

**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**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.*

Mgr. Veronika Mikulová

Praha, 2016

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor:	Biochemie a patobiochemie
Předseda oborové rady:	prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.
Školící pracoviště:	Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze
Školitel:	prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA
Konzultant (byl-li):	doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

1	Úvod.....	6
1.1	Epidemiologie karcinomu prsu u žen v České republice.....	6
1.2	Cirkulující nádorové buňky .....	7
1.2.1	Biologie a charakteristika cirkulujících nádorových buněk.....	7
1.2.2	Metodické možnosti izolace a detekce cirkulujících nádorových buněk.....	8
1.3	Klinické využití cirkulujících nádorových buněk .....	13
1.3.1	Cirkulující nádorové buňky u nádorových onemocnění .....	13
1.3.2	Klinický význam CTC u pacientek s karcinomem prsu.....	14
1.3.3	Potenciál cirkulujících nádorových buněk v budoucnosti.....	16
2	Hypotézy a cíle práce .....	17
3	Materiál a metodika.....	20
3.1	Charakteristika pacientek zařazených do studie .....	20
3.2	Schéma odběru vzorků periferní krve .....	20
3.3	Stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi .....	22
3.4	Porovnání exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL a KRT 19 mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a mononukleárními buňkami periferní krve .....	23
4	Výsledky.....	27
4.1	Stanovení přítomnosti CTC před zahájením a v průběhu léčby .....	27
5	Diskuse .....	37
6	Závěry.....	40
7	Použitá literatura .....	42
8	Seznam publikací .....	45

## 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.

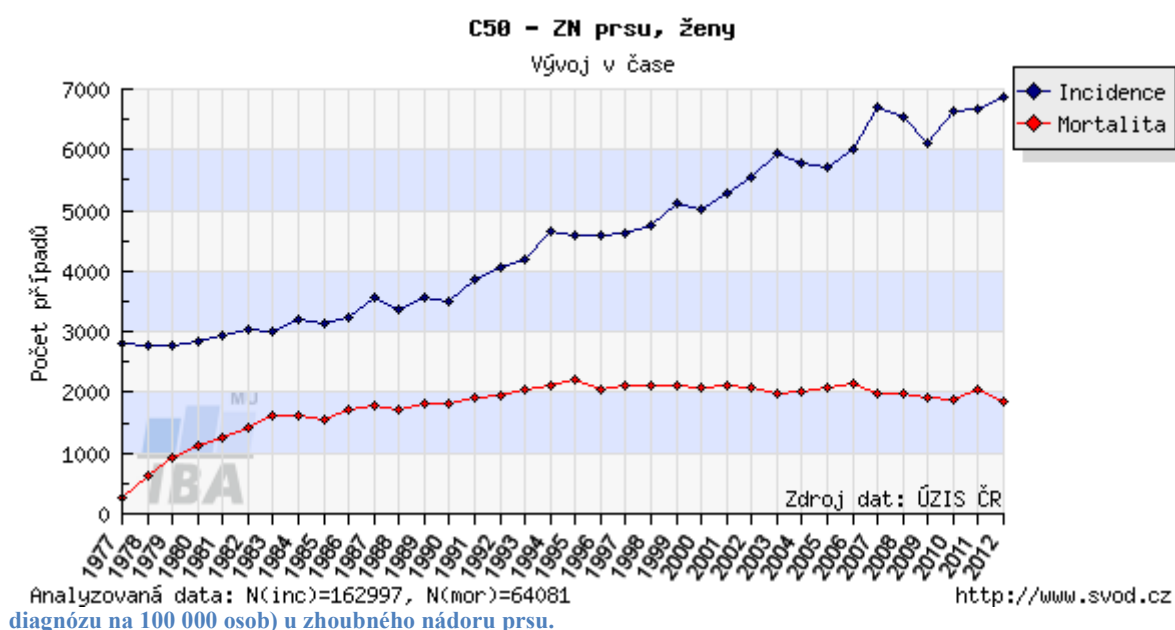
**Key words:** circulating tumor cells; breast cancer; quantitative; polymerase chain reaction; immunomagnetic separation; gene expression; characterization; detection.

# 1 Úvod

## 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).

Obrázek 1: Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na



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 (2).

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 (3).

## **1.2 Cirkulující nádorové buňky**

### **1.2.1 Biologie a charakteristika cirkulujících nádorových buněk**

Cirkulující nádorové buňky jsou buňky, které se již při časné 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).

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 vykazuje 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 (4). 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 (5).

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).

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).

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 (7).

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  $\beta$  také transkripční faktory Twist, Snail, Slug a Sip1 (8, 9). 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.

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 epiteliálním 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, epiteliálním nádorovým fenotypem (10, 11).

## **1.2.2 Metodické možnosti izolace a detekce cirkulujících nádorových buněk**

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: epiteliální markery (cytokeratin 8, 18, 19, EpCAM, MUC-1), 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 (CST6GAL, BRMS1, SOX17).

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 (12).

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.

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 mikrokanálky, 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.

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 (13). Ke zvýšení míry detekce došlo i při použití protilátky anti-CD176 (14). 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 sklíčcích pomocí Ariol® systému (15).

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<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup> 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 (16). 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 (17).

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, KRT19, CK20, MUC1 a PSA) mohou být produkovány normálními buňkami krve či kostní dřeně (18). 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 (19). 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(20). 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 KRT19, 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 (21).

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 (22). 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 (23).

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 (24). Použitím této metody bylo sledováno, zda KRT19, jeden z hlavních cytoskeletálních proteinů epiteliálních buněk, je z životaschopných

nádorových buněk uvolněn ve zkrácené nebo skutečné délce. Studie ukázala, že životaschopné CTC uvolňují KRT19 ve skutečné délce a tyto buňky mohou představovat biologicky aktivní podskupinu nádorových buněk prsu s vysokým metastatickým potenciálem (25).

### **1.3 Klinické využití cirkulujících nádorových buněk**

#### **1.3.1 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 nejvhodnější specifické léčebné modality pro individuálního pacienta ().

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 (27-29). 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  $\geq 5$  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 (30).

### **1.3.2 Klinický význam CTC u pacientek s karcinomem prsu**

#### **Prognostická hodnota CTC**

U pacientek s metastatickým karcinomem prsu je používána prognostická cut-off hranice odpovídající 5 CTC v 7.5 ml periferní krve. U časných stadií karcinomu prsu jsou počty detekovatelných CTC často výrazně nižší a mnohdy nepřesáhnou 5 CTC v 7,5 - 10 ml krve (31). Bylo prokázáno, že přítomnost pouze jedné nádorové buňky u časného nádoru prsu je asociována se zvýšeným rizikem metastáz (32). Německá studie SUCCESS poukázala, že u 10 % pacientek před zahájením adjuvantní léčby je možné detekovat více než jednu CTC. U 7 % pacientek byla zjištěna perzistentní negativita CTC při opakovaných odběrech související s výrazně lepší prognózou onemocnění. Do této studie bylo zahrnuto více než 1700 pacientek jak s pozitivitou lymfatických uzlin také i vysoce rizikových pacientek s negativitou lymfatických uzlin bez metastáz indikovaných k adjuvantní chemoterapeutické léčbě taxany (33).

#### **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 (34). 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 pacientek s časným nádorem prsu jsou nezávislým rizikovým faktorem pro rezistentní reziduální chorobu (35). Ve studii REMAGUS02 počet CTC u pacientek s nemetastatickým karcinomem prsu před a po primární systémové léčbě byl nezávislým prognostickým faktorem pro kratší MFS (metastasis free survival) (36).

Ve studii GEPARQuattro, bylo sledováno, zda je možné CTC použít jako indikátor účinnosti léčbě. 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 (38).

### **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 progrese 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 (39).

### **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 onkogenních 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 (40). 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 (41).

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 (42,43).

### **1.3.3 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.

## 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.

### **3 Materiál a metodika**

#### **3.1 Charakteristika pacientek zařazených do studie**

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

Klinická data v době prvního vyšetření jsou uvedena v tab. 1. 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).

#### **3.2 Schéma odběru vzorků periferní krve**

Celkem 54 pacientkám splňujícím vstupní kritéria, byly při vstupu do studie 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 chirurgickým odstraněním primárního nádoru (2. odběr), před zahájením (3. odběr) a po ukončení adjuvantní léčby (4. odběr).

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).

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.

Tabulka 1: 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

### **3.3 Stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi**

Cirkulující nádorové buňky byly izolovány z 5 ml periferní krve pomocí komerčně dodávaného diagnostického kitu *AdnaTest BreastCancer*<sup>TM</sup> (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 pacientské 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.

Z buněčného lyzátu byla následně izolována mRNA pomocí *AdnaTest BreastCancer Detect kitu*<sup>TM</sup> (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 bází mezi poly (A)<sup>+</sup> 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 pacientskému 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 navázaná 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

### **3.4 Porovnání exprese genů TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL a CK 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).

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.

Celková RNA (total RNA, tRNA) byla izolována z PBMC pomocí TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH). Alikvot obsahující  $10 \times 10^6$  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.

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).

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).

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. 2. 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 2: Primery navržené pro amplifikaci studovaných genů.

Gen	Referenční sekvence mRNA	Umístění genu	Sekvence primeru 5' → 3'	Délka amplikonu
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 amplikonů 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.

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.

## 4 Výsledky

### 4.1 Stanovení přítomnosti CTC před zahájením a v průběhu léčby

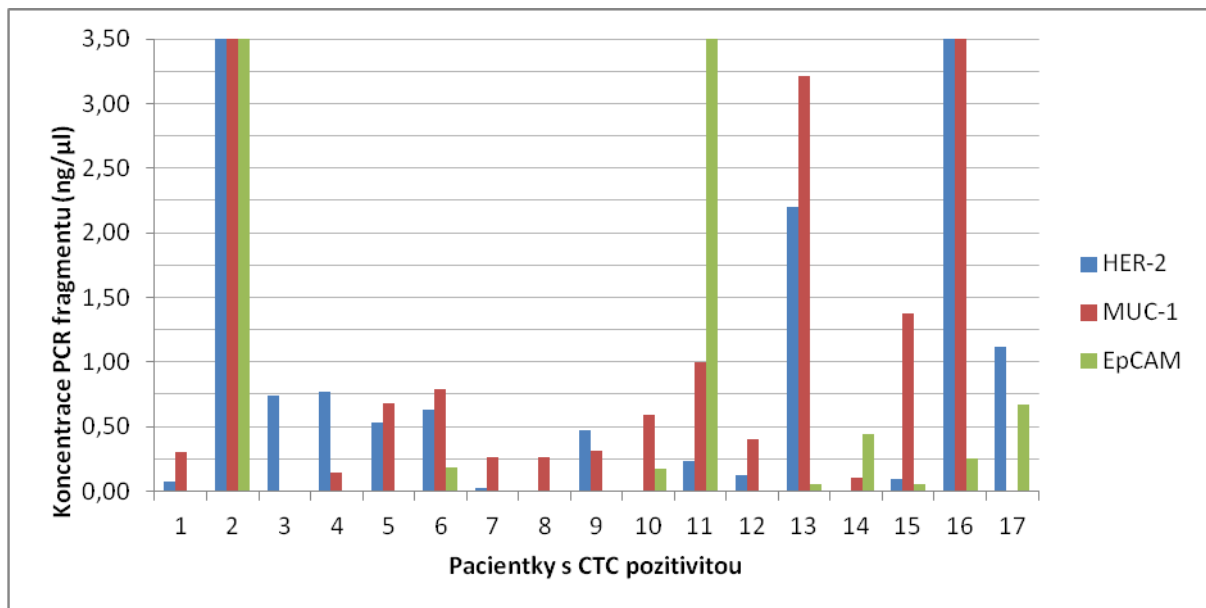
Stanovení přítomnosti CTC v periferní krvi jsme provedli u 54 pacientek s karcinomem prsu, které byly vybrány podle vstupních kritérií uvedených v kapitole 3.1. Celkem bylo v průběhu této studie vyšetřeno 195 vzorků, z nichž 6 bylo stanoveno opakovaně. CTC pozitivita byla zjištěna ve 38 vzorcích periferní 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. 3 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.

### 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 positivity 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 positivity CTC vs. primární nádor. U třech pacientek, jejichž primární nádor byl HER2 pozitivní, byly nalezeny CTC s HER2 negativitou.

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. 1. Je patrné, že jednotlivé vzorky se lišily nejen přítomností či absencí jednotlivých PCR produktů ale také jejich koncentrací.



Obrázek 1: Expresní profily CTC u jednotlivých pacientek při vstupním vyšetření periferní krve.

Tabulka 3: CTC u všech pacientek před zahájením léčby.

	<b>Celkem</b>	<b>CTC-pozitivita</b>	<b>P<sup>1</sup></b>	<b>P<sup>2</sup></b>
<b>Klinicko-patologická charakteristika</b>				
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	

## **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.

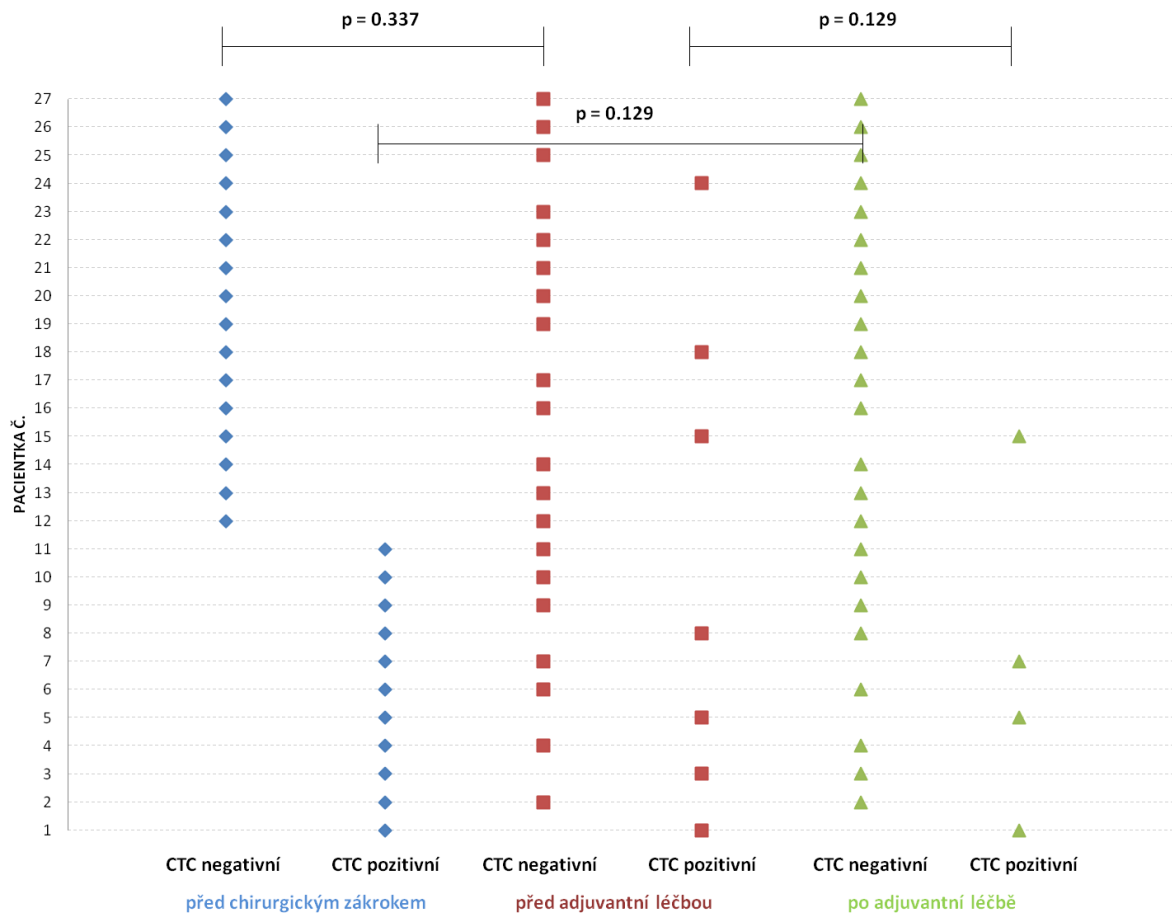
### ***Skupina S1***

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.

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<sup>+</sup> a/nebo PR<sup>+</sup>), 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.

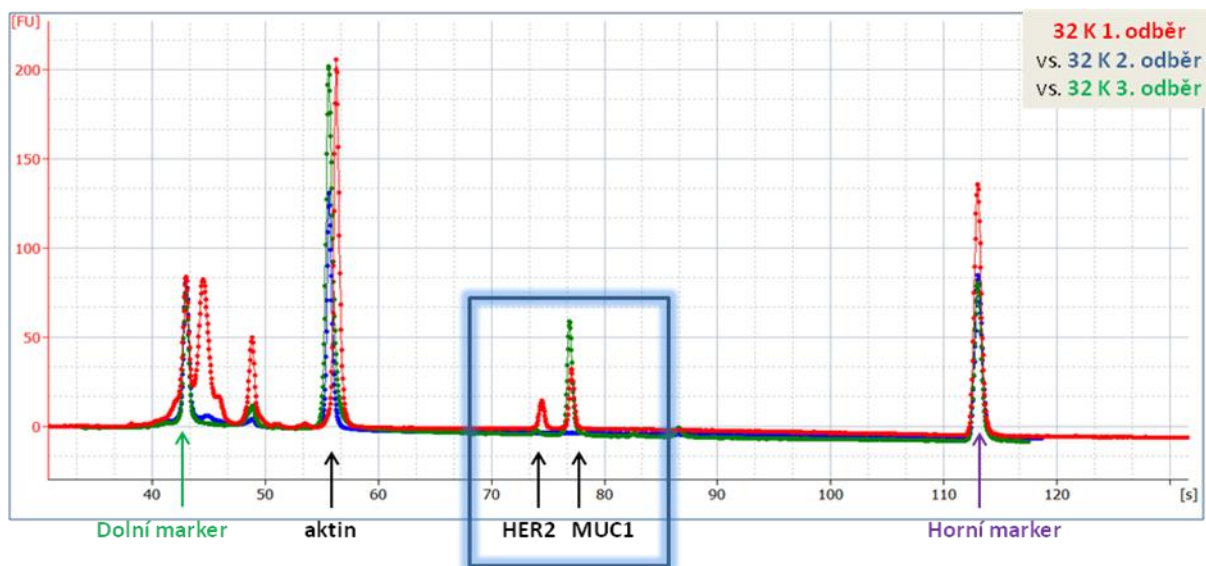
U skupiny pacientek S1 jsme provedli testování hypotézy zda, dynamika CTC je závislá na typu léčby. Pro testování byl použit chí-kvadrát test ( $\chi^2$ ) porovnávající námi stanovené četnostmi CTC pozitivních resp. CTC negativních výsledků v jednotlivých odběrech periferní krve v průběhu sledování pacientek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

S1 ve všech provedených odběrech. Výsledky chí-kvadrát testu jsou uvedeny v horní části obrázku.



Obrázek 2 Asociace nálezu CTC v průběhu léčby u skupiny pacientek S1

Na obr 3 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 3: Porovnání výsledku vyšetření přítomnosti CTC ve třech odběrech provedených u jedné pacientky.

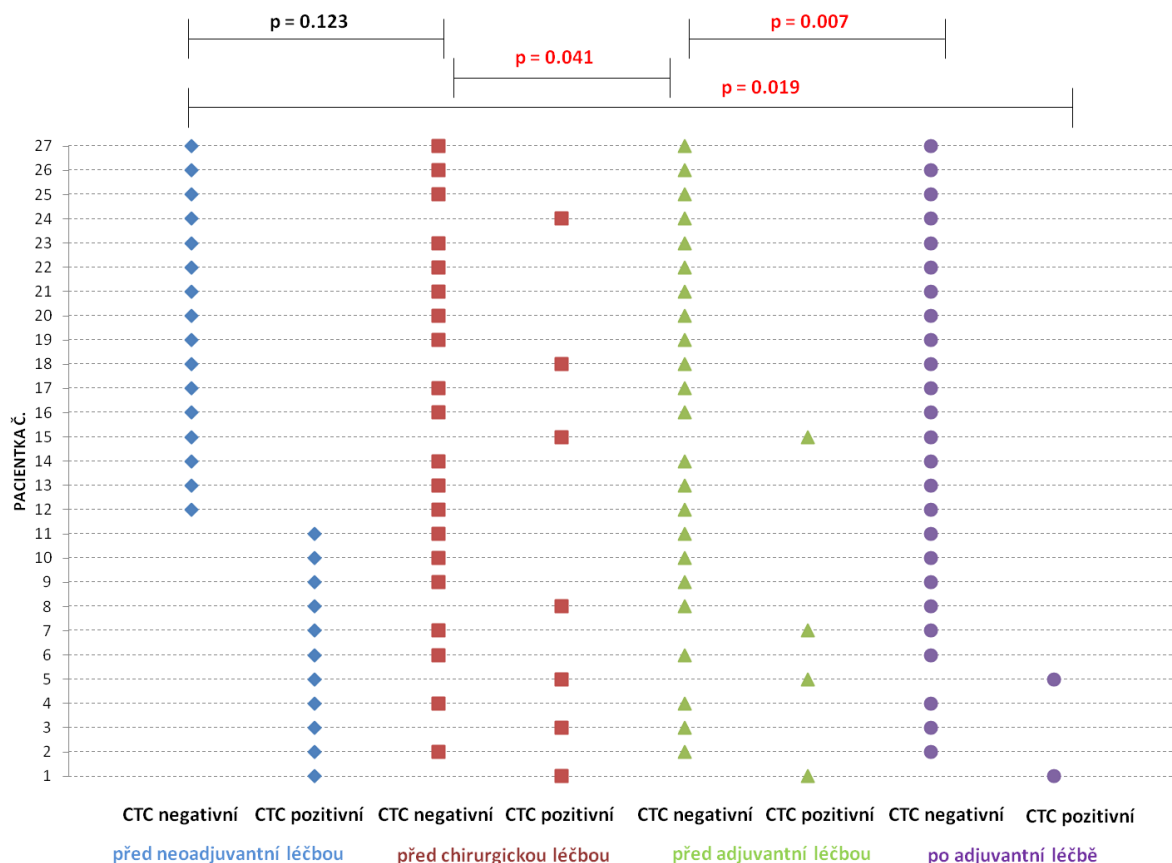
### Skupina S2

Druhý odběr periferní krve byl proveden po ukončení neoadjuvantní léčby. Pro léčbu pacientek byly použity tyto cytostatické režimy: AC/docetaxel (doxorubicin, cyklofosamid a následně docetaxel), TAC (docetaxel, doxorubicin, cyklofosamid), AT (doxorubicin a paklitaxel) a AC/TH (doxorubicin, cyklofosamid, 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.

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 4 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 ( $\chi^2$ ) 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  $\chi^2$  je uvedena na obr 4. 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 4: 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.

## 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 proliferací 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.

Expresí sledovaných genů v cirkulujících nádorových buňkách byla signifikantně vyšší ve srovnání s expresí v PBMC ( $p < 0,001$ ). Tabulka 5 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.

**Tabulka 5: Srovnání genové exprese mezi CTC a PBMC**

		<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>SD</b>	<b>p-value</b>
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	

Provedli jsme korelaci naměřené genové exprese sledovaných genů s klasickými klinicko-patologickými parametry primárního nádoru pacientek s prokázanou přítomností CTC.

Pro gen TOP1 jsme zjistili statisticky významný rozdíl exprese mezi HER2 pozitivní a HER2 negativními pacientkami ( $p=0,025$ ).

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 ( $p=0,048$ ). Exprese TOP2A byla statisticky významná ve vztahu s pozitivitou estrogenových a progesteronových receptorů ( $p= 0,002$  a  $p<0,001$ ).

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 ( $p=0,002$ ). Exprese CSTD nebyla ve vztahu k přítomnosti HER2 receptoru statisticky signifikantní ( $p=0,062$ ).

Pro gen ST6GAL byla zjištěna statisticky významná exprese nejen ve vztahu k velikosti nádoru ( $p<0,001$ ), ale také k přítomnosti estrogenových ( $p=0,008$ ) a progesteronových receptorů ( $p=0,021$ ). Navíc u invazivního lobulárního karcinomu byla zjištěna statisticky významně zvýšená exprese ve srovnání s invazivním duktálním typem karcinomu prsu ( $p<0,001$ ).

Pro gen KRT19 nebyla zjištěna žádná statisticky významná závislost s klinicko-patologickými charakteristikami sledované skupiny pacientek.

## 5 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% (32, 37, 44-46). 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 (46). 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 (47). Obdobně to platí i pro velmi málo diferencované buňky, stem-cell like buňky a buňky s EMT (19). 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% (48). 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 (49).

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 (50). 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 (31). 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 (36). Obdobně tomu bylo i u studie GeparQuattro(37). 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 (33). 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 porovnávací 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 biopsii 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.

## 6 Závěry

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, která využívá kombinaci imunomagnetické separace s multiplexní 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).

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.

Provedením paralelní analýzy TOP1, TOP2A, CSTD, ST6GAL, KRT19 a aktinu v cirkulujících nádorových buňkách a mononukleárních buňkách periferní krve 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. Na základě výsledků analýz u KRT19 v PBMC se domníváme, že se jedná nelegitimní exprese nenádorovými buňkami.

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.

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 positivity 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 prospěch 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.

## 7 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. Ferlay, J. Soerjomataram, I. Dikshit, R. (2015) *Int J Cancer* **136(5)**, E359-86.
3. Prausová, J. (2010) *Interní medicína pro praxi* **12**, 26-32.
4. Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabieres, C., & Pantel, K. (2011) *Breast Cancer Research* **13**, 228.
5. Fehm, T., Mueller, V., Marches, R., Klein, G., Gueckel, B., Neubauer, H., Solomayer, E., & Becker, S. (2008) *APMIS* **116**, 742-753.
6. Paterlini-Brechot, P. & Benali, N. L. (2007) *Cancer Lett.* **253**, 180-204.
7. Mego, M., Mani, S. A., & Cristofanilli, M. (2010) *Nat Rev Clin Oncol.* **7**, 693-701.
8. Klein, C. A. (2009) *Nat Rev Cancer* **9**, 302-312.
9. Cavallaro, U. & Christofori, G. (2004) *Nat Rev Cancer* **4**, 118-132.
10. Kallergi, G., Papadaki, M. A., Politaki, E., Mavroudis, D., Georgoulas, V., & Agelaki, S. (2011) *Breast Cancer Res.* **13**, R59.
11. Hollier, B. G., Evans, K., & Mani, S. A. (2009) *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **14**, 29-43.
12. Tibbe, A. G. J., Miller, M. C., & Terstappen, L. W. M. M. (2007) *Cytometry* **71A**, 154-162.
13. 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.
14. 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.
15. Deng, G., Herrler, M., Burgess, D., Manna, E., Krag, D., & Burke, J. F. (2008) *Breast Cancer Res.* **10**, R69.
16. Pachmann, K., Heiss, P., Demel, U., & Tilz, G. (2001) *Clin Chem. Lab Med* **39**, 811-817.
17. 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.
18. Pantel, K., Brakenhoff, R. H., & Brandt, B. (2008) *Nat Rev Cancer* **8**, 329-340.
19. 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.
20. 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.
21. Markou, A., Strati, A., Malamos, N., Georgoulas, V., & Lianidou, E. S. (2011) *Clinical Chemistry* **57**, 421-430.
22. 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.
23. Arango, B. A., Rivera, C. L., & Gluck, S. (2013) *Am. J. Transl. Res.* **5**, 132-138.
24. Alix-Panabières, C., Riethdorf, S., & Pantel, K. (2008) *Clinical Cancer Research* **14**, 5013-5021.
25. 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.
26. Mateo, J., Gerlinger, M., Rodrigues, D. N., & de Bono, J. S. (2014) *Genome Biol.* **15**,

- 448.
27. 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.
  28. 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.
  29. 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.
  30. 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.
  31. Pantel, K., Alix-Panabieres, C., & Riethdorf, S. (2009) *Nat Rev Clin Oncol.* **6**, 339-351.
  32. 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.
  33. 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.
  34. Muller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., Janicke, F., & Pantel, K. (2005) *Clin Cancer Res.* **11**, 3678-3685.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. Liu, Z., Fusi, A., Schmittel, A., Tinhofer, I., Schneider, A., & Keilholz, U. (2010) *Cancer Biol. Ther.* **10**, 860-864.
  39. Pohlmann, P. R., Mayer, I. A., & Mernaugh, R. (2009) *Clin Cancer Res.* **15**, 7479-7491.
  40. 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.
  41. 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.
  42. 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.
  43. 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.
  44. 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.
  45. 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.
  46. 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.

47. 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.
48. Zidan, J., Dashkovsky, I., Stayerman, C., Basher, W., Cozacov, C., & Hadary, A. (2005) *Br. J. Cancer* **93**, 552-556.
49. Comen, E., Norton, L., & Massague, J. (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* **8**, 369-377.
50. Biggers, B., Knox, S., Grant, M., Kuhn, J., Nemunatitis, J., Fisher, T., & Lamont, J. (2009) *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 969-971.

## 8 Seznam publikací

### 1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

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

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

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 (data nebyla použita v disertační práci)

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 (data nebyla použita v disertační práci)

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

### 2. publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace

#### a) s IF

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

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

#### b) bez IF

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.