E = 10^{-1/\text{směrnice}}$$

$$\% \text{ Účinnosti} = (E - 1) * 100\%$$

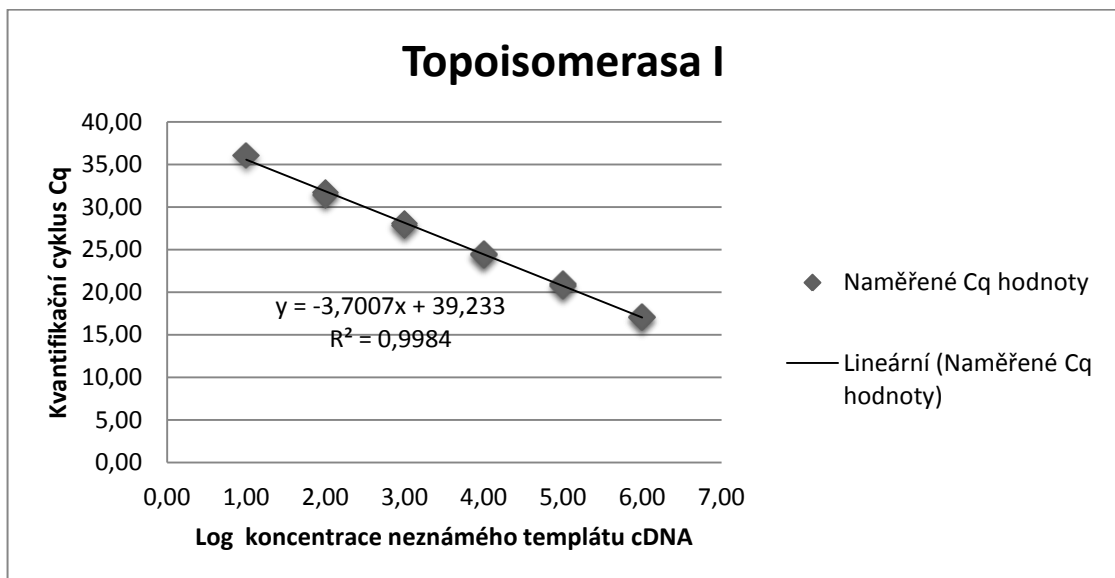
Následující obrázky (obr. 23 – 28) zobrazují amplifikační křivky (A) a standardní křivky (B) pro studované geny.

Topoisomerasa I

A)



B)

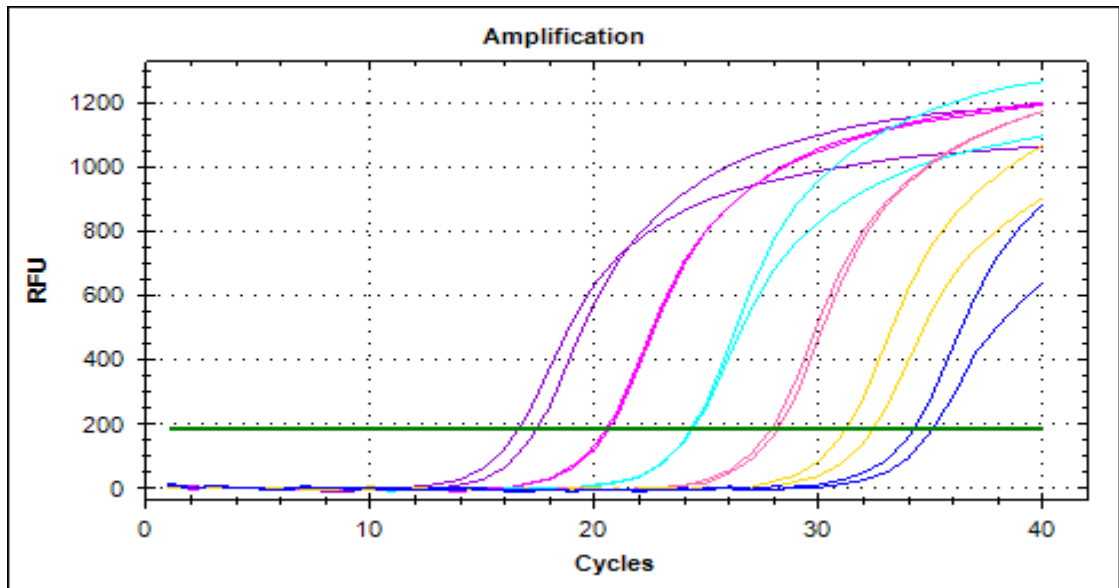


Obrázek 24: Tvorba standardní křivky pro gen Topoisomerasa I.

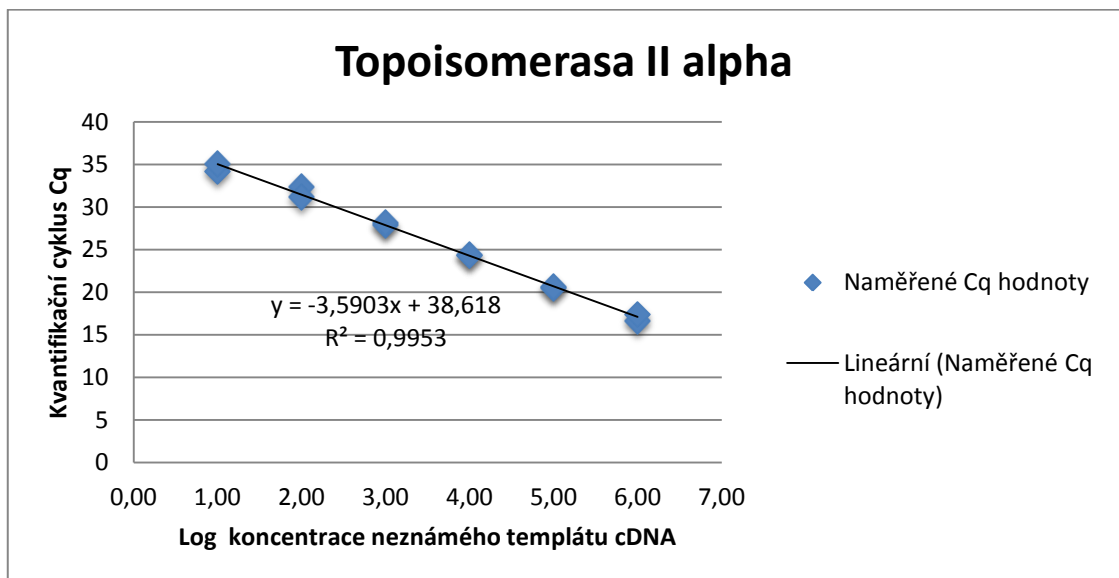
Standardní křivka byla vytvořena 10-ti násobným ředěním cDNA templátu, který byl amplifikován na přístroji. Každé ředění bylo analyzováno v replikátech. **A.** Amplifikační křivka ředící řady. **B.** Standardní křivka získaná vynesemím C_q hodnot proti log templátu cDNA s neznámou počáteční koncentrací. Rovnice regresní přímky a hodnoty jsou uvedeny v grafu včetně R². Vypočítaná účinnost testovaných primerů byla 86,30% (na konci každého cyklu se počet kopií ampliconu zvýšil 1,863krát).

Topoisomerasa II alpha

A)



B)

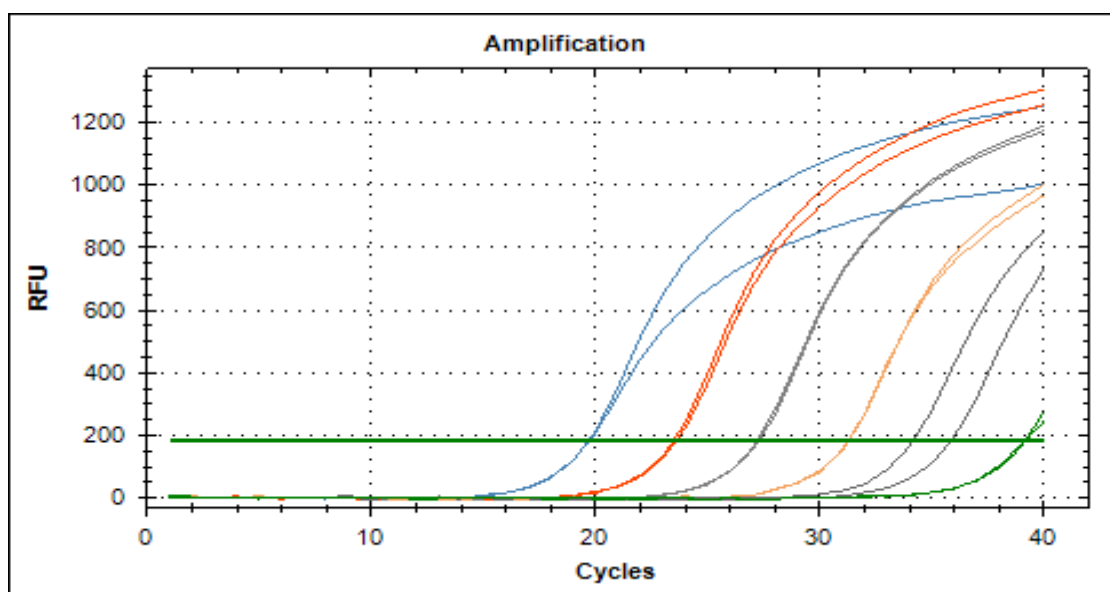


Obrázek 25: Tvorba standardní křivky pro gen Topoisomerasa II alpha.

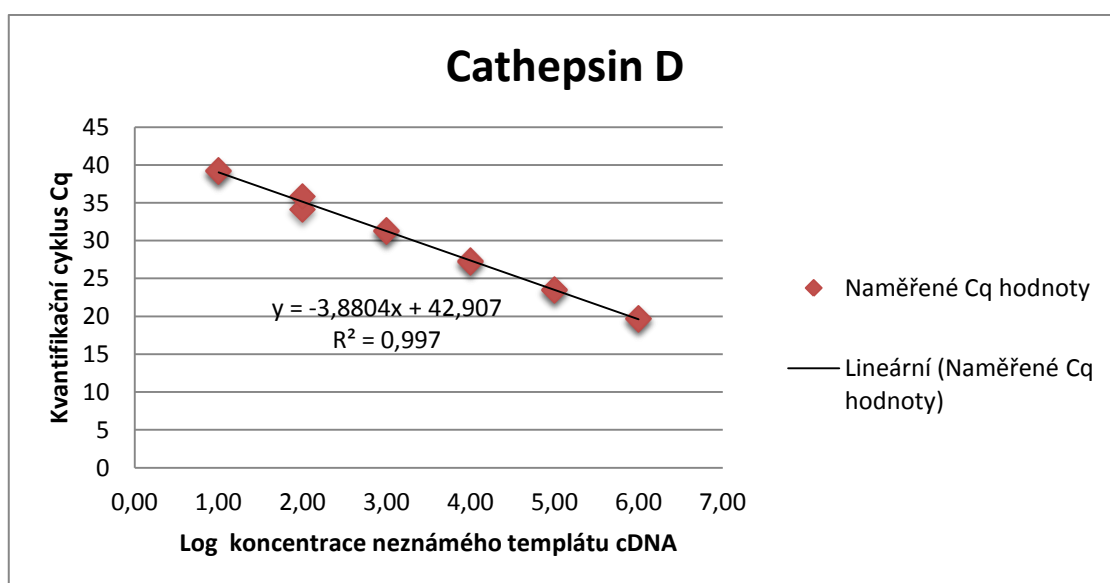
Standardní křivka byla vytvořena 10-ti násobným ředěním cDNA templátu, který byl amplifikován na přístroji. Každé ředění bylo analyzováno v replikátech. **A.** Amplifikační křivka ředící řady. **B.** Standardní křivka získaná vynesemím C_q hodnot proti log templátu cDNA s neznámou počáteční koncentrací. Rovnice regresní přímky a hodnoty jsou uvedeny v grafu včetně R^2 . Vypočítaná účinnost testovaných primerů byla 89,90% (na konci každého cyklu se počet kopií amplikonu zvýšil 1,899krát).

Cathepsin D

A)



B)

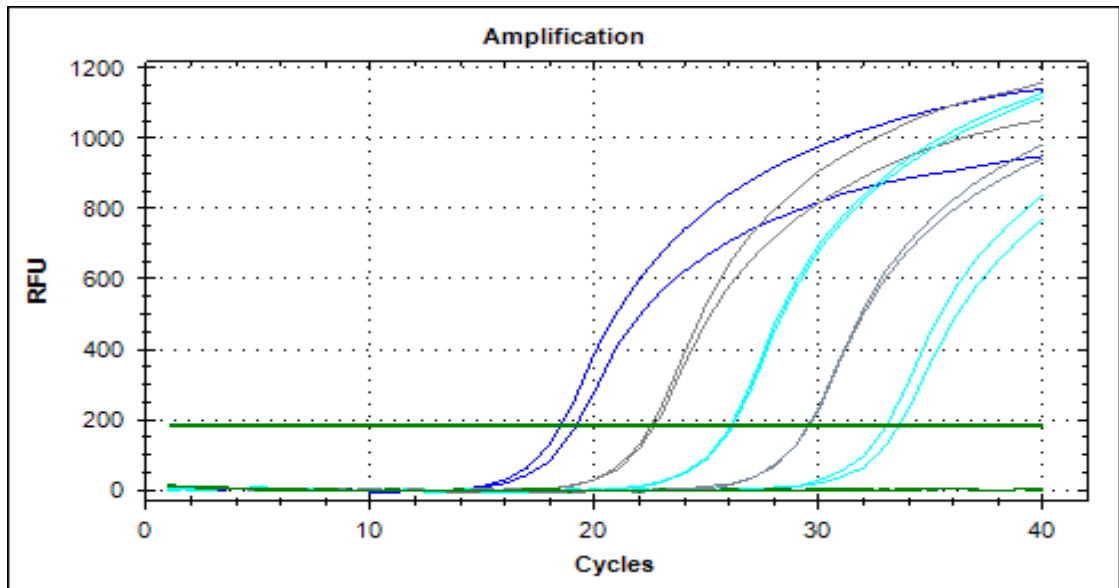


Obrázek 26: Tvorba standardní křivky pro gen Cathepsin D.

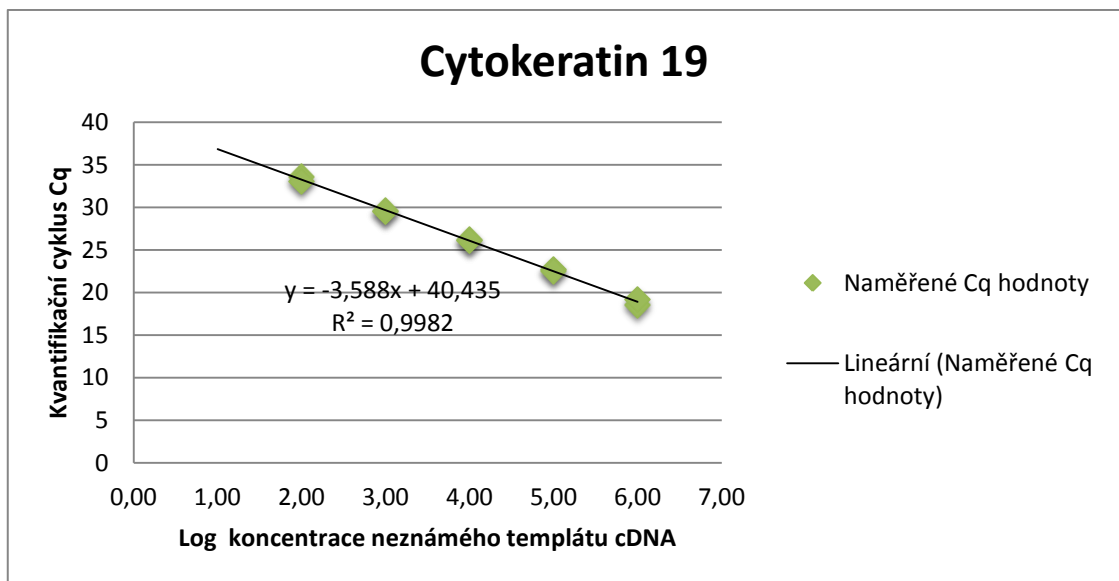
Standardní křivka byla vytvořena 10-ti násobným ředěním cDNA templátu, který byl amplifikován na přístroji. Každé ředění bylo analyzováno v replikátech. **A.** Amplifikační křivka ředící řady. **B.** Standardní křivka získaná vynesemím C_q hodnot proti log templátu cDNA s neznámou počáteční koncentrací. Rovnice regresní přímky a hodnoty jsou uvedeny v grafu včetně R^2 . Vypočítaná účinnost testovaných primerů byla 81% (na konci každého cyklu se počet kopií ampliconu zvýšil 1,810krát).

Cytokeratin 19

A)



B)

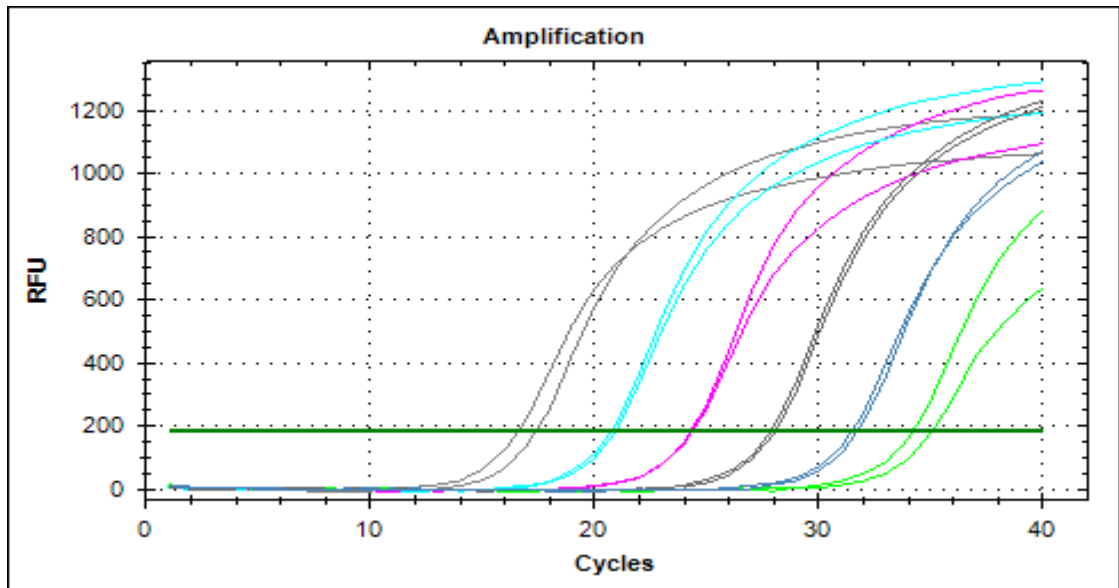


Obrázek 27: Tvorba standardní křivky pro gen Cytokeratin 19.

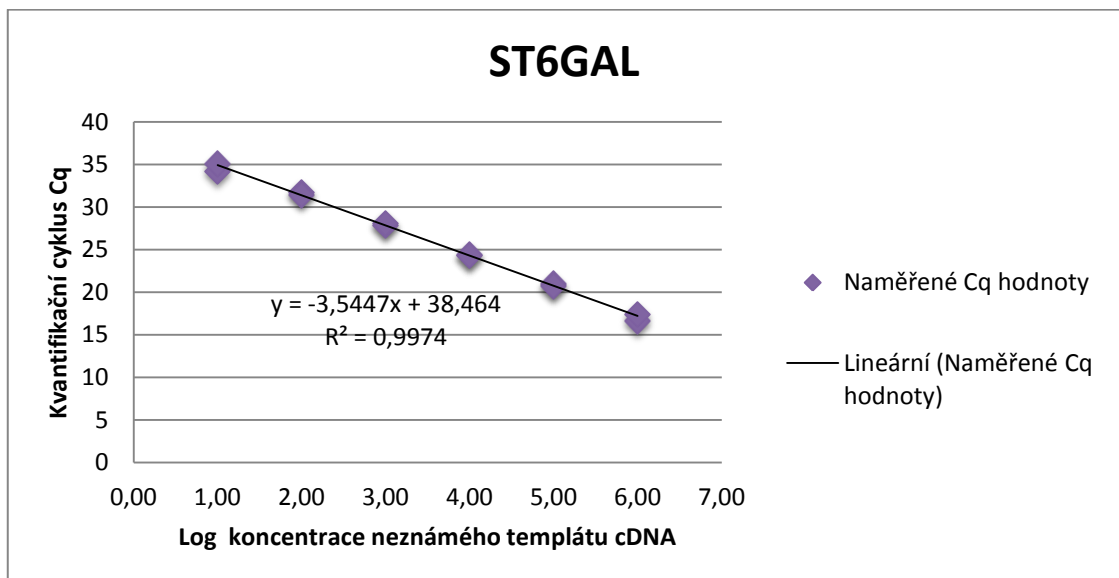
Standardní křivka byla vytvořena 10-ti násobným ředěním cDNA templátu, který byl amplifikován na přístroji. Každé ředění bylo analyzováno v replikátech. **A.** Amplifikační křivka ředící řady. **B.** Standardní křivka získaná vynesemím C_q hodnot proti log templátu cDNA s neznámou počáteční koncentrací. Rovnice regresní přímky a hodnoty jsou uvedeny v grafu včetně R^2 . Vypočítaná účinnost testovaných primerů byla 89,98% (na konci každého cyklu se počet kopií amplikonu zvýšil 1,900krát).

ST6GAL

A)



B)

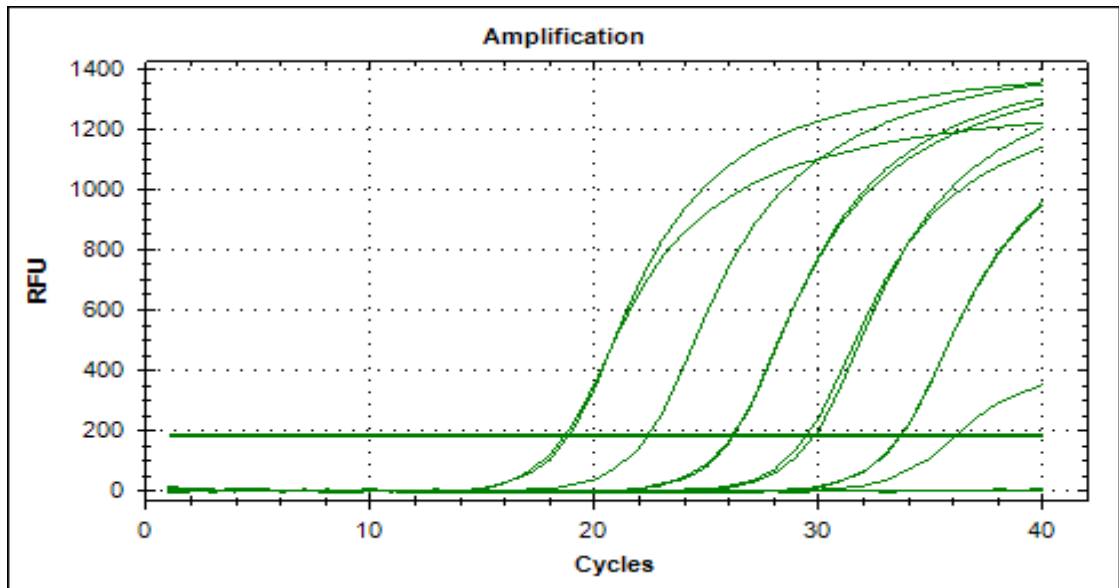


Obrázek 28: Tvorba standardní křivky pro gen ST6GALNAC5.

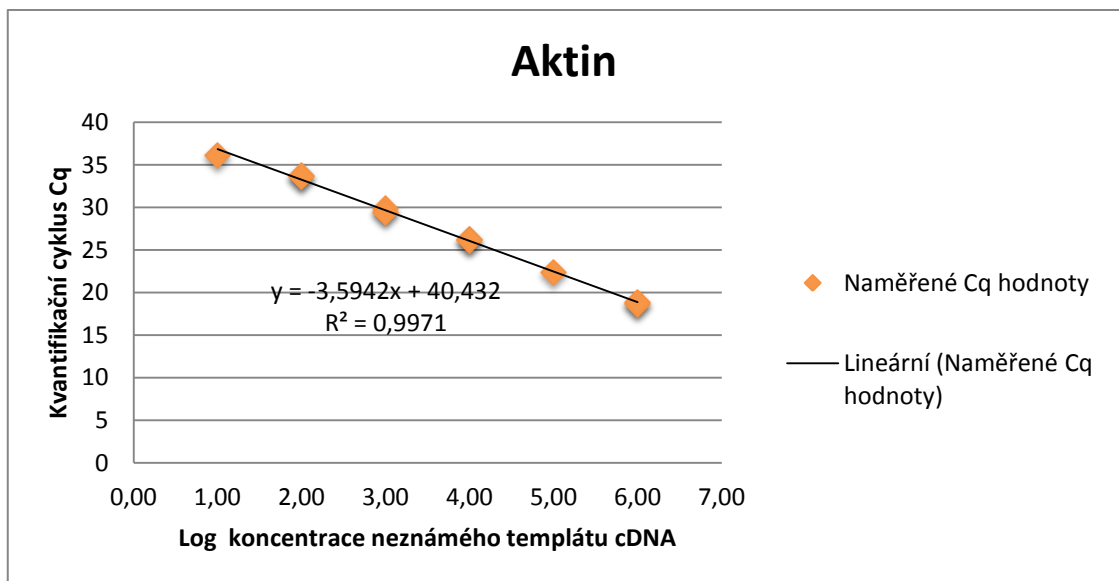
Standardní křivka byla vytvořena 10-ti násobným ředěním cDNA templátu, který byl amplifikován na přístroji. Každé ředění bylo analyzováno v replikátech. **A.** Amplifikační křivka ředící řady. **B.** Standardní křivka získaná vynesemím C_q hodnot proti log templátu cDNA s neznámou počáteční koncentrací. Rovnice regresní přímky a hodnoty jsou uvedeny v grafu včetně R^2 . Vypočítaná účinnost testovaných primerů byla 91,47% (na konci každého cyklu se počet kopií amplikonu zvýšil 1,915krát).

Aktin

A)



B)



Obrázek 29: Tvorba standardní křivky pro referenční gen Aktin.

Standardní křivka byla vytvořena 10-ti násobným ředěním cDNA templátu, který byl amplifikován na přístroji. Každé ředění bylo analyzováno v replikátech. **A.** Amplifikační křivka ředící řady. **B.** Standardní křivka získaná vynesemím C_q hodnot proti log templátu cDNA s neznámou počáteční koncentrací. Rovnice regresní přímky a hodnoty jsou uvedeny v grafu včetně R². Vypočítaná účinnost testovaných primerů byla 89,77% (na konci každého cyklu se počet kopií amplikonu zvýšil 1,898krát).

3.4.3 Porovnání a výběr vhodných reagensů pro provedení RT qPCR

RT qPCR představuje velmi důležitý krok pro citlivou a přesnou kvantifikaci. Množství cDNA vytvořené reverzní transkriptázou by mělo odpovídat počátečnímu množství použité RNA. Dynamické rozmezí, citlivost a specifická jsou hlavními důvody pro úspěšně provedenou RT qPCR. Komerčně dostupné reagensie pro RT qPCR se ve značné míře liší v jejich senzitivě a specifitě a typu reverzní transkriptázy, což se v průběhu experimentu může projevit posunem C_q hodnot odpovídajícím jednomu řádu počátečního množství templátu. Pro zvýšení senzitivity a specifity genové analýzy bylo provedeno porovnání dvou RT qPCR kitů. Jako první byl použit TaqMan Reverse Transcription Reagents (N808-0234, Applied Biosystems) a druhým byl Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04379012001, Roche). RT qPCR byla provedena dle návodu výrobce. Jako testovací vzorek byla použita směs připravené smícháním 5 různých patientských vzorků RNA. Testovací vzorek byl připraven v replikátech společně s negativní kontrolou (vzorek bez templátové RNA) a blankem (vzorek bez reverzní transkriptázy). Vzorek byl následně analyzován pomocí qPCR pro referenční gen Aktin. Následně byly porovnány průměrné hodnoty C_q . Účinnost RT qPCR kitu byla vypočítána dle následujícího vztahu:

$$\text{porovnání} = (\text{prům}Cq_{\text{TaqMan}} - \text{prům}Cq_{\text{Transcriptor}})^{1 + u_{\text{Aktin}}}$$

Tabulka 10: Porovnání účinnosti RT qPCR kitů.

Název RT qPCR kitu	Průměr C_q pro Aktin	Výsledek
Taqman Reverse Transcription Reagents	31,95	Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit je <u>23krát účinnější</u> v porovnání s TaqMan Reverse Transcription Reagents.
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	27,05	

Všechny navržené primery pro detekci sledovaných genů splňovaly předem stanovené podmínky. Standardní křivky všech genů vykazovaly lineární závislost ($R^2 > 0,980$). Amplifikační křivky při dilučním faktoru 10 by za ideálních podmínek měly být od sebe vzdáleny 3,32 cyklu. Amplifikační křivky v našem případě byly od sebe vzdáleny: TOP1 3,81 cyklu; TOP2 3,53 cyklu; CTSD 3,90 cyklu; KRT19 3,61 cyklu, ST6GAL 3,53 cyklu a pro referenční gen aktin 3,49 cyklu. Ze směrnice rovnice regresní přímky byla vypočítána

účinnost primerů pro jednotlivé geny, a to vyšší než 80 % u TOP1, TOP2A, CTSD, KRT19, Aktin a u genu ST6GAL dokonce vyšší než 90%. Hodnoty účinnosti blížící se 100% jsou nejlepším indikátorem robustní a reprodukovatelné eseje. Na základě zjištění vyšší účinnosti Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kitu jsme se rozhodli použít tyto reagenty pro analýzu exprese genů v CTC a PBMC.

3.4.4 Rozdíl exprese TOP1, TOP2A, CTSD, KRT 19, ST6GAL mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a mononukleárními buňkami periferní krve

Vzorky 17 pacientek s pozitivitou CTC byly použity pro zhodnocení rozdílnosti exprese TOP1, TOP2A, CTSD, KRT 19, ST6GAL a referenčního genu aktinu. Pro každý gen bylo provedeno porovnání exprese ve vzorku cirkulujících nádorových buněk se vzorkem PBMC. Vzorek PBMC byl použit pro stanovení základního pozadí sledovaných genů z důvodu existence nelegitimní exprese nádorově specifických genů krevními buňkami. Sledované geny byly vybrány nejen na základě jejich spojitosti s proliferační aktivitou nádorových buněk ale také jako ukazatel citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutické léčbě. Je nutné podotknout, že pro stanovení a porovnání genové exprese bylo možné použít pouze vzorky, ve kterých byla prokázána přítomnost CTC.

Tabulka 11: Srovnání genové exprese mezi CTC a PBMC

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	SD	p-value
TOP1	CTC	17	26,45	26,45	22,16	33,14	2,58	< 0,001
	PBMC	17	32,41	32,25	30,48	34,40	1,01	
TOP2A	CTC	17	30,17	30,17	27,60	36,11	1,72	0,040
	PBMC	17	35,01	35,13	33,21	35,99	0,54	
CTSD	CTC	17	28,00	28,00	20,38	35,44	3,55	<0,001
	PBMC	17	34,91	34,61	32,39	37,38	1,15	
ST6GAL	CTC	17	34,65	38,07	4,55	39,72	8,90	<0,001
	PBMC	17	36,79	37,41	32,90	39,64	2,24	
KRT19	CTC	17	36,46	36,46	33,39	38,01	0,94	<0,001
	PBMC	17	25,13	25,13	21,05	31,48	2,45	

Expres sledovaných genů v cirkulujících nádorových buňkách byla signifikantně vyšší ve srovnání s expresí v PBMC ($p < 0,001$). Tabulka 11 shrnuje rozdíly exprese

v analyzovaných vzorcích. Hodnoty uvedené v tabulce odpovídají naměřeným C_q hodnotám. Průměrné C_q hodnoty sledovaných genů byly nižší v CTC než PBMC, což vypovídá o tom, že v CTC byla vyšší exprese sledovaných genů než u PBMC. Výjimkou byl gen KRT19, u kterého jsme v PBMC zjistili vyšší expresi v porovnání s CTC.

3.4.5 Exprese genu TOP1, TOP2A, CTSD, KRT 19, ST6GAL v cirkulujících nádorových buňkách ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám primárního nádoru

Provedli jsme korelaci naměřené genové exprese sledovaných genů s klasickými klinicko-patologickými parametry primárního nádoru pacientek s prokázanou přítomností CTC. V následujících tabulkách (Tab. 12 - 16) jsou uvedeny genové exprese pro TOP1, TOP2A, CTSD, KRT 19, ST6GAL u pacientek rozdělených do skupin podle TNM klasifikace, postižení lymfatických uzlin, přítomnosti ER, PR, HER2 receptorů a diferenciaci a typu nádoru. Pro gen TOP1 jsme zjistili statisticky významný rozdíl exprese mezi HER2 pozitivní a HER2 negativními pacientkami.

Tabulka 12: Exprese TOP1 ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám souboru.

TOP1	N	Průměr	Minimum	Maximum	SD	p-value
T1	5	27,10	22,16	33,14	3,93	0,173
T2	9	26,10	22,93	30,82	2,27	
T3+4	3	26,45	26,45	26,45	0,00	
N0	10	26,45	22,16	30,82	2,08	0,090
N1	6	26,45	22,93	33,14	3,67	
ER-	8	26,64	22,16	33,14	3,01	0,458
ER+	9	26,28	22,93	30,82	2,29	
PR-	9	26,62	22,16	33,14	2,82	0,723
PR+	8	26,26	22,93	30,82	2,45	
HER-	10	26,86	22,16	33,14	3,23	0,025
HER+	7	25,87	23,27	26,45	1,19	
G1	1	26,45	26,45	26,45	0,00	1,000
G2	8	25,62	22,16	30,82	2,79	
G3	8	27,28	25,58	33,14	2,41	
IDC	15	26,45	22,16	33,14	2,75	1,000
ILC	2	26,45	26,45	26,45	0,00	

Pro gen TOP2A byla zjištěna statisticky významná exprese s ohledem na velikost nádoru. U pacientek s velikostí nádoru odpovídající T1 byla vyšší exprese TOP2A ve srovnání s pacientkami s nádory T2 – T4. Expresa TOP2A byla statisticky významná ve vztahu s pozitivitou estrogenových a progesteronových receptorů.

Tabulka 13: Expresa TOP2A ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám souboru.

TOP2A	N	Průměr	Minimum	Maximum	SD	p-value
T1	5	29,82	28,43	30,17	0,78	
T2	9	30,36	27,60	36,11	2,35	0,048
T3+4	3	30,17	30,17	30,17	0,00	
N0	10	30,58	28,43	36,11	2,02	0,244
N1	6	29,48	27,60	30,17	1,12	
ER-	8	29,94	28,43	30,17	0,61	0,002
ER+	9	30,37	27,60	36,11	2,35	
PR-	9	29,97	28,43	30,17	0,58	<0,001
PR+	8	30,39	27,60	36,11	2,51	
HER-	10	30,43	28,43	36,11	2,11	0,071
HER+	7	29,79	27,60	30,17	0,97	
G1	1	30,17	30,17	30,17	0,00	1,000
G2	8	30,17	27,60	36,11	2,60	
G3	8	30,16	30,12	30,17	0,02	
IDC	15	30,17	27,60	36,11	1,84	1,000
ILC	2	30,17	30,17	30,17	0,00	

Pro gen CTSD byla zjištěna statisticky významná exprese v souvislosti s velikostí nádoru. Pacientky s nádorem o velikosti T2 měly vyšší expresi tohoto genu než pacientky s T1 a T3-T4 nádory. Významná exprese byla ve vztahu k přítomnosti HER2 receptoru, ale nebyla statisticky prokázána.

Tabulka 14: Expresa CTSD ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám souboru.

CTSD	N	Průměr	Minimum	Maximum	SD	p-value
T1	5	28,78	20,38	35,44	6,53	
T2	9	27,56	22,83	29,22	1,82	0,002
T3+4	3	28,00	28,00	28,00	0,00	
N0	10	26,54	20,38	29,22	2,87	0,666
N1	6	29,24	28,00	35,44	3,04	
ER-	8	27,33	20,38	35,44	4,42	0,195
ER+	9	28,59	24,95	35,15	2,71	

PR-	9	27,40	20,38	35,44	4,14	0,359
PR+	8	28,66	24,95	35,15	2,89	
HER-	10	28,51	20,38	35,44	4,38	0,062
HER+	7	27,26	22,83	28,00	1,95	
G1	1	28,00	28,00	28,00	0,00	1,000
G2	8	27,20	20,38	29,22	2,79	
G3	8	28,79	22,83	35,44	4,43	
IDC	15	28,00	20,38	35,44	3,80	1,000
ILC	2	28,00	28,00	28,00	0,00	

Pro gen ST6GAL byla zjištěna statisticky významná exprese nejen ve vztahu k velikosti nádoru, ale také k přítomnosti estrogenových a progesteronových receptorů. Navíc u invazivního lobulárního karcinomu byla zjištěna statisticky významně zvýšená exprese ve srovnání s invazivním duktálním typem karcinomu prsu.

Tabulka 15: Expresa ST6GAL ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám souboru.

ST6	N	Průměr	Minimum	Maximum	SD	p-value
T1	5	38,71	38,07	39,72	0,84	
T2	9	31,20	4,55	39,09	11,35	<0,001
T3+4	3	38,24	36,10	39,38	1,85	
N0	10	33,47	4,55	39,52	10,81	0,211
N1	6	35,77	24,27	39,38	5,83	
ER-	8	31,72	4,55	38,13	11,93	0,008
ER+	9	37,25	26,62	39,72	4,22	
PR-	9	32,56	4,55	39,24	11,44	0,021
PR+	8	37,00	26,62	39,72	4,44	
HER-	10	34,75	4,55	39,72	10,69	0,215
HER+	7	34,50	24,27	39,52	6,33	
G1	1	36,10	36,10	36,10	0,00	1,000
G2	8	32,11	4,55	39,52	12,20	
G3	8	37,00	26,62	39,72	4,29	
IDC	15	36,44	24,27	39,72	4,66	<0,001
ILC	2	21,20	4,55	37,84	23,54	

Pro gen KRT19 nebyla zjištěna žádná statisticky významná závislost s klinicko-patologickými charakteristikami sledované skupiny pacientek (viz Příloha č. 2).

Tabulka 16: Exprese KRT19 ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám souboru.

KRT 19	N	Průměr	Minimum	Maximum	SD	p-value
T1	5	35,84	33,39	36,46	1,37	0,087
T2	9	36,80	35,94	38,01	0,68	
T3+4	3	36,46	36,46	36,46	0,00	
N0	10	36,19	33,39	37,41	1,05	0,441
N1	6	36,90	36,46	38,01	0,70	
ER-	8	36,01	33,39	36,46	1,07	0,144
ER+	9	36,86	36,46	38,01	0,62	
PR-	9	36,06	33,39	36,46	1,02	0,242
PR+	8	36,91	36,46	38,01	0,64	
HER-	10	36,35	33,39	37,54	1,12	0,193
HER+	7	36,61	35,94	38,01	0,65	
G1	1	36,46	36,46	36,46	0,00	1,000
G2	8	36,52	33,39	38,01	1,41	
G3	8	36,39	35,94	36,46	0,18	
IDC	15	36,46	33,39	38,01	1,01	1,000
ILC	2	36,46	36,46	36,46	0,00	

Dále byly publikovány výsledky získané v rámci řešení grantových projektů zaměřených na problematiku cirkulujících nádorových buněk nejen u karcinomu prsu ale také u karcinomu prostaty (viz Příloha č. 3, 4 a 7), které nejsou uvedeny v této disertační práci.

4 DISKUSE

V současné době se molekulární diagnostika u pacientů s nádorovým onemocněním zejména zaměřuje na primární nádor, jehož součástí jsou invazivní ale i neinvazivní nádorové buňky. Pro hodnocení rizika relapsu nebo progresu onemocnění jsou pouze klinicky relevantní nádorové buňky s invazivním potenciálem. CTC reprezentují skupinu nádorových buněk uvolněných do krevního systému a jsou připravené kolonizovat vzdálené orgány a z klinického hlediska představují potenciální riziko pro pacienty.

CTC je možné detekovat již v časných stádiích onemocnění. I přesto stále dominují klinické studie probíhající u pacientek s metastatickým onemocněním, u nichž byla prokázána významnost CTC jako prognostického markeru. V této práci jsme se proto zaměřili na stanovení přítomnosti CTC u pacientek s časným karcinomem prsu a zejména u žen v rizikovém věku do 35 let. Zjistili jsme, že CTC je možné prokázat v periferní krvi u více jak 30% pacientek s karcinomem před zahájením léčby. Ve srovnání s dosud publikovanými výsledky několika studií zaměřených na detekci CTC u časného karcinomu prsu bylo popsáno detekční rozmezí od 9,4 – 48,6% (83, 88, 95-97). Toto detekční rozmezí může být ovlivněno použitím odlišného detekčního systému, zařazením různých klinických stadií, počtem zařazených pacientek a množstvím odebraného vzorku.

Korelací přítomnosti CTC s dostupnými histopatologickými a imunohistochemickými charakteristikami jsme nezjistili žádnou závislost. Frekvence výskytu CTC byla nejčastěji prokázána u pacientek s T2 velikostí primárního nádoru (43%), bez zasažení lymfatických uzlin metastázami (32%), u duktálního karcinomu prsu (33%) a u gradu III (48%). Sledováním vztahu mezi pozitivitou CTC a přítomností hormonálních receptorů v primárním nádoru bylo zjištěno, že CTC byly převážně detekovány u pacientů s ER, PR a HER2 pozitivitou (36%, 32%, 30%). Obdobné výsledky byly publikovány Krishnamurthy at al., kteří sledovali výskyt CTC a DTC u žen s časným stadiem I a II karcinomu prsu a hodnotili korelaci přítomnosti CTC s ostatními prognostickými markery. Také nenalezli korelaci mezi přítomností CTC a klasifikací nádoru, histologickým gradem, stavem hormonálních receptorů a lymfatických uzlin. CTC v jejich případě byly detekovány u 33 % ER, 32 % PR a 25 % HER2 pozitivních pacientek (97). V této studii byl použit pro získání obohacené frakce CTC a jejich detekci CellSearch™ System založený na imunomagnetické separaci CTC pomocí anti-EpCAM protilátky v kombinaci s imunofluorescenční detekcí těchto buněk použitím anti-CK, anti-CD45 a DAPI. My jsme pro stanovení CTC ve vzorcích periferní krve používali diagnostický systém AdnaTest®, který je založený na imunomagnetické separaci CTC z krve

pacientů a ty jsou následně prokázány pomocí detekce epiteliálních a nádorově specifických genů (HER2, MUC1 a EpCAM). Studie zaměřená na porovnání těchto dvou detekčních systémů poukázala na ekvivalenci AdnaTestu® a CellSearch™ systému pro průkaz CTC u metastatického karcinomu prsu. Na základě nedávno publikovaných dat je zřejmá konkordance výsledků získaných pomocí CellSearch™ systému a AdnaTestu® a to až v 88%. Pro izolaci CTC je nejčastěji používaným povrchovým markerem EpCAM. Nevyhnutelnou limitací izolačních technik založených na použití povrchových markerů je, že buňky, u nichž tento marker chybí, nemohou být zachyceny. Ačkoli většina epiteliálních CTC exprimují EpCAM, u některých podskupin nádorových buněk to tak nemusí být. Příkladem jsou normal-like nádorové buňky prsu, které EpCAM neexprimují (98). Obdobně to platí i pro velmi málo diferencované buňky, stem-cell like buňky a buňky s EMT (60). Často právě tyto buňky jsou biologicky velmi důležitou podskupinou s výrazným klinickým dopadem. Proto je vhodné použít kombinaci několika markerů. Při imunomagnetické separaci pomocí AdnaTestu® je použita kombinace EpCAM a MUC1.

Pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie a molekulárních metod bylo zjištěno, že CTC jsou vysoce heterogenní buňky, pokud jde o genetické aberace a profily genové exprese. Stanovení a sledování této heterogenity je velmi důležité pro hodnocení agresivity minimální reziduální choroby a také v případech, kdy terapeutické cíle jsou přítomny právě na těchto buňkách. V průběhu hodnocení fenotypu CTC u sledované skupiny pacientek jsme zjistili značnou heterogenitu v expresi specifických genů použitých pro jejich detekci. Nejčastěji exprimovaným markerem CTC byl MUC1 (70%), dále pak HER2 (52%) a EpCAM (35%). Při sledování stavu HER2 u primárního nádoru a CTC byla zjištěna neshoda u 20 % pacientek. Tyto výsledky naznačují, že u skupiny pacientek s HER2 negativním primárním nádorem mohou být přítomny CTC s pozitivní expresí HER2. Na základě těchto informací by tato skupina pacientek mohla mít prospěch z podání anti-HER2 cílené terapie. Obdobně, ve studii publikované Zidan et al., byl uveden stupeň diskordance v HER2 statusu u primárního nádoru prsu a odpovídající metastázy 26% (99). Pravděpodobná příčina těchto fenotypových/genotypových změn může souviset se silnou selekcí buněk v průběhu diseminace a systémové léčby. Genomová nestabilita může tak vést ke vzniku nových klonů nádorových buněk lišících se od primárního nádoru. Navíc se CTC mohou uvolňovat zpět do oběhového systému ze sekundárních orgánů a tudíž jejich fenotypové/genotypové vlastnosti mohou připomínat nádorové buňky z okultních metastatických ložisek než nádorové buňky primárního nádoru (100).

Pro sledování pacientek s karcinomem prsu v průběhu léčebného procesu je stěžejní opakované vyšetřování jejich krevních vzorků. Vzhledem k tomu, že odběr kostní dřeně pro odhalení minimální reziduální choroby představuje invazivní zákrok, odběr periferní krve pro stanovení CTC je snadno dostupným biologickým materiálem. Proto je možné provádět opakované odběry pro hodnocení prognózy onemocnění a monitorování systémové terapie. Prostřednictvím opakovaných odběrů periferní krve v přesně definovaných časových bodech jsme provedli prospektivní monitorování průběhu nemoci u jednotlivých pacientek. Podle indikované léčby byly pacientky rozděleny do dvou skupin. První skupina pacientek byla nejdříve indikována k odstranění primárního nádoru a následně podstoupila adjuvantní systémovou léčbu. Druhá skupina pacientek s často inoperabilním karcinomem prsu podstoupila nejdříve neoadjuvantní léčbu následovanou chirurgickým odstraněním primárního nádoru v kombinaci s adjuvantní léčbou. U první skupiny pacientek jsme pozorovali, že pouze 22% pacientek zůstalo po chirurgické léčbě CTC pozitivních. U 19 % pacientek, u nichž při vstupním vyšetření nebyly CTC prokázány, došlo k objevení CTC po chirurgickém zákroku. Naše výsledky odpovídají studii hodnotící CTC u pacientek s lokalizovaným primárním nádorem prsu. U 30 % pacientek byly prokázány CTC po operačním zákroku (101). Přítomnost CTC po operaci může být v důsledku existence velmi malého ložiska nádorových buněk přetrvávajících ve vzdálených orgánech. Mohou tak představovat rezervoár, ze kterého se CTC mohou uvolňovat zpět do oběhového systému (82). U druhé skupiny pacientek byla zjištěna incidence CTC před neoadjuvantní léčbou u 40 % pacientek a po jejím ukončení došlo k poklesu u 25%. Výsledky randomizované studie II fáze (REMAGUS 02) odpovídaly námi zjištěným závěrům (87). Obdobně tomu bylo i u studie GeparQuattro(88). Při sledování účinnosti adjuvantní léčby na přítomnost CTC jsme zjistili, že incidence CTC před podáním léčby byla 22% a po jejím ukončení poklesla na pouhých 7%. Řada studií potvrdila možnost stanovení CTC jako prediktivního faktoru pro časný relaps onemocnění. Výsledky studie SUCCESS naznačují asociaci přítomnosti CTC před léčbou s redukcí DFS a OS, zatímco přítomnost CTC po léčbě je pouze asociována s redukováním DFS (84). Použití CTC jako markeru pro monitorování průběhu onemocnění je stále intenzivně studováno. Neexistuje dosud jednoznačná shoda o tom, kdy je nejvhodnější provádět stanovení CTC. Životaschopnost CTC v krevním oběhu je velmi krátká. Stanovení CTC před primární léčbou by mohlo být použito pro hodnocení prognózy onemocnění a ke stanovení přítomnosti či absence léčebných cílů. Stanovení CTC po léčbě by mohlo být použito k určení, zda podaná léčba je či není efektivní. Hodnocení CTC po primární léčbě poskytuje informace o okultních metastatických depozitech, zatímco CTC hodnocené před

léčbou mohou vypovídat o diseminační kapacitě primárního nádoru. Stále ale chybí data porovnávající klinickou relevanci stanovení CTC v těchto časových bodech.

Objevuje se stále více důkazů nasvědčujících, že CTC poukazují na progresi nádoru ve skutečném čase a jejich molekulární charakterizace může být důležitá zejména pro vedení specifické cílené terapie. Odběr periferní krve pro stanovení CTC je v současné době označován jako tzv. „real time liquid biopsy“. Tekutou biopsií je možné definovat jako krevní test, který je natolik analyticky senzitivní, že umožňuje detekovat jedinou nádorovou buňku v prostředí miliónu normálních hematopoetických buněk. Tuto formu biopsie je možné provádět v určitých skutečných časových bodech („real-time“), v nichž je možné charakterizovat specifickou subpopulaci buněk CTC. V důsledku toho CTC naleznou uplatnění v personalizované medicíně.

5 ZÁVĚR

Cílem této dizertační práce bylo zavedení nové metodiky umožňující charakterizaci cirkulujících nádorových buněk u pacientek s časným karcinomem prsu. Pro základní stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi byla vybrána metoda, založená na kombinaci imunomagnetické separace s reverzně transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakcí. Využili jsme certifikovanou technologii AdnaTest® BreastCancer Select/Detect. Pomocí této metody jsme vyšetřili celkem 195 vzorků periferní krve u souboru 54 pacientek. Přítomnost CTC v krvi pacientek jsme prokázali u 31 % případů (17 pacientek).

V průběhu výzkumné práce jsme pracovali s následujícími hypotézami:

Hypotéza č. 1: Podle dostupných poznatků jsme chtěli zavést a optimalizovat qPCR metodu umožňující stanovení exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktinu (referenční gen) a rozšířit tak spektrum vyšetřovaných genů v cirkulujících nádorových buňkách. Stanovení kombinace těchto genů nebylo provedeno. Předpokládali jsme, že exprese heterogenní expresi těchto genů v nádorových buňkách jednotlivých pacientek.

Výsledek: Pro charakterizaci CTC byla zavedena a optimalizována nová qPCR metoda, pomocí které jsme byli schopni v CTC-pozitivních vzorcích stanovit expresi genu TOP1, TOP2A, CSTD, KRT19 a ST6GAL.

Hypotéza č. 2: Prokázaná nelegitimní exprese nádorové RNA jinými buňkami krve může vést k ovlivnění výsledku stanovení, který neodpovídá skutečnosti. U pacientek se tak mohou objevit falešně pozitivní výsledky. Předpokládali jsme, že exprese nádorové RNA bude v mononukleárních buňkách periferní krve minimální a pokud bude zvýšena, je to způsobeno nelegitimní expresí. Proto jsme se rozhodli, že zanalyzujeme a porovnáme mezi sebou expresní profily sledovaných genů cirkulujících nádorových buněk s profily mononukleárních buněk periferní krve, a zjistíme tak rozdíly vedoucí k odhalení nepatrné minimální exprese genů jinými krevními buňkami.

Výsledek: Provedli jsme paralelní analýzu TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktinu a porovnání expresních profilů v cirkulujících nádorových buňkách a mononukleárních buňkách periferní krve s cílem odhalit falešně pozitivní výsledky z důvodu nelegitimní exprese nádorové RNA buňkami nenádorového původu. Analýzou genové exprese jsme zjistili statisticky významný rozdíl mezi expresí sledovaných genů v CTC a PBMC. Geny

TOP1, TOP2A, CSTD a ST6GAL vykazovaly zvýšenou expresi v CTC, zatímco u genu KRT19 byla exprese zvýšena v PBMC. Z toho jsme usoudili, že právě KRT19 byl v PBMC zvýšeně exprimován v důsledku nelegitimní exprese nenádorovými buňkami.

Hypotéza č. 3: Předpokládali jsme, že z primárního nádoru může i v časně fázi onemocnění docházet k uvolňování nádorových buněk, které je možné detekovat v periferní krvi pacientek a jejich přítomnost může být ovlivněna podávanou léčbou. Na základě toho, jsme chtěli stanovit míru detekce CTC u pacientek v České republice a porovnat ji s výsledky publikovaných studií. Dále jsme provedli prospektivní monitorování CTC v průběhu léčby a zajímali jsme se o změny přítomnosti CTC mezi jednotlivými odběry. Pro detekci CTC byla v metodické části použita kombinace tří nádorově-asociovaných genů, přičemž pro jednoznačný průkaz CTC bylo nezbytné prokázání alespoň jednoho PCR fragmentu genu. Očekávali jsme, že zastoupení HER2, MUC1 a GA733.2 použitých pro detekci CTC v našem souboru pacientek bude variabilní a zajímalo nás, který ze sledovaných markerů bude nejčastěji vyjádřen v CTC.

Výsledek: U pacientek s časným karcinomem se nám podařilo detekovat přítomnost CTC nejen před zahájením léčby, ale i v jejím průběhu. Přítomnost CTC před zahájením léčby byla prokázána u 31 % případů. Publikovaná data uvádějícími detekční rozmezí od 9,4 – 48,6% jsou srovnatelná námi získanými hodnotami. Pacientky byly následně rozděleny do dvou skupin podle léčebného režimu. U 22 % pacientek s operovatelným karcinomem prsu jsme detekovaly CTC před chirurgickým zákrokem. Pacientky s inoperabilním karcinomem prsu podstoupily nejdříve neoadjuvantní chemoterapeutickou léčbu. U těchto pacientek jsme před podáním léčby detekovali CTC ve 40 % případů. Po ukončení léčby jsme detekovali CTC jen u 10 % případů. Prostřednictvím opakovaných odběrů periferní krve jsme zjistili, že u pacientek může docházet ke změnám z CTC-pozitivity na CTC-negativitu a naopak.

Hypotéza č. 4: Na základě dostupných poznatků jsme předpokládali, že přítomnost CTC bude korelovat s užívanými prognostickými faktory jako je velikost uzlin, postižení lymfatických uzlin, exprese hormonálních receptorů s HER2 receptorem a přítomnost CTC se bude měnit v průběhu léčby pacientek s karcinomem prsu.

Výsledek: Při studiu heterogenity CTC prostřednictvím detekce HER2, MUC1, GA733.2, TOP1, TOP2A, CSTD, KRT19 a ST6GAL jsme zjistili značnou heterogenitu nádorových buněk. Právě tato heterogenita může být zodpovědná za odlišnou odpověď pacientek na podávanou léčbu a může vést i ke vzniku rezistence na léčbu. Zjistili jsme statisticky

významnou korelaci exprese TOP1 se stavem HER2 receptoru. Pacientky se zvýšenou expresí genu TOP1 a HER2 negativitou by mohly být léčeny irotekanem, který působí jako inhibitor TOP1. Zde vyvstává otázka, zda by TOP1 mohl být prediktivním biomarkerem pro sledování účinnosti léčby irotekanem. U TOP2A genu jsme prokázali korelaci exprese s velikostí primárního nádoru (T1) a s estrogenovým a progesteronovým receptorem. Hraniční statistickou významnost jsme zjistili ve vztahu TOP2A s HER2 receptorem. Bylo publikováno, že u 30 – 45 % je vedle HER2/neu amplifikován i TOP2A gen. Pro pacientky s amplifikací TOP2A je přínosná adjuvantní chemoterapie založená na antracyklinech a tyto pacientky mají lepší celkové bezpříznakové přežití. Dále jsme sledovali konkordanci HER2 pozitivitu primárního nádoru s HER2 pozitivitou CTC. Zjistili jsme, že u 6 pacientek, které měly HER2 negativní primární nádor, jsme prokázali HER2 pozitivní CTC. Tato skupina pacientek by mohla díky průkazu HER2 pozitivních CTC benefitovat z cílené biologické léčby. Z výsledků studie vyplývá, že u pacientek s časným karcinomem prsu dochází k uvolňování nádorových buněk z primárního nádoru, které je možné detekovat v periferní krvi a dále charakterizovat prostřednictvím molekulárně biologických metod. Cirkulující nádorové buňky vzhledem ke své heterogenitě přispějí k odhalení nových terapeutických cílů a zodpovězení otázek odlišné odpovědi na léčbu. Pomocí opakovaných neinvazivních odběrů periferní krve je možné monitorovat dynamiku CTC v průběhu léčby.

6 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Mikulová V., Kološtová K., Zima T.: Methods of the detection of circulating tumor cells and their clinical value in cancer patients. *Folia Biologica (Praha)*. 2011; 57(4): 151 - 161. **IF 1.514**

Příloha č. 2: Mikulová V., Čabiňáková M., Janatková I., Mestek O., Zima T., Tesařová P.: Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest (Oxford)*. 2014; 74(2)132-142. **IF 2.009**

7 SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Mikulová V., Kološtová K., Zima T.: Methods of the detection of circulating tumor cells and their clinical value in cancer patients. *Folia Biologica (Praha)*. 57(4):151-161 (2011). **IF 1.151**
2. Mikulova V, Cabinakova M, Janatkova I, Mestek O, Zima T, Tesarova P. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest* 2014;74:132-42. **IF2.009**
3. Capoun O, Soukup V, Mikulova V, Jancikova M, Honova H, Kolostova K, Zima T, Hanus T.: Circulating tumor cells and prostate cancer prognosis. *Cas Lek Cesk* 2014;153:72-7.
4. Ušiaková Z., Mikulová V., Pintérová D., Brychta M., Valchář J., Kubecová M., Tesařová P., Bobek V. et Kološtová K.: Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer: Monitoring Chemotherapy Success. *In vivo* 2014; 28(4):605-614. **IF1.148**
5. Cabinakova M., Mikulova V., Malickova K., Vrana D., Pavlista D., Petruzelka L., Zima T., Tesarova P.: Predictive factors for the presence of tumor cells in bone marrow and peripheral blood in breast cancer patients. *Neoplasma* 2015; 62(2): 259 – 268. **IF1.961**
6. Tesarova P., Cabinakova M., Mikulova V., Zima T., Kalousova M.: RAGE and its ligands in cancer - culprits, biomarker, or therapeutic targets. *Neoplasma* 2015; 62(3): 353-364. **IF1.961**
7. Skerenova M., Mikulova V., Capoun O., et al.: The characterization of four gene expression analysis in circulating tumor cells made by Multiplex-PCR from the AdnaTest kit on the lab-on-a-chip Agilent DNA 1000 platform. *Biochemia Medica* 2016; 26(1):103-113. **IF 2.667**

8. Čapoun O., Mikulová V., Jančíková M., Honová H., Kološtová K., Sobotka R., Pešl M., Zima T., Hanuš T., Soukup V.: Prognosis of Castration-resistant prostate cancer patients – Use of the AdnaTest® System for Detection of Circulating tumor cells. *Anticancer Research* 2016; 36:2019-2026. IF 1.895

8 PŘEHLED AKTIVNÍ ÚČASTI NA KONGRESECH A KONFERENCÍCH

Studentská vědecká konference, 1. lékařská fakulta, Karlova Univerzita v Praze, květen 2008

Prezentace: Porovnání mRNA profilů genů MUC-1, EpCAM a HER-2 v cirkulujících nádorových buňkách, periferní krvi a kostní dřeni u pacientů s karcinomem prsu.

XIV. dny Vladimíra Staška, Praha, Česká republika, březen 2009,

Prezentace: Minimální reziduální choroba u pacientů s karcinomem prsu: detekční metody a přínos pro pacienty.

XXX. Imunoanalytické dny, Jihlava, Česká republika, duben 2009

Prezentace: Metody detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinomem prsu.

IMPAKT Breast Cancer Conference, Brusel, Belgie, květen 2009

Poster: Cirkulující nádorové buňky: Nový diagnostický nástroj personalizované léčby u pacientů s nádorem prsu?

Studentská vědecká konference, 1. lékařská fakulta, Karlova Univerzita v Praze, květen 2009

Prezentace: Cirkulující nádorové buňky jako prediktivní a prognostický biomarker u pacientů s karcinomem prsu.

International Student Congress of Medical Sciences, Groningen, Nietherlands, červen 2009

Prezentace: Klinický význam cirkulujících nádorových buněk u karcinomu prsu.
Ocenění: “The Best Presentation Award” in the Oncology session.

Federation of European Biochemical societies, Praha, Česká republika, červen 2009

Poster: Prognostická hodnota cirkulujících nádorových buněk u karcinomu prsu.

V. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie a II. sympóziium o cílené biologické léčbě, Olomouc, listopad 2009

Spoluautor prezentace: Sledování exprese genů v cirkulujících nádorových buňkách (CTC) u karcinomu prsu jako součást procesu individualizace léčby a současné detekce metastatického procesu.

Prague ONCO 2010, Praha, Česká republika, leden 2010

Poster: Sledování exprese genů v cirkulujících nádorových buňkách (CTC) u pacientek s rakovinou prsu, jako součást procesu individualizace léčby a časné detekce metastatického procesu.

IMPAKT Breast Cancer Conference, Brussels, Belgium, květen 2010

Co-author of poster: Gene expression profiling in circulating cells (CTCs) of breast carcinoma patients.

qPCR sympozium, Gothenburg, Sweden, červen 2010

Co-author of poster: Circulating tumor cells (CTCs) handling in laboratory practice.

International Society of Oncology and Biomarkers, Munchen, Germany, 3. – 8. 9. 2010

Poster: The role of disseminated tumor cells and circulating tumor cells in management of breast cancer patients.

International Conference on “Molecules of life: from discovery to biotechnology”, Melbourne, Australia, 26. – 1.10.2010

Poster: Gene expression profiling in circulating cells (CTCs) of breast carcinoma patients – a tool for early metastasis detection and therapy individualization

2010 Breast Cancer Symposium, Washington, DC, USA, 1. – 3. 10. 2010

Poster: Disseminated and circulating tumor cells as biomarkers in breast cancer patients.

33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas, USA, 8. – 12. 12. 2010

Poster: Minimal residual disease monitoring in breast cancer patients.

IMPAKT Breast Cancer Conference, Brussels, Belgium, květen 2011

Poster: Changes in the presence of circulating tumor cells in the peripheral blood of breast cancer patients during the course of treatment.

qPCR Symposium in Prague – Developments in Real-Time PCR: From Preanalytics to Molecular Diagnostics, červen 2011

Spoluautor přednášky: Challenges of new discoveries of clinical application into the management of cancer patients.

VIII. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, listopad 2012

Poster: Cirkulující nádorové buňky u pacientů s kastročně rezistentním karcinomem prostaty jako součást individualizace systémové léčby.

Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, Sorrento, Italy, březen 2015

Poster: Levels of metastases-related serum markers and the presence of circulating tumor cells in relation to brain metastases in cancer patients.

9 VÝZKUMNÉ PROJEKTY

2008 - 2011 IGA MZ ČR NS 9976-3: Sledování exprese genů v cirkulujících nádorových buňkách (CTC) u karcinomu prsu jako součást procesu individualizace léčby a časné detekce metastatického procesu (člen řešitelského týmu spoluřešitele)

2009 - 2010 GAUK 7709: Cirkulující nádorové buňky: Nový prognostický faktor u pacientek s karcinomem prsu? (hlavní řešitel)

2010 - 2011 GAUK 59410: Sledování korelace přítomnosti cirkulujících nádorových buněk (CTC) v periferní krvi a diseminovaných nádorových buněk (DTC) v kostní dřeni u pacientek s primárním nádorem prsu (spoluřešitel).

2012 – 2015 GAUK 539512: Stanovení matrixových metaloproteinů 2 (MMP2) a 9 (MMP9), vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) a cirkulujících nádorových buněk (CTC) ve vztahu k progresi nádorových onemocnění prsu a prostaty (spoluřešitel).

2011 – 2015 IGA MZ ČR NT 12205-5: Detekce cirkulujících nádorových buněk a sledování exprese genů u kastrozně rezistentního karcinomu prostaty jako součást individualizace systémové léčby (člen řešitelského týmu).

10 POUŽITÁ LITERATURA

1. Dušek, L. Mužík, J. Kubásek, M. Koptíková, J. Žaloudík, J. Vyzula, R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005],[cit.2016-6-02]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0[2007], ISSN 1308 - 8861.
2. Májek, O., Daneš, J., Skovajsová, M., Bartoňková, H., Šnajdrová, L., Gregor, J., Mužík, J., Dušek, L. Mamo.cz – Program mamografického screeningu v České republice [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2016. [cit. 2016-06-02]. Dostupný z WWW: <http://www.mamo.cz>. ISSN 1804-0861. Verze 1.4c. .
3. Ferlay, J. Soerjomataram, I. Dikshit, R. (2015) *Int J Cancer* 136(5), E359-86.
4. Prausová, J. (2010) *Interní medicína pro praxi* 12, 26-32.
5. Shiovitz, S. & Korde, L. A. (2015) *Ann. Oncol.* 26, 1291-1299.
6. Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2008) *J. Clin Oncol.* 26, 2568-2581.
7. Pléková, P., Novotný, J., Petráková, K., Palácová, M., Kalábová, R., Schneiderová, M., & Foretová, L. (2009) *Klinická Onkologie* 22 (Suppl), S8-S11.
8. Langley, R. R. & Fidler, I. J. (2011) *Int. J. Cancer* 128, 2527-2535.
9. Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabieres, C., & Pantel, K. (2011) *Breast Cancer Research* 13, 228.
10. Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S. D., Holle, R., von Minckwitz, G., Solomayer, E. F., Kaul, S., & Bastert, G. (1996) *Journal of the National Cancer Institute* 88, 1652-1658.
11. Holmgren, L., O'Reilly, M. S., & Folkman, J. (1995) *Nat Med* 1, 149-153.
12. Fehm, T., Mueller, V., Marches, R., Klein, G., Gueckel, B., Neubauer, H., Solomayer, E., & Becker, S. (2008) *APMIS* 116, 742-753.
13. Paterlini-Brechot, P. & Benali, N. L. (2007) *Cancer Lett.* 253, 180-204.
14. Cavallaro, U. & Christofori, G. (2004) *Nat Rev Cancer* 4, 118-132.
15. Guo, W. & Giancotti, F. G. (2004) *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816-826.
16. Friedl, P. & Wolf, K. (2003) *Nat Rev Cancer* 3, 362-374.
17. Fidler, I. J. (1970) *J. Natl. Cancer Inst.* 45, 773-782.
18. Kim, M. Y., Oskarsson, T., Acharyya, S., Nguyen, D. X., Zhang, X. H., Norton, L., & Massague, J. (2009) *Cell* 139, 1315-1326.
19. Mego, M., Mani, S. A., & Cristofanilli, M. (2010) *Nat Rev Clin Oncol.* 7, 693-701.
20. Zhan, M., Zhao, H., & Han, Z. C. (2004) *Histol. Histopathol.* 19, 973-983.
21. Steeg, P. S. (2006) *Nat Med* 12, 895-904.
22. Klein, C. A. (2009) *Nat Rev Cancer* 9, 302-312.
23. Kaplan, R. N., Psaila, B., & Lyden, D. (2006) *Cancer Metastasis Rev* 25, 521-529.
24. Rak, J. & Yu, J. L. (2004) *Semin. Cancer Biol.* 14, 93-104.
25. Bendell, J. C., Domchek, S. M., Burstein, H. J., Harris, L., Younger, J., Kuter, I., Bunnell, C., Rue, M., Gelman, R., & Winer, E. (2003) *Cancer* 97, 2972-2977.
26. Roodman, G. D. (2004) *Discov. Med* 4, 144-148.
27. Kallergi, G., Papadaki, M. A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V., & Agelaki, S. (2011) *Breast Cancer Res.* 13, R59.
28. Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., & Kasimir-Bauer, S. (2009) *Breast Cancer Res.* 11, R46.
29. Kallergi, G., Markomanolaki, H., Giannoukarakaki, V., Papadaki, M. A., Strati, A., Lianidou, E. S., Georgoulas, V., Mavroudis, D., & Agelaki, S. (2009) *Breast Cancer Res.* 11, R84.

30. Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H. J., Fusenig, N., Nieto, M. A., & Cano, A. (2004) *J. Cell Sci.* 117, 2827-2839.
31. Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., & Cano, A. (2004) *Mol. Cell Biol.* 24, 306-319.
32. Shih, J. Y., Tsai, M. F., Chang, T. H., Chang, Y. L., Yuan, A., Yu, C. J., Lin, S. B., Liou, G. Y., Lee, M. L., Chen, J. J. *et al.* (2005) *Clin Cancer Res.* 11, 8070-8078.
33. Reuben, J. M., Krishnamurthy, S., Woodward, W., & Cristofanilli, M. (2008) *Expert. Opin. Med Diagn.* 2, 339-348.
34. Reuben, J. M., Lee, B. N., Gao, H., Cohen, E. N., Mego, M., Giordano, A., Wang, X., Lodhi, A., Krishnamurthy, S., Hortobagyi, G. N. *et al.* (2011) *Eur. J. Cancer* 47, 1527-1536.
35. Hollier, B. G., Evans, K., & Mani, S. A. (2009) *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 14, 29-43.
36. Fehm, T., Becker, S., Duerr-Stoerzer, S., Sotlar, K., Mueller, V., Wallwiener, D., Lane, N., Solomayer, E., & Uhr, J. (2007) *Breast Cancer Research* 9, R74.
37. Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B. W., & Illmensee, K. (1982) *Differentiation* 23, 43-59.
38. McInroy, L. & Maatta, A. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 109-114.
39. Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008) *Journal of Cell Science* 121, 727-735.
40. Cheng, G. Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C. D., & Wang, L. H. (2007) *Cancer Res.* 67, 1979-1987.
41. Ignatiadis, M., Kallergi, G., Ntoulia, M., Perraki, M., Apostolaki, S., Kafousi, M., Chlouverakis, G., Stathopoulos, E., Lianidou, E., Georgoulas, V. *et al.* (2008) *Clin Cancer Res.* 14, 2593-2600.
42. Chimonidou, M., Strati, A., Malamos, N., Georgoulas, V., & Lianidou, E. S. (2013) *Clin Chem.* 59, 270-279.
43. Dimitrakopoulos, L., Vorkas, P. A., Georgoulas, V., & Lianidou, E. S. (2012) *BMC. Cancer* 12, 486.
44. Lianidou, E. S., Markou, A., & Strati, A. (2012) *Cancer Metastasis Rev* 31, 663-671.
45. Tibbe, A. G. J., Miller, M. C., & Terstappen, L. W. M. M. (2007) *Cytometry* 71A, 154-162.
46. Mostert, B., Kraan, J., Bolt-de, V. J., van der Spoel, P., Sieuwerts, A. M., Schutte, M., Timmermans, A. M., Foekens, R., Martens, J. W., Gratama, J. W. *et al.* (2011) *Breast Cancer Res. Treat.* 127, 33-41.
47. Schindlbeck, C., Stellwagen, J., Jeschke, U., Karsten, U., Rack, B., Janni, W., Juckstock, J., Tulusan, A., Sommer, H., & Friese, K. (2008) *Clin Exp. Metastasis* 25, 233-240.
48. Deng, G., Herrler, M., Burgess, D., Manna, E., Krag, D., & Burke, J. F. (2008) *Breast Cancer Res.* 10, R69.
49. Talasaz, A. H., Powell, A. A., Huber, D. E., Berbee, J. G., Roh, K. H., Yu, W., Xiao, W., Davis, M. M., Pease, R. F., Mindrinos, M. N. *et al.* (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3970-3975.
50. Stott, S. L., Hsu, C. H., Tsukrov, D. I., Yu, M., Miyamoto, D. T., Waltman, B. A., Rothenberg, S. M., Shah, A. M., Smas, M. E., Korir, G. K. *et al.* (2010) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 18392-18397.
51. Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A. *et al.* (2007) *Nature* 450, 1235-1239.

52. Saliba, A. E., Saias, L., Psychari, E., Minc, N., Simon, D., Bidard, F. C., Mathiot, C., Pierga, J. Y., Fraasier, V., Salamero, J. *et al.* (2010) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 14524-14529.
53. Issadore, D., Chung, J., Shao, H., Liong, M., Ghazani, A. A., Castro, C. M., Weissleder, R., & Lee, H. (2012) *Sci. Transl. Med* 4, 141ra92.
54. Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. (2013) *Clinical Chemistry* 59, 110-118.
55. Lin, M. X., Hyun, K. A., Moon, H. S., Sim, T. S., Lee, J. G., Park, J. C., Lee, S. S., & Jung, H. I. (2013) *Biosensors and Bioelectronics* 40, 63-67.
56. Saucedo-Zeni, N., Mewes, S., Niestroj, R., Gasiorowski, L., Murawa, D., Nowaczyk, P., Tomasi, T., Weber, E., Dworacki, G., Morgenthaler, N. G. *et al.* (2012) *Int. J. Oncol.* 41, 1241-1250.
57. Pachmann, K., Heiss, P., Demel, U., & Tilz, G. (2001) *Clin Chem. Lab Med* 39, 811-817.
58. Balic, M., Rapp, N., Stanzer, S., Lin, H., Strutz, J., Szkandera, J., Daidone, M. G., Samonigg, H., Cote, R. J., & Dandachi, N. (2011) *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 19, 33-40.
59. Pantel, K., Brakenhoff, R. H., & Brandt, B. (2008) *Nat Rev Cancer* 8, 329-340.
60. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M. *et al.* (2008) *Cell* 133, 704-715.
61. Andreopoulou, E., Yang, L. Y., Rangel, K. M., Reuben, J. M., Hsu, L., Krishnamurthy, S., Valero, V., Fritsche, H. A., & Cristofanilli, M. (2012) *Int. J. Cancer* 130, 1590-1597.
62. Markou, A., Strati, A., Malamos, N., Georgoulas, V., & Lianidou, E. S. (2011) *Clinical Chemistry* 57, 421-430.
63. Azim, H. A., Jr., Michiels, S., Zagouri, F., Delaloge, S., Filipits, M., Namer, M., Neven, P., Symmans, W. F., Thompson, A., Andre, F. *et al.* (2013) *Ann. Oncol.* 24, 647-654.
64. Arango, B. A., Rivera, C. L., & Gluck, S. (2013) *Am. J. Transl. Res.* 5, 132-138.
65. Alix-Panabi-Ères, C., Riethdorf, S., & Pantel, K. (2008) *Clinical Cancer Research* 14, 5013-5021.
66. Alix-Panabieres, C., Vendrell, J. P., Slijper, M., Pelle, O., Barbotte, E., Mercier, G., Jacot, W., Fabbro, M., & Pantel, K. (2009) *Breast Cancer Res.* 11, R39.
67. Mateo, J., Gerlinger, M., Rodrigues, D. N., & de Bono, J. S. (2014) *Genome Biol.* 15, 448.
68. Cohen, S. J., Punt, C. J., Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M. C. *et al.* (2008) *J. Clin Oncol.* 26, 3213-3221.
69. Cristofanilli, M., Hayes, D. F., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Matera, J., Allard, W. J., Miller, M. C. *et al.* (2005) *J. Clin Oncol.* 23, 1420-1430.
70. de Bono, J. S., Scher, H. I., Montgomery, R. B., Parker, C., Miller, M. C., Tissing, H., Doyle, G. V., Terstappen, L. W., Pienta, K. J., & Raghavan, D. (2008) *Clin Cancer Res.* 14, 6302-6309.
71. Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Allard, W. J., Terstappen, L. W. *et al.* (2004) *N. Engl. J. Med* 351, 781-791.
72. Scher, H. I., Jia, X., de Bono, J. S., Fleisher, M., Pienta, K. J., Raghavan, D., & Heller, G. (2009) *Lancet Oncol.* 10, 233-239.

73. de Bono, J. S., Logothetis, C. J., Molina, A., Fizazi, K., North, S., Chu, L., Chi, K. N., Jones, R. J., Goodman, O. B., Jr., Saad, F. *et al.* (2011) *N. Engl. J. Med* 364, 1995-2005.
74. Hiltermann, T. J., Pore, M. M., van den Berg, A., Timens, W., Boezen, H. M., Liesker, J. J., Schouwink, J. H., Wijnands, W. J., Kerner, G. S., Kruyt, F. A. *et al.* (2012) *Ann. Oncol.* 23, 2937-2942.
75. Krebs, M. G., Sloane, R., Priest, L., Lancashire, L., Hou, J. M., Greystoke, A., Ward, T. H., Ferraldeschi, R., Hughes, A., Clack, G. *et al.* (2011) *J. Clin Oncol.* 29, 1556-1563.
76. Rao, C., Bui, T., Connelly, M., Doyle, G., Karydis, I., Middleton, M. R., Clack, G., Malone, M., Coumans, F. A., & Terstappen, L. W. (2011) *Int. J. Oncol.* 38, 755-760.
77. Nichols, A. C., Lowes, L. E., Szeto, C. C., Basmaji, J., Dhaliwal, S., Chapeskie, C., Todorovic, B., Read, N., Venkatesan, V., Hammond, A. *et al.* (2012) *Head Neck* 34, 1440-1444.
78. Han, L., Chen, W., & Zhao, Q. (2014) *Tumour. Biol.* 35, 2473-2480.
79. Banys, M., Gruber, I., Krawczyk, N., Becker, S., Kurth, R., Wallwiener, D., Jakubowska, J., Hoffmann, J., Rothmund, R., Staebler, A. *et al.* (2012) *Breast Cancer Res. Treat.* 131, 801-808.
80. Sanger, N., Effenberger, K. E., Riethdorf, S., Van, H., V, Gauwerky, J., Wiegratz, I., Strebhardt, K., Kaufmann, M., & Pantel, K. (2011) *Int. J. Cancer* 129, 2522-2526.
81. Inuma, H., Watanabe, T., Mimori, K., Adachi, M., Hayashi, N., Tamura, J., Matsuda, K., Fukushima, R., Okinaga, K., Sasako, M. *et al.* (2011) *J. Clin Oncol.* 29, 1547-1555.
82. Pantel, K., Alix-Panabieres, C., & Riethdorf, S. (2009) *Nat Rev Clin Oncol.* 6, 339-351.
83. Bidard, F. C., Mathiot, C., Delaloge, S., Brain, E., Giachetti, S., de, C. P., Marty, M., & Pierga, J. Y. (2010) *Ann. Oncol.* 21, 729-733.
84. Rack, B., Andergassen, U., Neugebauer, J., Salmen, J., Hepp, P., Sommer, H., Lichtenegger, W., Friese, K., Beckmann, M. W., Hauner, D. *et al.* (2010) *Breast Care (Basel)* 5, 395-400.
85. Muller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., Janicke, F., & Pantel, K. (2005) *Clin Cancer Res.* 11, 3678-3685.
86. Xenidis, N., Ignatiadis, M., Apostolaki, S., Perraki, M., Kalbakis, K., Agelaki, S., Stathopoulos, E. N., Chlouverakis, G., Lianidou, E., Kakolyris, S. *et al.* (2009) *J. Clin Oncol.* 27, 2177-2184.
87. Pierga, J. Y., Bidard, F. C., Mathiot, C., Brain, E., Delaloge, S., Giachetti, S., de, C. P., Salmon, R., Vincent-Salomon, A., & Marty, M. (2008) *Clin Cancer Res.* 14, 7004-7010.
88. Riethdorf, S., Muller, V., Zhang, L., Rau, T., Loibl, S., Komor, M., Roller, M., Huober, J., Fehm, T., Schrader, I. *et al.* (2010) *Clin Cancer Res.* 16, 2634-2645.
89. Liu, Z., Fusi, A., Schmittel, A., Tinhofer, I., Schneider, A., & Keilholz, U. (2010) *Cancer Biol. Ther.* 10, 860-864.
90. Pohlmann, P. R., Mayer, I. A., & Mernaugh, R. (2009) *Clin Cancer Res.* 15, 7479-7491.
91. Attard, G., Swennenhuis, J. F., Olmos, D., Reid, A. H., Vickers, E., A'Hern, R., Levink, R., Coumans, F., Moreira, J., Riisnaes, R. *et al.* (2009) *Cancer Res.* 69, 2912-2918.
92. Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., Isakoff, S. J., Ciciliano, J. C., Wells, M. N., Shah, A. M. *et al.* (2013) *Science* 339, 580-584.

93. Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B. *et al.* (2006) *N. Engl. J. Med* 355, 2733-2743.
94. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M. *et al.* (2001) *N. Engl. J. Med* 344, 783-792.
95. Apostolaki, S., Perraki, M., Pallis, A., Bozionelou, V., Agelaki, S., Kanellou, P., Kotsakis, A., Politaki, E., Kalbakis, K., Kalykaki, A. *et al.* (2007) *Ann. Oncol.* 18, 851-858.
96. Apostolaki, S., Perraki, M., Kallergi, G., Kafousi, M., Papadopoulos, S., Kotsakis, A., Pallis, A., Xenidis, N., Kalmanti, L., Kalbakis, K. *et al.* (2009) *Breast Cancer Res. Treat.* 117, 525-534.
97. Krishnamurthy, S., Cristofanilli, M., Singh, B., Reuben, J., Gao, H., Cohen, E. N., Andreopoulou, E., Hall, C. S., Lodhi, A., Jackson, S. *et al.* (2010) *Cancer* 116, 3330-3337.
98. Sieuwerts, A. M., Kraan, J., Bolt, J., van der Spoel, P., Elstrodt, F., Schutte, M., Martens, J. W., Gratama, J. W., Sleijfer, S., & Foekens, J. A. (2009) *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 61-66.
99. Zidan, J., Dashkovsky, I., Stayerman, C., Basher, W., Cozacov, C., & Hadary, A. (2005) *Br. J. Cancer* 93, 552-556.
100. Comen, E., Norton, L., & Massague, J. (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8, 369-377.
101. Biggers, B., Knox, S., Grant, M., Kuhn, J., Nemunatitis, J., Fisher, T., & Lamont, J. (2009) *Ann. Surg. Oncol.* 16, 969-971.
102. Lianidou, E.S., Mavroudis D., Georgoulas V. (2013) *Br. J. Cancer* 108,2426-2432.