

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

Autoreferát disertační práce



**Detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni a periferní krvi u pacientek  
s karcinomem prsu**

MUDr. Michaela Čabiňaková

Praha, 2015

## **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:** Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

**Školitel:** 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.

## ABSTRAKT

**Úvod:** Výskyt diseminovaných nádorových buněk (DTCs) a cirkulujících nádorových buněk (CTCs) je spojen se špatnou prognózou a zvýšeným výskytem úmrtí v důsledku onemocnění u pacientek s nemetastatickým karcinomem prsu. Cílem dizertační práce bylo stanovit DTCs v kostní dřeni a CTCs v periferní krvi u pacientek s primárním karcinomem prsu, zhodnotit korelaci výskytu DTCs/CTCs s přítomností dalších prognostických markerů a monitorovat výskyt DTCs/CTCs v průběhu léčby.

**Metody:** Do studie bylo zařazeno 50 pacientek s primárním karcinomem prsu. K analýze CTCs z periferní krve byla použita imunomagnetická separace a k jejich detekci byl použit diagnostický kit AdnaTest Breast Cancer™ (AdnaGen GmbH, Langenhagen, Německo).

Detekce DTCs v kostní dřeni probíhala pomocí imunocytochemické analýzy s pomocí pancytokeratin protilátky konjugované s FITC (monoklonální anti-cytokeratin protilátka F3418, Sigma Aldrich, USA).

**Výsledky:** DTCs jsme stanovili u 30% (15/50) a CTCs u 22% (11/50) pacientek. Studie potvrdila, že DTC pozitivita signifikantně korelovala s velikostí primárního nádoru (p-hodnota 0,011) a infiltrací lymfatických uzlin (p-hodnota 0,002). CTC pozitivita nekorelovala ani s velikostí nádoru či infiltrací axilárních uzlin. DTCs byly převážně detekovány u pacientek ER/PR negativních a HER-2 pozitivních. CTC pozitivita byla zastoupena u pacientek stejnoměrně, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů, jako je ER, PR a HER-2 pozitivita. V naší studii jsme neprokázali vztah mezi přítomností CTCs a DTCs ( $r = -0,097$ ,  $p = 0,054$ ). Analýzu DTCs/CTCs jsme použili k monitoraci efektu terapie u 29 pacientek indikovaných k neoadjuvantní chemoterapii (NACT). Nejistili jsme žádnou signifikantní korelaci mezi výskytem DTCs/CTCs a odpovědí na primární NACT. V naší studii dosáhlo 31% (9/29) pacientek patologické kompletní remise (pCR) a neprokázali jsme u nich korelaci pCR s výskytem DTCs po NACT.

**Závěr:** Analýza DTCs/CTCs u časného karcinomu prsu by mohla posloužit jako další prognostická informace pro klinickou praxi, to dokazují i naše výsledky. Výzkum v uvedené oblasti má nejenom prognostický význam, ale i obrovský potenciál při individualizaci terapie u žen s karcinomem prsu.

**Klíčová slova:** karcinom prsu; diseminované nádorové buňky; cirkulující nádorové buňky; sternální punkce; prognostické/prediktivní faktory; efekt terapie

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Simultaneous detection of disseminated tumor cells (DTCs) and circulating tumor cells (CTCs) was shown to be associated with an especially poor prognosis and increased incidence of disease-related deaths in non-metastatic breast cancer patients. We analyzed the occurrence of DTCs in bone marrow and CTCs in peripheral blood in patients with primary breast cancer, we evaluated the correlation of their presence with other prognostic markers and we investigated the changes in DTCs/CTCs number at different time points during treatment.

**Materials and methods:** Blood of 50 patients with primary breast cancer were used for immunomagnetic separation and detection of circulating tumor cells using the commercial available system the AdnaTest Breast Cancer™ (AdnaGen GmbH, Langenhagen, Germany). Bone marrow aspirates from 50 patients were analyzed for DTCs by immunocytochemistry using the pancytokeratin antibody conjugated with FITC (Monoclonal Anti-Cytokeratin antibody F3418, Sigma Aldrich, USA).

**Results:** DTCs were identified in 30% (15/50) and CTCs in 22% (11/50) of patients. We found that DTC positivity could point to a significantly high risk of larger primary tumor size (p- value 0.011) and significantly higher risk of lymph node involvement (p- value 0.002). For CTC positivity, no such relationship was proven. DTCs have shown significantly higher prevalence in ER/PR-negative females and in HER-2-positive cases. CTCs were equally prevalent in patients with the presence and absence of standard prognostic and predictive markers such as ER, PR and HER-2. We found no correlation between CTCs and DTCs findings ( $r = -0.097$ ,  $p = 0.504$ ). We used DTCs/CTCs analysis for therapy monitoring in a small group of 29 patients, who underwent neoadjuvant chemotherapy (NACT). We find out no significant correlation between DTCs/CTCs detection and the primary tumor response to NACT. A pathologic complete response (pCR) was achieved by 31% (9/29) of the patients in our study, however, no association was observed between pCR and the detection of DTCs after NACT.

**Conclusion:** These results support the use of DTCs/CTCs analysis in early breast cancer to generate clinically useful prognostic information. The study of these cells apart from the impact on refining prognosis, has the exciting potential of individualising treatment for women with breast cancer.

**Keywords:** breast cancer; disseminated tumor cells; circulating tumor cells; bone marrow aspiration; prognostic/predictive markers; therapy monitoring



## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>4</b>
2.1	PRACOVNÍ HYPOTÉZA .....	4
2.2	CÍLE PRÁCE .....	4
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>6</b>
3.1	SUBJEKTY HODNOCENÍ .....	6
3.2	ODBĚR VZORKU KOSTNÍ DŘENĚ .....	8
3.3	ODBĚR VZORKU PERIFERNÍ KRVE.....	8
3.4	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI DISEMINOVANÝCH NÁDOROVÝCH BUNĚK.....	8
3.4.1	<i>Zpracování vzorků kostní dřene a izolace diseminovaných nádorových buněk</i> .....	8
3.4.2	<i>Imunocytochemická detekce diseminovaných nádorových buněk</i> .....	9
3.5	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI CÍRKULUJÍCÍCH NÁDOROVÝCH BUNĚK.....	9
3.5.1	<i>Zpracování vzorků periferní krve a izolace cirkulujících nádorových buněk</i> .....	9
3.5.2	<i>Detekce cirkulujících nádorových buněk</i> .....	10
3.6	STATISTICKÁ ANALÝZA .....	10
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>12</b>
4.1	CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTEK.....	12
4.2	KORELACE VÝSKYTU CTC/DTC V SOUVISLOSTI S TNM KLASIFIKACÍ.....	12
4.3	KORELACE VÝSKYTU CTC/DTC V SOUVISLOSTI S EXPRESÍ HORMONÁLNÍCH RECEPTORŮ A HER-2 ..	13
4.4	VZTAH MEZI PŘÍTOMNOSTÍ CTC V PERIFERNÍ KRVI A DTC V KOSTNÍ DŘENI.....	16
4.5	MONITOROVÁNÍ VÝSKYTU DTC/CTC V PRŮBĚHU TERAPIE.....	16
4.5.1	<i>CTC v průběhu terapie</i> .....	16
4.5.2	<i>DTC v průběhu terapie</i> .....	16
4.6	MONITOROVÁNÍ VÝSKYTU DTC/CTC V PRŮBĚHU LÉČBY VE SKUPINĚ PACIENTEK S NEOADJUVANTNÍ A ADJUVANTNÍ TERAPIÍ .....	17
4.7	DTC/CTC U PREMENOPAUZÁLNÍCH A POSTMENOPAUZÁLNÍCH PACIENTEK.....	19
<b>5</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>20</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>25</b>
	<b>LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
	<b>SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ</b> .....	<b>32</b>

# 1 ÚVOD

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním žen v České republice (ČR), což potvrzují i nejnovější epidemiologická data Národního onkologického registru (NOR). V roce 2010 bylo zjištěno 6 498 případů, což v přepočtu na 100 tisíc žen představovalo 121,3 případů a zároveň téměř 18,2% ze všech hlášených zhoubných novotvarů (ZN) a novotvarů in situ u žen. Incidence, tedy počet nově hlášených případů na 100.000 obyvatel za rok, má stoupající tendenci.

Mortalita, tedy počet úmrtí v důsledku zhoubného nádoru prsu na 100.000 obyvatel za rok, v poslední době mírně klesá, což znamená, že díky pravidelnému vyšetřování žen a lepším léčebným možnostem umírá méně žen, které onemocněly zhoubným nádorem prsu.

Zhoubný novotvar prsu často postihuje ženy v produktivním věku, téměř 43% pacientek je mladších než 60 let. Příznivou charakteristikou epidemiologie nádorů prsu v ČR je dlouhodobě rostoucí podíl nově diagnostikovaných málo pokročilých klinických stádií. To výrazně zlepšuje dosažitelné výsledky léčby a vede též ke snížení souvisejících nákladů [1].

Detekce diseminovaných nádorových buněk (DTC) v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk (CTC) v periferní krvi je předmětem výzkumu četných pracovních skupin, které se snaží zdokonalit nové diagnostické postupy. Rakovina prsu hraje důležitou „řídící“ úlohu v oblasti výzkumu DTC/CTC. Generalizované onemocnění v době primární diagnózy nebo relaps nemoci jsou zodpovědné za drtivou většinu případů úmrtí v souvislosti s rakovinou (~90%), [2]. Důkazy naznačují, že metastatické šíření z primárního nádoru je časnou známkou progresu onemocnění a nikoli její pozdní následek, jak se dříve myslelo [3].

Diseminaci nádoru u časného karcinomu prsu nelze zpočátku diagnostikovat ani pomocí zobrazovacích metod ani histopatologicky, proto se stále více uplatňují citlivé imunocytochemické a molekulární metody, určené k časnějšímu zachytu nádorových buněk v kostní dřeni, periferní krvi nebo lymfatických uzlinách. Včasný záchyt diseminovaných nádorových buněk (DTC) je důležitou informací o nebezpečí budoucího znovuzplanutí nemoci a tedy i důvodem k podání systémové zajišťovací léčby a stává se jedinou „měřitelnou lézí“ pro posouzení efektu adjuvantní léčby. Také informace o přítomnosti izolovaných nádorových buněk v sentinelové uzlině posouvá hranice stagingu nádoru a podává informaci o možné lymfogenní propagaci [4].

Metastázy jako konečný produkt vývoje zhoubného nádoru jsou pro onkologa i jeho pacienta nežádoucím vyústěním průběhu choroby. TNM klasifikace i typing nádoru představují jen hrubou orientační metodu k posouzení rizika metastazování a volbě vhodné zajišťovací léčby. Vznik metastázy souvisí nejen s typem a rozsahem nádoru, ale i s charakteristikou mikroprostředí organismu, ve kterém se primární nádor nachází. Nádorová masa je tvořena heterogenní populací nádorových buněk a jen některé buňky jsou předurčeny k úspěšnému metastazování. Výzkum v oblasti metastatické kaskády na buněčné a molekulární úrovni poskytuje velký potenciál pro zlepšení diagnostiky a rozvoj účinné adjuvantní terapie.

Biopsie z primárního nádoru před zahájením léčby se v současné době používá ke stanovení molekulárních cílů. Tyto biopsie nesou určitá rizika pro pacienty, jsou invazivní, bolestivé, a stanovení výsledku trvá určitou dobu. Dalším problémem je, že populace nádorových buněk primárního nádoru je heterogenní, a proto může histologické vyšetření vzorku primárního nádoru vést k chybné představě o charakteru nádorových metastáz, které se v biologickém chování i případné léčebné odpovědi mohou od primárního nádoru zásadně odlišovat. Posun v této oblasti přinesla tzv. tekutá biopsie (liquid biopsy), neinvazivní vyšetření cirkulujících nádorových buněk a cirkulujících nádorových nukleových kyselin. Uvedená metoda umožňuje sledovat genotyp nádoru v reálném čase, predikovat s dostatečným předstihem další vývoj onemocnění, odpověď na léčbu nebo riziko progresu. Výhledově by se vyšetření CTC mohlo uplatnit jako náhrada biopsie metastázy.



## **2 Hypotézy a cíle práce**

### **2.1 Pracovní hypotéza**

Karcinom prsu je morfologicky a geneticky velmi heterogenní onemocnění. I přes pokrok ve včasné diagnostice karcinomu prsu a zlepšení adjuvantní terapie je prognóza pacientek limitována v důsledku výskytu vzdálených metastáz, které jsou okultní a zůstávají nedetekovatelné v době stanovení primární diagnózy. Proto se současný výzkum soustřeďuje na stanovení dalších parametrů, které umožňují individuální posouzení rizik a stratifikaci pacientů pro cílenou terapii. Tradiční prognostické faktory totiž nejsou dostatečné k tomu, aby předpověděly relaps onemocnění.

Vysoce citlivé a specifické imunomagnetické, imunofluorescenční a molekulární metody nyní umožňují detekci a charakterizaci DTC/CTC na úrovni jediné buňky v kostní dřeni a periferní krvi, což nám poskytuje náhled do prvního zásadního stupně v metastatické kaskádě. Mnoho studií prokázalo, že přítomnost DTC v kostní dřeni koreluje s horší prognózou u pacientek s karcinodem prsu. Periferní krev je ideálním zdrojem pro detekci a monitorování CTC kvůli neinvazivnosti vyšetření s možností opakování odběru. Kromě toho by mohla molekulární charakterizace CTC přispět ke zlepšení cílené onkologické léčby. Perspektivně by vyšetření DTC/CTC mělo být zařazeno mezi doporučené standardy léčebného schématu u karcinomu prsu jako biomarker odhadu rizika relapsu vhodný pro individualizaci terapie, monitorování účinnosti léčby a v neposlední řadě i pro rozvoj nových léčebných postupů u zhoubných onemocnění prsu. Cílená onkologická léčba tzv. „šitá na míru“ (tailored therapy) znamená i snížení nákladů individuální léčby jednotlivé pacientky s úmyslem léčit dostatečně adresně s minimalizací nežádoucích účinků.

### **2.2 Cíle práce**

- Zavedení metodiky stanovení minimální reziduální choroby.
  - Stanovení diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni u pacientek s časným karcinodem prsu pomocí denzní gradientové centrifugace a imunocytochemické detekce

- Stanovení cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u pacientek s časným karcinomem prsu pomocí diagnostického systému AdnaTest
- Korelace výskytu DTC/CTC s klinicko-patologickými charakteristikami primárního nádoru
- Vztah mezi přítomností CTC v periferní krvi a DTC v kostní dřeni
- Monitorování výskytu DTC/CTC v průběhu léčby ve skupině pacientek s neoadjuvantní a adjuvantní terapií

## **3 Materiál a metodika**

### **3.1 Subjekty hodnocení**

Do studie byly zařazeny pacientky, které byly v období let 2010 až 2013 diagnostikovány a léčeny pro karcinom prsu na Onkologické klinice VFN a 1. LF UK v Praze. Odběr vzorků byl proveden na základě písemného souhlasu pacientek a podepsání informovaného souhlasu schváleného lokální etickou komisí VFN a 1. LF UK. Vzorky byly zpracovány v Laboratoři klinické imunologie a alergologie Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze.

Vstupní kritéria pro zařazení pacientek byla následující: histologicky verifikovaný karcinom prsu, věk 18-75 let, bez předchozího chirurgického zákroku a bez předešlé onkologické terapie. Vylučujícími kritérii byly vzdálené metastázy a předešlá chirurgická či onkologická terapie. Stadium nemoci bylo hodnoceno podle TNM klasifikace, 6. vydání, česká verze z roku 2004. Klinicko-patologická charakteristika pacientek v době diagnózy je shrnuta v tabulce 1.

**Tabulka 1 Klinicko-patologická charakteristika pacientek (n=50)**

<b>Klinicko-patologická charakteristika</b>	<b>Celkem</b>	<b>%</b>
<b>Medián věku, y</b>	37 let	NA
<b>T – primární nádor</b>		
T1	24	48
T2	19	38
T3/4	7	14
<b>Stupeň diferenciaci – grade</b>		
Dobře diferencovaný	3	6
Středně diferencovaný	20	40
Nízce diferencovaný	27	54
<b>Histologický typ nádoru</b>		
Duktální	44	88
Lobulární	2	4
Jiný	4	8
<b>Stav hormonálních receptorů</b>		
Estrogenové receptory pozitivní	30	60
Progesteronové receptory pozitivní	29	58
HER-2 pozitivní	11	22
<b>Stav lymfatických uzlin</b>		
Lymfatické uzliny negativní	30	60
Lymfatické uzliny pozitivní	18	36
Nelze hodnotit lymfatické uzliny	2	4

Pozn.: NA- not aplicable (neaplikovatelný)

Vstupně podstoupila každá pacientka stagingová vyšetření (RTG plic, UZ břicha, scintigrafii skeletu) k vyloučení generalizace základního onemocnění. Cut-off hodnota použitá ke stanovení hormonální positivity byla 5%. Nádor byl vyhodnocen jako HER-2 pozitivní v případě, že výsledek HercepTestu byl 3+. Ve sporných případech (2+) byla doplněna fluorescenční in situ hybridizace. Ve studii byly dvě podskupiny pacientek podle pokročilosti onemocnění a léčebného schématu. V první podskupině bylo vyšetřených 29 pacientek s onemocněním ve stadiu T2-4 N0-2, které zahájily léčbu neoadjuvantní chemoterapií (NACT), poté následovala operace a adjuvantní terapie. Vyšetřili jsme u nich kostní dřeň a periferní krve před zahájením NACT a po ukončení NACT, kdy kontrolní odběr dřeně i krve proběhl v době operace. Ve druhé podskupině bylo vyšetřeno 21 pacientek stadia T1-2 N0-1, které podstoupily primární chirurgický výkon doplněný adjuvantní léčbou.

Vzorky kostní dřeně a periferní krve byly získány v průběhu operace - segmentektomie nebo ablace. Kontrolní odběr byl proveden po 12 měsících adjuvantní léčby.

### **3.2 Odběr vzorku kostní dřeně**

Při sternální punkci jednorázovou punkční jehlou (SteryLab, Itálie) bylo aspirováno 3-5 ml kostní dřeně. Výkon probíhal v místním znečítlivění nebo v celkové anestezii v době chirurgického zákroku. Kostní dřeň byla odebrána do zkumavek Vacutainer® BD K3EDTA (Becton Dickonson Diagnostics, USA). Časová sekvence odběru kostní dřeně je uvedená v předchozím odstavci.

### **3.3 Odběr vzorku periferní krve**

Periferní krev množství 7 ml byla odebrána do zkumavek BD Vacutainer® K3EDTA (okamžité zpracování) nebo do speciálních zkumavek AdnaCollect (zpracování vzorku do 24 hodin). Vzorky krve byly odebrány ve stejnou dobu jako vzorky kostní dřeně.

### **3.4 Stanovení přítomnosti diseminovaných nádorových buněk**

#### **3.4.1 Zpracování vzorků kostní dřeně a izolace diseminovaných nádorových buněk**

Do zkumavky o objemu 50 ml naplněné 20 ml Hankova roztoku byl přidán aspirát kostní dřeně a zkumavka byla centrifugována po dobu 10 minut při 168 x 125 g. Centrifugací došlo k oddělení jednotlivých frakcí, horní vrstva byla následně odstraněna a peleta byla resuspendována. Tato buněčná suspenze byla přidána do zkumavek Leucosep™ (Greiner Bio-One GmbH, Německo) a centrifugována s použitím gradientového separačního media k získání frakce mononukleárních buněk. Densní gradientová centrifugace byla provedena podle instrukcí výrobce. Cílem gradientové centrifugace bylo též očištění vzorku o mrtvé buňky, které mají tendenci k nespecifickému značení a záchytu v koloně. V jednokrokové proceduře by tak mohly výrazně kontaminovat pozitivní frakci.

Interfáze obsahující mononukleární buňky kostní dřeně byla promyta 10 ml fosfátového pufru (PBS) a poté centrifugována po dobu 10 minut při 250 x g. Tento krok byl opakován dvakrát. Buněčná peleta byla resuspendována s 5 ml PBS. Ve vzorku byl stanoven počet buněk a následně byla buněčná suspenze naředěna na koncentraci  $1 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$ . 300  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze bylo pipetou naneseno na mikroskopické sklíčko potažené poly-L-lysinem (Poly-Prep sklíčka, Sigma-Aldrich, USA). Sklíčka s nanesenou buněčnou suspenzí byla inkubována ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut a následně vysušena při pokojové teplotě.

### **3.4.2 Imunocytochemická detekce diseminovaných nádorových buněk**

Po usušení buněčné suspenze byla sklíčka fixována 3,7% roztokem p-formaldehydu po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Sklíčka byla třikrát promyta (po 5 minutách) PBS pufrem a pak byl přidán 0,5% Tween 20 roztok a sklíčka byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Po oplachu PBS pufrem (3 krát po 5 minutách) byl aplikován roztok protilátky. Roztok protilátky sestával z ředícího pufru (Couating Stabilizer and Blocking Buffer, Sigma Aldrich, USA) a pan-cytokeratin protilátky konjugované s FITC (Monoclonal Anti-Cytokeratin antibody F3418, Sigma Aldrich, USA). Sklíčka byla inkubována s roztokem protilátky po dobu 12 hodin při pokojové teplotě ve tmě. Následoval další proplach v PBS (3 krát po 5 minutách). K montáži sklíček bylo použito montážní médium ProLong® Gold Antifade s DAPI činidlem (Molecular Probes®, Life Technologies, USA). Po zaschnutí preparátu probíhala detekce DTC pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51.

## **3.5 Stanovení přítomnosti cirkulujících nádorových buněk**

### **3.5.1 Zpracování vzorků periferní krve a izolace cirkulujících nádorových buněk**

Analýza a izolace CTC probíhala z 5 ml plné krve pomocí diagnostického kitu AdnaTest Breast Cancer™ (AdnaGen GmbH, Langenhagen, Německo). Periferní krev byla zpracována podle pokynů výrobce. Detekce byla založena na imunomagnetické separaci CTC z plné krve, následné lýze CTC a identifikaci genové exprese s nádorem asociovaných markerů pomocí PCR. Imunomagnetická separace byla založena na využití protilátky proti epiteliálnímu glykoproteinu GA733-2 (EpCAM) a epiteliálnímu antigenu MUC-1. Tyto protilátky byly konjugovány s magnetickými kuličkami (Dynabeads), které umožňují separaci

jednotlivých frakcí. Magnetické kuličky byly přidány do odebrané krve. Vzorek byl následně inkubován a poté byl pomocí magnetického separátoru získán komplex magnetických kuliček s konjugovanými protilátkami navázanými na obohacenou frakci nádorových buněk. Po následném promytí byly navázané CTC lyzovány. Z lyzátu byla izolovaná mRNA pro detekci tumor-asociované mRNA získané z CTC. Dále byla reversní transkripcí vytvořena komplementární DNA, která byla detekována a charakterizována PCR.

### **3.5.2 Detekce cirkulujících nádorových buněk**

mRNA izolace z lyzovaných, obohacených buněk byla provedena s použitím Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro kitu (Dynal Biotech GmbH, Hamburg, Německo) v kombinaci s oligo(dT) konjugovanými magnetickými kuličkami (Dynabeads). Komponenty byly součástí AdnaTest BreastCancer Detect kitu (Adnagen AG, Langenhagen, Německo). mRNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA. Analýza nádorově-asociované mRNA získané z CTC byla provedena s využitím multiplex PCR pro 3 nádorově asociované transkripty: receptor lidského epidermálního faktoru 2 (HER-2), Mucin 1 (MUC-1) a epiteliálního glykoproteinu GA733-2 (EpCAM). Gen aktin byl použit jako vnitřní pozitivní kontrola PCR. Přístroj 2100 Bioanalyzer s DNA 1000 kitem (Agilent Technologies, Německo) posloužil ke kvantitativnímu vyhodnocení a vizualizaci amplifikovaných PCR transkriptů. Za pozitivní výsledek byla považována zřetelná detekce alespoň jednoho ze sledovaných PCR transkriptů. Jako pozitivní byly hodnoceny píky s koncentrací vyšší než 0,30 ng/μl. Nedetekovatelné píky nebo ty s koncentrací méně než 0,15 ng/μl byly negativní. Píky, jejichž koncentrace byla v rozmezí 0,15 – 0,30 ng/μl byly neprůkazné a bylo tedy nutné provést re-testování nového vzorku. Ve vzorcích všech pacientů musel být při vyhodnocení detekován aktin. V případě negativní PCR a RT kontroly nesměly být zaznamenány píky o velikosti vyšší než 80 bp. Přítomnost fragmentu většího než 1 kb by znamenala, že vzorek byl kontaminován genomovou DNA, takový výsledek musel být vyřazen.

### **3.6 Statistická analýza**

Požadovaná velikost souboru byla vypočtena pomocí freeware Epi Info™ 6,04 z Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (USA). Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu STATISTICA CZ verze 12.0 (StatSoft Inc, USA). Pro deskriptivní popis spojitých parametrů byly vypočteny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Pro srovnání hodnot

měřených opakovaně v čase byl použit párový t-test. Souhrnné údaje jsou vyjádřeny jako mediány (interquartile range) nebo procenta. Fisherův test byl použit pro výpočet významnosti rozdílu dvou rozptylů. Různé skupiny byly porovnány s použitím neparametrického Kruskal-Wallisova testu. Spearmanův test byl použit ke korelaci mezi dvěma proměnnými. Za statisticky významnou byla považována p-hodnota  $\leq 0.05$ .



## **4 Výsledky**

### **4.1 Charakteristika souboru pacientek**

Do celkového hodnocení bylo zařazeno celkem 50 nemocných s karcinomem prsu. Medián věku pacientek byl 37 let (věkové rozmezí 33 – 40 let). 24 pacientek z 50 (48%) bylo stadia T1, 19 pacientek (38%) bylo stadia T2 a ostatní pacientky měly primární nádor stadia T3/T4. U 18 pacientek (36%) byly předoperačně prokázány metastázy v regionálních mízních uzlinách (odpovídá N1 nebo N2). 88% pacientek mělo histologicky potvrzený invazivní duktální karcinom. Stupeň diferenciacie nádoru byl u 3 pacientek stanoven jako low grade karcinom, u 20 pacientek se jednalo o grade 2 a u 27 pacientek byl stupeň diferenciacie vyhodnocen jako grade 3. Expres HER-2 byla prokázána v 11 z 50 případů (22%). Dále byla v primárním nádoru imunohistochemicky stanovena exprese hormonálních receptorů. Ve 30 z 50 (60%) případů šlo o ER pozitivní nádory a PR pozitivita byla u 29 z 50 (58%) vyšetřených. Triple negativní nádory (ER negativní/PR negativní/HER-2 negativní) byly zastoupeny u 28% (14/50). Klinická data jsou uvedena v tabulce 1.

### **4.2 Korelace výskytu CTC/DTC v souvislosti s TNM klasifikací**

Vstupně byla CTC pozitivita prokázána u 11 z 50 (22%) pacientek. Rozdělení CTC ve vztahu k TNM klasifikaci je uvedeno v tabulce 2. DTC byly iniciálně detekovány u 15 z 50 (30%) pacientek, viz tabulka 3. Pouze přítomnost DTC v kostní dřeni byla signifikantně vyšší u pacientek s pokročilejším stadiem onemocnění. DTC pozitivita tedy signifikantně koreluje s velikostí primárního nádoru (T-stadium) a infiltrací lymfatických uzlin (N-stadium). Neprokázali jsme žádnou korelaci mezi CTC a DTC ( $r = -0,097$ ,  $p = 0,504$ ).

**Tabulka 2 Výskyt CTC v korelaci s TNM klasifikací**

		Pacientky n = 50		CTC pozitivní n = 11		CTC negativní n = 39		<i>p</i>
		n	%	n	%	N	%	
<b>T-stadium</b>	T1	24	48	5	45.5	19	48.7	<b>0.418</b> <b>NS</b>
	T2	19	38	4	36.4	15	38.5	
	T3/4	7	14	2	18.2	5	12.8	
<b>N-stadium</b>	N0	30	60	7	63.6	23	59.0	<b>0.304</b> <b>NS</b>
	N1	17	34	4	36.4	13	33.3	
	N2	1	2	0	0	1	2.6	
	Nx	2	4	0	0	2	5.1	

NS, nesignifikantní;

\*,  $p < 0.05$

\*\*,  $p < 0.01$

**Tabulka 3 Výskyt DTC v korelaci s TNM klasifikací**

		Pacientky n = 50		DTC pozitivní n = 11		DTC negativní n = 39		<i>p</i>
		n	%	n	%	N	%	
<b>T-stadium</b>	T1	24	48	4	26.7	20	58.3	<b>0.011*</b>
	T2	19	38	8	53.3	11	30.6	
	T3/4	7	14	3	20.0	4	11.1	
<b>N-stadium</b>	N0	30	60	7	46.7	23	65.7	<b>0.002**</b>
	N1	17	34	6	40.0	11	31.4	
	N2	1	2	1	6.7	0	0	
	Nx	2	4	1	6.7	1	2.9	

NS, nesignifikantní;

\*,  $p < 0.05$

\*\*,  $p < 0.01$

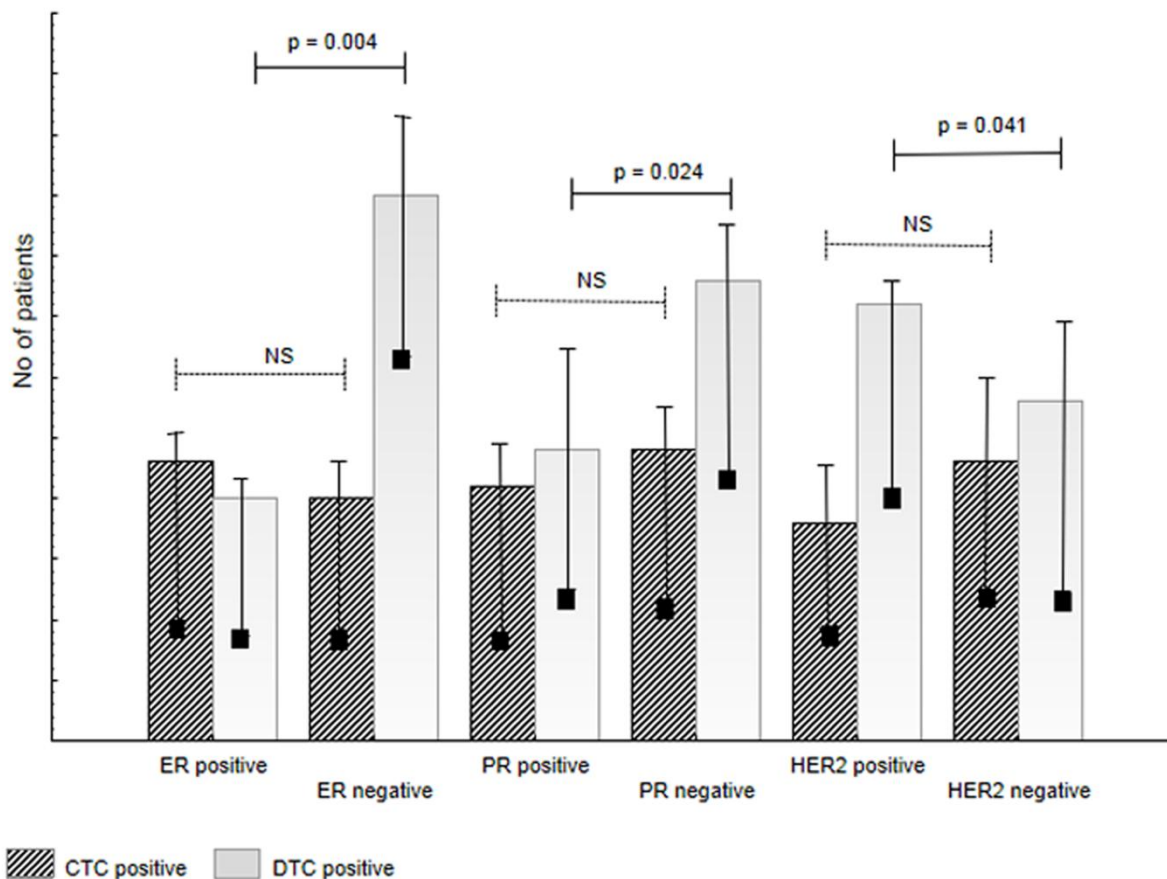
### **4.3 Korelace výskytu CTC/DTC v souvislosti s expresí hormonálních receptorů a HER-2**

CTC byly detekovány u 23% pacientek s pozitivní expresí ER a u 20% pacientek s ER negativním nádorem, u 21% pacientek s PR pozitivním onemocněním ve srovnání s 24% pacientek s PR negativním onemocněním. V případě HER-2 positivity byly CTC prokázány u 18% pacientek, u HER-2 negativních nemocných byla CTC pozitivita prokázána u 23%.

DTC pozitivita byla pozorována u 20% patientek s ER pozitivním nádorem a u 45% patientek s ER negativním nádorem, u 24% patientek s PR pozitivním nádorem a u 38% s PR negativním nádorem. U HER-2 pozitivních patientek to bylo u 36% ve srovnání s 28% u patientek s HER-2 negativním onemocněním.

V souhrnu byla CTC pozitivita zastoupena u patientek stejnoměrně bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů, jako je exprese ER, PR a HER-2. DTC pozitivita se naopak ukázala signifikantně vyšší u ER/PR negativních patientek. Přítomnost DTC byla podstatně častější u HER-2-pozitivních patientek. Overexprese HER-2 onkoproteinu, respektive amplifikace HER-2 genu je spojena se signifikantně horší prognózou. Obrázek 1 znázorňuje CTC a DTC pozitivitu v korelaci s expresí hormonálních receptorů a HER-2 expresí, které byly stanoveny ve vstupní biopsii.

**Obrázek 1 CTC a DTC pozitivita v korelaci s expresí hormonálních receptorů a HER-2 expresí**



ER- estrogenové receptory  
 PR- progesteronové receptory  
 HER2- receptor lidského epidermálního růstového faktoru  
 CTC- cirkulující nádorové buňky  
 DTC- diseminované nádorové buňky  
 NS- nesignifikantní  
 Černé čtverce představují mediány.

Pro analýzu vztahů mezi binárními proměnnými, kterými klasifikujeme (1) T1 versus  $\geq$ T2 velikost primárního nádoru, (2) N0 versus  $\geq$ N1 infiltrace axilárních uzlin, (3) stav hormonálních receptorů - ER pozitivní versus ER negativní, PR pozitivní versus PR negativní, a (4) stupeň diferenciacce grade 1 versus grade 2-3, a spojitými prediktory CTC a DTC jsme použili logistický regresní model.

DTC pozitivita korelovala s větším primárním nádorem a vyšším rizikem postižení axilárních uzlin a tyto výsledky byly signifikantní. Toto však nebylo prokázáno pro CTC, viz tabulka 4.

**Tabulka 4 Kroková multivariační regrese výskytu CTC a DTC před zahájením terapie.**

		CTC pozitivita	DTC pozitivita
<b>Velikost nádoru</b>	OR	1.24	2.317
<b>T1 versus <math>\geq</math>T2</b>	95% CI	0.51 - 5.71	0.035–4.667
	<i>p</i>	0.102, NS	<b>0.0249*</b>
<b>Stav lymfatických uzlin</b>	OR	1.65	3.260
<b>N0 versus <math>\geq</math>N1</b>	95% CI	0.85 - 12.90	1.059–8.374
	<i>p</i>	0.093, NS	<b>0.0047**</b>
<b>Stav hormonálních receptorů</b>	OR	0.95	1.984
<b>ER+ versus ER-</b>	95% CI	0.42 - 3.24	0.98 - 4.26
	<i>p</i>	0.345, NS	<b>0.0371*</b>
<b>Stav hormonálních receptorů</b>	OR	0.89	1.879
<b>PR+ versus PR-</b>	95% CI	0.32 - 2.99	0.09 - 3.54
	<i>p</i>	0.410, NS	<b>0.0405*</b>
<b>Stupeň diferenciacce</b>	OR	1.09	1.04
<b>I versus II, III</b>	95% CI	0.58 - 4.27	0.047 - 2.98
	<i>p</i>	0.108, NS	0.057*

Pozn.: Poměr šancí (ORs) a 95% konfidenční interval (CIs) jsou uvedeny pro primární charakteristiky nádoru.

NS- nesignifikantní;

\*,  $p < 0.05$

\*\*\*,  $p < 0.01$

## **4.4 Vztah mezi přítomností CTC v periferní krvi a DTC v kostní dřeni**

Vstupně jsme vyšetřili periferní krev a kostní dřeň u 50 pacientek. U 9 (18%) z 50 pacientek jsme zjistili pouze CTC pozitivitu a u 13 (26%) z 50 pacientek pouze DTC pozitivitu. Ve dvou případech z 50 jsme prokázali současně pozitivitu CTC i DTC. Klinicko-patologická charakteristika těchto 2 pacientek se významně nelišila od pacientek, které byly buď CTC pozitivní nebo DTC pozitivní nebo u kterých nebyla detekována minimální reziduální nemoc. V naší studii jsme neprokázali vztah mezi přítomností CTC v periferní krvi a DTC v kostní dřeni ( $p = 0,054$ ). CTC negativní a zároveň DTC negativní nález byl u 26 (52%) z 50 vyšetřených pacientek. Klinicko-patologické vlastnosti těchto 26 pacientek se významně nelišily od charakteristik pacientek s prokázanou minimální reziduální nemocí. V další fázi projektu jsme monitorovali hladiny CTC a DTC v průběhu terapie. U náhodně vybrané skupiny pacientek jsme opakovaně vyšetřili krev i kostní dřeň před zahájením léčby i v jejím průběhu.

## **4.5 Monitorování výskytu DTC/CTC v průběhu terapie**

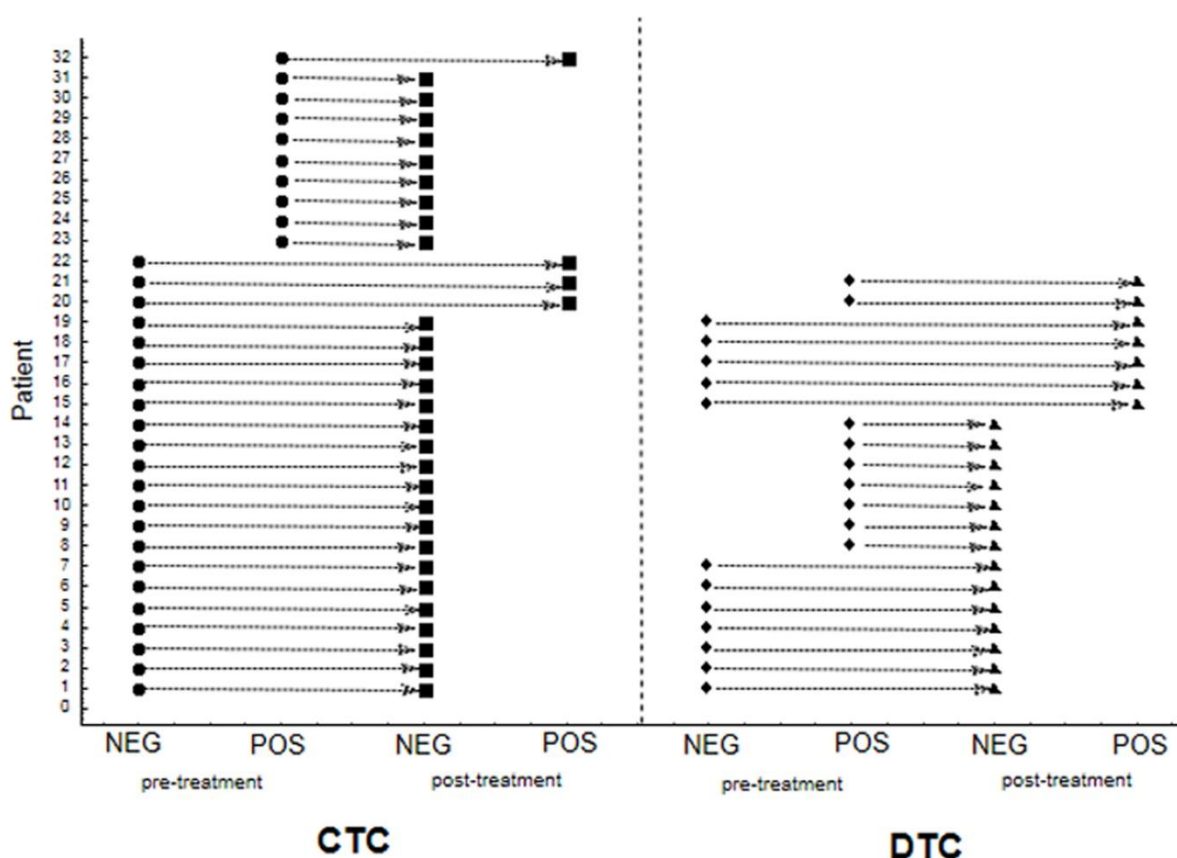
### **4.5.1 CTC v průběhu terapie**

U 32 pacientek jsme opakovaně vyšetřili přítomnost CTC. Z nich v 10 případech byla vstupně prokázána CTC pozitivita a ve 22 případech CTC negativita. Tři (13,6%) z původně negativních pacientek (3/22) byly při kontrolním odběru pozitivní. V průběhu terapie jsme při kontrolním vyšetření krve nedetekovali CTC u 9 (90%) z 10 vstupně CTC pozitivních pacientek viz obrázek 2.

### **4.5.2 DTC v průběhu terapie**

Opakovaně bylo vyšetřeno 21 pacientek na přítomnost DTC. Z toho bylo 12 DTC negativních a 9 DTC pozitivních. 41,7% (5/12) pacientek vstupně DTC negativních bylo při kontrolním odběru pozitivních. U 2 pacientek (22%) přetrvával pozitivní nález v kostní dřeni při kontrolním odběru v průběhu terapie. U většiny pacientek (7/9, tj. 78%) s pozitivním vstupním nálezem v kostní dřeni došlo po léčbě k vymizení DTC z dřene, viz obrázek 2.

Obrázek 2 Srovnání nálezu CTC/DTC před a po terapii



NEG- negativní nález  
 POS- pozitivní nález  
 CTC- cirkulující nádorové buňky  
 DTC- diseminované nádorové buňky

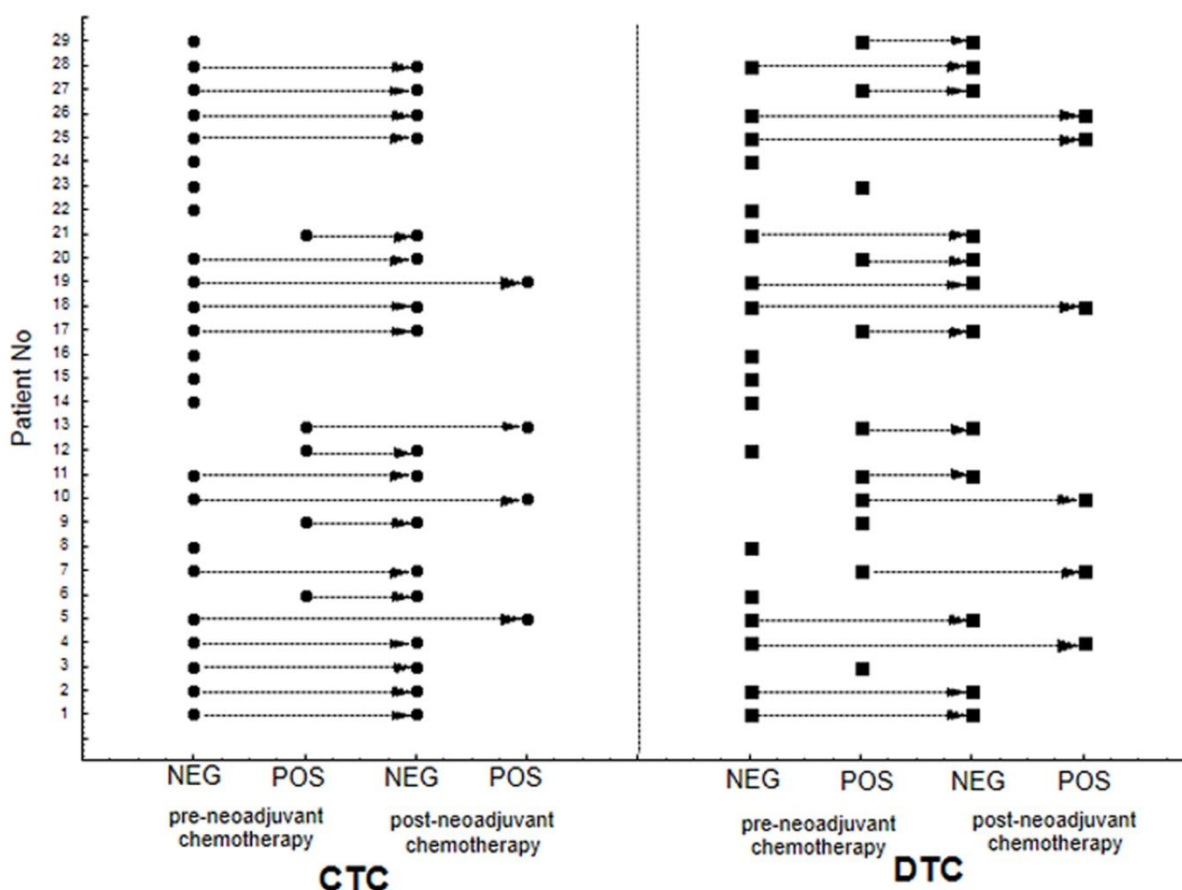
#### 4.6 Monitorování výskytu DTC/CTC v průběhu léčby ve skupině pacientek s neoadjuvantní a adjuvantní terapií

V podskupině pacientek indikovaných k neoadjuvantní chemoterapii bylo 29 pacientek. Odběr kostní dřeně a periferní krve byl proveden před zahájením neoadjuvantní chemoterapie a po ukončení neoadjuvantní léčby. Vstupně jsme detekovali DTC u 11 z 29 (38%) pacientek a CTC u 5 z 29 (17%) pacientek. Po ukončení neoadjuvance byl kontrolní odběr proveden u 8 z 11 pacientek, u 2 pacientek přetrvávala pozitivita v kostní dřeni, 6 pacientek bylo negativních.

Vstupní vyšetření dřeně bylo DTC negativní u 18 pacientek (22%). Kontrolní odběr byl v této skupině proveden u 10 případů, z nichž 4 byly pozitivní a 6 negativních. Opakovaná

analýza krve byla provedena u všech 5 pacientek vstupně pozitivních na přítomnost CTC, pozitivita byla zjištěna u 1 (20%) pacientky. Pacientek vstupně CTC negativních bylo 24, kontrolní odběr byl proveden u 16 z nich a ve 3 případech byla prokázána pozitivita viz obrázek 3.

**Obrázek 3 Vývoj CTC/DTC v podskupině pacientek léčených neoadjuvantní terapií**



NEG- negativní nález

POS- pozitivní nález

CTC- cirkulující nádorové buňky

DTC- diseminované nádorové buňky

V operačním nálezu bylo v této skupině dle histologického vyšetření dosaženo patologické kompletní remise (pCR) u 9 z 29 (31%) pacientek. Patologická kompletní remise korelovala s nízkým stupněm diferenciacie nádoru (8/9 měly grade 3) a triple negativitou (ER negativní/PR negativní/HER-2 negativní) - 8 z 9 pacientek.

Výskyt DTC a CTC nekorespondoval s odpovědí na léčbu. Nicméně toto zjištění nebylo statisticky významné.

Ve druhé skupině bylo 21 pacientek indikovaných primárně k chirurgickému výkonu a následně k adjuvantní systémové léčbě. U 4 z 21 pacientek (19%) byly detekovány DTC v

kostní dření v době operace. CTC pozitivita byla zjištěna u 6 z 21 pacientek (29%) v době primárního chirurgického zákroku. Kontrolní analýza kostní dřeně a krve byla provedena po 12 měsících adjuvantní léčby. Zatím jsme neprovedli kontrolní odběr u všech pacientek, které absolvují adjuvantní terapii.

#### **4.7 DTC/CTC u premenopauzálních a postmenopauzálních pacientek**

V našem souboru jsme z celkového počtu 50 pacientek vyšetřili pouze 4 (8%) postmenopauzální pacientky. V těchto dvou skupinách pacientek nebyly pozorovány žádné rozdíly ve výskytu DTC / CTC, viz tabulka 5. Nicméně, výsledek může být zatížen chybou v důsledku malé velikosti souboru.

**Tabulka 5 Výskyt DTC/CTC u premenopauzálních a postmenopauzálních pacientek**

		<b>premenopauzální pacientky, n = 46</b>	<b>postmenopauzální pacientky, n = 4</b>	<b><i>p</i></b>
<b>CTC</b>	negativní, n (%)	36 (78 %)	3 (75 %)	0.674, NS
	pozitivní, n (%)	10 (22 %)	1 (25 %)	
<b>DTC</b>	negativní, n (%)	31 (67 %)	4 (100 %)	0.508, NS
	pozitivní, n (%)	15 (33 %)	0	

*NS, nesignifikantní*



## 5 Diskuse

Zkvalitněním diagnostických metod a léčby se celkové přežívání pacientek s karcinomem prsu v posledních dekádách prodloužilo. Standardně užívaný staging (TNM-klasifikace) karcinomu prsu charakterizuje prognózu onemocnění nedostatečně, a to zejména u pacientek s časným stádiem karcinomu prsu bez postižení axilárních uzlin, u kterých je velice obtížné stanovit riziko relapsu a tudíž zvolit vhodnou formu terapie. Dle četných výzkumných prací se předpokládá, že detekce diseminovaných nádorových buněk (DTCs) v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk (CTCs) v periferní krvi může poskytnout další informace vztahující se k prognóze onemocnění a přesněji stratifikovat skupinu nemocných. Mikrometastázy jako následek diseminačního procesu jsou jen těžko detekované standardními zobrazovacími a laboratorními metodami. Právě výskyt mikrometastáz je po potenciálně kurativním operačním zákroku příčinou časného relapsu onemocnění. Systémová adjuvantní terapie by měla být právě v případech pozitivní detekce DTCs a CTCs prostředkem, kterým metastatickému relapsu předcházíme.

V této práci jsme zkoumali diseminované nádorové buňky v kostní dřeni a cirkulující nádorové buňky v krvi u 50 pacientek s časným karcinomem prsu. Zjistili jsme, že u pacientek v časně fázi onemocnění, je možné imunocytochemicky (ICC) stanovit DTCs v kostní dřeni přibližně u 30% nemocných. V závislosti na detekčních metodách se DTCs diagnostikují v kostní dřeni dle údajů v literatuře u 0% [5] až 100% [6] pacientek bez známek vzdálených metastáz prokazatelných běžnými postupy. Souhrnná analýza velkého souboru pacientek (4703 nemocných) s karcinomem prsu stadií I, II a III imunocytochemicky potvrdila přítomnost DTCs v kostní dřeni u 30,6% nemocných [7]. V současné době jsou k dispozici dvě základní skupiny metod umožňujících detekci DTCs ve dřeni, a to cytologické/cytometrické postupy (na bázi monoklonálních protilátek) a molekulární metody [8-10].

Imunocytochemická analýza je nejrozšířenější cytologickou metodou, která umožňuje izolaci a stanovení počtu jednotlivých buněk [9]. Hlavní výhodou cytologických metod je možnost značení izolovaných buněk monoklonálními protilátkami a jejich následná morfologická charakteristika, která nám umožňuje stanovit velikost a tvar buněk, jakož i určit vztah jádro-plazma. Na základě uvedené charakteristiky lze odhadnout nelegitimní expresi proteinu v buňkách kostní dřeni.

Kromě imunocytochemických metod je další široce užívanou metodou molekulárně biologické stanovení nukleových kyselin, které umožňuje detekci DTC na úrovni jedné buňky. Hlavní výhodou molekulární detekce je téměř neomezená možnost primerů pro téměř jakýkoliv gen. Populace nádorových buněk u karcinomu prsu je velmi heterogenní, proto v současnosti neexistuje univerzální DNA marker pro primární screening DTCs a doporučuje se použít multimarkerovou analýzu [8,9].

Naše výsledky jsme korelovali s histopatologickými a imunohistochemickými charakteristikami primárního nádoru. Zjistili jsme, že DTC pozitivita signifikantně korelovala s velikostí primárního nádoru a infiltrací lymfatických uzlin. Dále bylo zjištěno, že DTC byly převážně detekovány u pacientek ER/PR negativních a HER-2 pozitivních. Naše výsledky byly v souladu se závěry studií Braun a kolektiv [7] a Wiedswang a kolektiv [11], které potvrdily, že pacientky s infiltrací kostní dřeně měly větší primární nádor, nízký stupeň diferenciacie nádoru, měly častěji postižené axilární lymfatické uzliny a negativní hormonální receptory ( $p < 0,001$  pro všechny proměnné). Na druhé straně některé studie neprokázaly korelaci mezi přítomností DTC a stádiem onemocnění, pozitivitou uzlin, hormonálním stavem či HER-2 expresí [12-14].

Pro stanovení CTC v periferní krvi jsme používali diagnostický test AdnaTestBreastCancer. V našem souboru byla CTC pozitivita prokázána u 22% pacientek s primárním karcinomem prsu. Různé pracovní skupiny potvrdily záchyt CTC v krvi v rozmezí od 9% do 50%. Výsledek byl závislý na použité detekční metodě a klinickém stádiu nemoci [15-19]. Dosud není jednoznačně prokázáno, které z metod jsou vhodnější do klinické praxe pro monitorování efektu terapie a pro predikci prognózy, zda detekce založená na RT-PCR (například AdnaTestBreastCancer™) nebo imunocytochemická detekce (například systém Cell-Search™). Oba typy metod jsou zatíženy pravděpodobností falešné positivity, jelikož se k detekci nejčastěji používají antigeny epiteliálního původu a neexistuje specifický antigen, který by identifikoval pouze nádorové buňky rakoviny prsu. Toto téma zpracovává v literatuře více autorů [20,21].

V další analýze jsme srovnávali klinicko-patologickou charakteristiku nádoru a CTC pozitivitu. Zjistili jsme, že CTC pozitivita byla zastoupena u pacientek stejnoměrně bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů, jako je exprese ER, PR a HER-2. CTC pozitivita nekorelovala ani s velikostí nádoru či infiltrací axilárních uzlin. Naše výsledky byly v souladu s pozorováním pracovní skupiny Krishnamurthy a kolektivu. Vyšetřili celkem 92 pacientek s časným karcinomem prsu a k detekci CTC použili CellSearch system. Přítomnost CTCs v periferní krvi byla prokázána u

13 ze 43 pacientek (30%) s nádorem stádia T1 a u 12 z 38 pacientek (32%) s nádorem stádia T2. CTC pozitivita byla zastoupena u pacientek stejnoměrně, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost standardních prognostických a prediktivních markerů. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi výskytem CTC a počtem postižených lymfatických uzlin nebo mezi přítomností mikrometastáz versus makrometastáz v lymfatických uzlinách [13].

Na rozdíl od předchozích zjištění Krishnamurthy a našich zjištění, Fehm a kolektiv vyhodnotili CTCs v krvi u 431 pacientek s primárním karcinomem prsu a prokázali, že přítomnost CTCs významně koreluje s postižením lymfatických uzlin ( $p = 0,04$ ), ER ( $p = 0,05$ ) a PR negativitou ( $p = 0,01$ ). Nejvyšší záchyt CTCs byl zejména u triple negativních pacientek, dále následovaly pacientky s ER pozitivním a/nebo PR pozitivním nádorem (30% vs. 13%,  $p=0,01$ ). Žádné CTCs nebyly detekovány v podskupině HER-2 pozitivních nemocných [22].

V naší studii jsme současně detekovali CTCs v krvi a DTCs v dřeni pouze u 2/50 pacientek (4%) s primárním karcinomem prsu. Klinicko-patologické vlastnosti těchto 2 pacientek se významně nelišily od charakteristik nemocných, u kterých byla stanovena samostatně buď CTC nebo DTC pozitivita, nebo od pacientek bez průkazu minimální reziduální nemoci. Neprokázání závislosti mezi CTCs a DTCs a mezi CTCs a standardními prognostickými a prediktivními markery v naší studii zvyšuje pravděpodobnost teorie o nezávislém způsobu šíření nádorových buněk do vzdálených orgánů. Doba sledování byla v našem souboru dosud velmi krátká, a proto jsme v této práci nemohli hodnotit výskyt CTCs/DTCs v závislosti na celkovém přežití. Nicméně máme v plánu další sledování pacientek a následnou analýzu získaných dat.

Naše výsledky nejsou v souladu se zjištěním Piergy a kolektivu [17], který našel korelaci mezi výskytem diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u pacientek s primárním a metastatickým karcinomem prsu. Nepozorovali však kompletní shodu mezi přítomností CTCs v krvi a DTCs v kostní dřeni. Možným vysvětlením těchto výsledků je teorie, že krev je pouze dočasným prostředím pro diseminované buňky v průběhu šíření. CTCs přežívají v cirkulaci jen krátkou dobu [23] a ne všechny uvolněné nádorové buňky jsou schopné vytvořit sekundární nádorové ložisko v novém prostředí hostitelského organismu, jako je například osídlení kostní dřene. Na základě zjištění klinických studií u pacientek s nemetastazujícím karcinomem prsu se doporučuje monitorovat hladiny CTCs v krvi i DTCs v dřeni s cílem získat více informací o rozsahu onemocnění.

V naší studii jsme použili analýzu DTCs/CTCs pro sledování efektu neoadjuvantní chemoterapie u malé skupiny pacientek (29 pacientek). Nejistili jsme žádnou signifikantní korelaci mezi výskytem DTCs/CTCs a odpovědí na primární neoadjuvantní terapii. Také jsme pozorovali výskyt CTCs u pacientek, které byly původně CTC negativní, což naznačuje teorii, že CTC se mohou uvolňovat do oběhu ze vzdálených orgánů [24]. Uvedený stav může být způsoben také falešně negativním výsledkem při vstupním vyšetření CTCs nebo skutečností, že tyto buňky přežívají v cirkulaci krátkou dobu.

Na druhé straně jsme identifikovali skupinu pacientek, které byly vstupně CTC pozitivní, a při kontrolním odběru jsme zjistili negativní nález v krvi, což můžeme vysvětlit cytotoxickým efektem chemoterapie v uvedené podskupině pacientek. Rovněž změnu nálezu z DTC negativního na DTC pozitivní lze vysvětlit přítomností nízkého počtu DTC, které jsou rezistentní k terapii (buď pod, nebo nad detekčním limitem) a které budou při dalším kontrolním odběru perzistovat ve dřeni. Předchozí zjištění naznačují, že DTCs/CTCs jsou relativně odolné vůči chemoterapii, pravděpodobně v důsledku jejich nízkého proliferačního potenciálu [25,26]. Většina DTCs/CTCs se nachází v neproliferativní fázi, která vykazuje absenci exprese nukleárního proteinu Ki-67, jež je asociována s buněčnou proliferací [16].

Zajímavé je, že pouze polovina pacientů s pozitivitou DTC relabuje v průběhu deseti let od diagnózy, zbývající polovina zůstává bez známek nemoci [7]. Na druhou stranu, tento spící (dormantní) stav DTCs/CTCs může být také příčinou nedostatečné účinnosti adjuvantní chemoterapie na odstranění těchto buněk u pacientek s vysoce rizikovým karcinomem prsu [27]. K transformaci nádorových buněk z klidové fáze do stadia metastázy mohou přispět jak změny v samotných DTCs/CTCs, například další mutace, tak i snížení imunologického dozoru nebo zvýšení angiogenetického potenciálu v okolním mikroprostředí [28,29]. Nicméně dosud není objasněno, za jakých podmínek dochází k probuzení dormantních buněk.

Naše výsledky jsou v souladu s dosud publikovanými závěry několika studií, které neprokázaly korelaci mezi přetrvávající DTC/CTC pozitivitou a odpovědí na terapii [20,30,31]. Naproti tomu, Hayes a kolektiv zjistili, že výskyt CTCs v periferní krvi u pacientů s metastatickým karcinomem prsu kdykoli během léčby přímo hodnotí odpověď na léčbu buď ve smyslu prokázané efektivity, nebo selhání terapie [32]. CTC se tedy jeví jako lepší metoda k monitoraci odpovědi na terapii než dosud používané zobrazovací metody [33,34].

Patologická kompletní remise (pCR) po neoadjuvantní chemoterapii je definovaná jako nepřítomnost nádorových buněk s možností reziduálního nádoru in situ v histologickém hodnocení operačního preparátu po neoadjuvantní léčbě. Tento nález je spojen s výrazným zlepšením období bez nemoci a celkovým přežitím pacientů.

V naší studii dosáhlo 31% pacientek patologické kompletní remise a neprokázali jsme u nich korelaci pCR s výskytem DTCs po neadjuvantní chemoterapii. Naše výsledky jsou v korelaci s analýzou pracovní skupiny Beckera a kolektivu, která vyšetřila 120 pacientek podstupujících primární systémovou léčbu, a zjistila, že i přes dosažení patologické kompletní remise perzistoval pozitivní DTC nález v kostní dřeni [25]. Obdobné výsledky publikovala i jiná pracovní skupina, která sledovala 154 pacientek a potvrdila přítomnost DTCs v kostní dřeni u 10 z 24 pacientek, které dosáhly patologické kompletní remise [35]. Pierga a kol. v souboru 118 pacientek s lokálně pokročilým karcinomem prsu pozoroval, že po ukončení neoadjuvantní chemoterapie přetrvávala přítomnost CTCs v krvi. Pozitivní CTC nález však nekoreloval s odpovědí na léčbu, ale ukázal se jako nezávislý prognostický faktor časného relapsu onemocnění [31]. Patologická kompletní remise byla signifikantně asociovaná s nízkým stupněm diferenciací a triple negativitou. Uvedené výsledky jsou v souladu s německou studií GeparQuattro. Studie byla zaměřena na detekci CTCs v periferní krvi před zahájením neoadjuvantní chemoterapie a po jejím ukončení. Zjistila, že u 20 pacientek (15%) vstupně CTC pozitivních byl kontrolní odběr krve po ukončení léčby již negativní. Zatímco 11 pacientek (8,3%) bylo po terapii CTC pozitivních, avšak před léčbou u nich CTCs nebyly prokázány. CTC nález nekoreloval s charakteristikami primárního nádoru. Nebyl zjištěn ani žádný vztah mezi odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii a výskytem CTCs [36].

## 6 Závěry

Karcinom prsu je v České republice každoročně nově diagnostikován u 7000 žen všech věkových kategorií. I přes narůstající incidenci zhoubných nádorů prsu lze od poloviny 90. let 20. století sledovat pokles mortality na toto onemocnění díky screeningovým programům a novým možnostem diagnostiky a onkologické léčby. Nádory prsu jsou morfologicky a geneticky velmi heterogenní onemocnění. Genové profilování karcinomu prsu pomocí DNA čipů vedlo ke změně v chápání karcinomu prsu a na molekulární úrovni ukázalo, že se jedná o složitou nosologickou jednotku. Molekulární rozmanitost nádorů prsu je dnes podkladem pro volbu léčebné strategie, v níž se mohou uplatnit také nové postupy cílené terapie. Díky možnostem moderní léčby patří dnes karcinom prsu k nejlépe léčitelným solidním nádorům. Využití detekce výskytu diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u časného karcinomu prsu je pokusem implementovat moderní diagnostické technologie do klinické praxe.

V naší práci jsme se zaměřili na izolaci a detekci diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni a cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u pacientek s časným karcinomem prsu.

### **Z výsledků předkládané práce vyplývají tyto závěry:**

- Výskyt DTC v kostní dřeni jsme pomocí imunocytochemické analýzy stanovili přibližně u 30% pacientek. Pro stanovení CTC v periferní krvi jsme používali diagnostický test AdnaTestBreastCancer založený na principu RT-PCR. CTC pozitivita byla prokázána u 22% pacientek s primárním karcinomem prsu. Naše zjištění dokazují, že použité metody stanovení DTC/CTC přinášejí výsledky konzistentní se závěry dosavadních klinických studií, avšak dosud není jednoznačně prokázáno, které z metod jsou vhodnější pro použití v klinické praxi.
- Studie potvrdila, že DTC pozitivita signifikantně korelovala s velikostí primárního nádoru a infiltrací lymfatických uzlin. DTC byly převážně detekovány u pacientek ER/PR negativních a HER-2 pozitivních. CTC pozitivita nekorelovala ani s velikostí nádoru či infiltrací axilárních uzlin. Až

další analýza po pěti letech by měla přinést informaci o prognostickém a prediktivním významu DTC/CTC.

- Nebyla prokázána závislost mezi CTC v krvi a DTC v kostní dřeni. Poznatky z některých studií ukazují, že infiltrace dřeně je častější. Možným vysvětlením je fakt, že dřeň je cílovým orgánem pro DTC, kdežto vyšetření CTC je jenom informací o momentálním stavu procesu diseminace nádoru. Zdá se tedy, že vyšetření DTC má větší prognostickou váhu než vyšetření CTC u pacientek s časným karcinomem prsu.
- Výskyt DTC/CTC nekoreloval s odpovědí na primární neoadjuvantní terapii. Výsledky však nebyly statisticky významné. Zatím jsme neprovedli kontrolní odběr u všech pacientek, které absolvují adjuvantní terapii, proto uvedenou skupinu ještě nelze hodnotit.

Závěrem možno říci, že možnosti zlepšení terapeutických výsledků prostřednictvím současné systémové léčby jsou zřejmě již značně omezeny. K průlomu v léčbě všech nádorů včetně karcinomu prsu je nezbytné pochopení klíčových molekulárních mechanismů vedoucích ke vzniku maligních onemocnění. Další výzkum a podrobná molekulární charakteristika DTC/CTC prostřednictvím genomové amplifikace a popisu expresního profilu jednotlivých nádorových buněk může být užitečná pro lepší pochopení molekulárních mechanismů vedoucích k tvorbě metastáz, ke zlepšení a individualizaci strategie léčby a k objasnění rezistence na terapii.

## Literatura

1. ÚZIS ČR 2013. **Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010.**
2. Fidler IJ: **Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, **43 Suppl:** S3-10.
3. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E *et al.*: **Systemic spread is an early step in breast cancer.** *Cancer Cell* 2008, **13:** 58-68.
4. Herbert GS, Sohn VY, Brown TA: **The impact of nodal isolated tumor cells on survival of breast cancer patients.** *Am J Surg* 2007, **193:** 571-573.
5. Fetsch PA, Cowan KH, Weng DE, Freifield A, Filie AC, Abati A: **Detection of circulating tumor cells and micrometastases in stage II, III, and IV breast cancer patients utilizing cytology and immunocytochemistry.** *Diagn Cytopathol* 2000, **22:** 323-328.
6. Slade MJ, Singh A, Smith BM, Tripuraneni G, Hall E, Peckitt C *et al.*: **Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years.** *Int J Cancer* 2005, **114:** 94-100.
7. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC *et al.*: **A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.** *N Engl J Med* 2005, **353:** 793-802.
8. Alix-Panabieres C, Muller V, Pantel K: **Current status in human breast cancer micrometastasis.** *Curr Opin Oncol* 2007, **19:** 558-563.
9. Lacroix M: **Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells.** *Endocr Relat Cancer* 2006, **13:** 1033-1067.
10. Wolfle U, Muller V, Pantel K: **Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance.** *Future Oncol* 2006, **2:** 553-561.



11. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H *et al.*: **Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2003, **21**: 3469-3478.
12. Hall C, Krishnamurthy S, Lodhi A, Bhattacharyya A, Anderson A, Kuerer H *et al.*: **Disseminated tumor cells predict survival after neoadjuvant therapy in primary breast cancer.** *Cancer* 2012, **118**: 342-348.
13. Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, Reuben J, Gao H, Cohen EN *et al.*: **Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer.** *Cancer* 2010, **116**: 3330-3337.
14. Mathiesen RR, Borgen E, Renolen A, Lokkevik E, Nesland JM, Anker G *et al.*: **Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival.** *Breast Cancer Res* 2012, **14**: R117.
15. Ignatiadis M, Georgoulas V, Mavroudis D: **Circulating tumor cells in breast cancer.** *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008, **20**: 55-60.
16. Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A *et al.*: **Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**: 3678-3685.
17. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de CP, Nos C, Blin N *et al.*: **Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**: 1392-1400.
18. Rack B, Andergassen U, Neugebauer J, Salmen J, Hepp P, Sommer H *et al.*: **The German SUCCESS C Study - The First European Lifestyle Study on Breast Cancer.** *Breast Care (Basel)* 2010, **5**: 395-400.
19. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A *et al.*: **Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients.** *J Clin Oncol* 2006, **24**: 3756-3762.

20. Becker S, Becker-Pergola G, Banys M, Krawczyk N, Wallwiener D, Solomayer E *et al.*: **Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **117**: 227-233.
21. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnett HD, Gazet JC, Sacks N *et al.*: **The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19.** *Eur J Cancer* 1997, **33**: 854-861.
22. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D *et al.*: **Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**: R59.
23. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC: **Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**: 563-572.
24. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L: **Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors.** *Blood* 1994, **83**: 636-640.
25. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T: **Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **106**: 239-243.
26. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G *et al.*: **Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.** *J Natl Cancer Inst* 1993, **85**: 1419-1424.
27. Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F *et al.*: **Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high risk breast cancer patients.** *J Clin Oncol* 2000, **18**: 80–86.

28. Marches R, Scheuermann R, Uhr J: **Cancer dormancy: from mice to man.** *Cell Cycle* 2006, **5**: 1772-1778.
29. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E *et al.*: **A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype.** *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**: 316-325.
30. Drageset V, Nesland JM, Erikstein B, Skovlund E, Sommer H, Anker G *et al.*: **Monitoring of disseminated tumor cells in bone marrow in high-risk breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy.** *Int J Cancer* 2006, **118**: 2877-2881.
31. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S *et al.*: **Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**: 7004-7010.
32. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC *et al.*: **Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 4218-4224.
33. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC *et al.*: **Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**: 6403-6409.
34. De Giorgi U, Valero V, Rohren E, Dawood S, Ueno NT, Miller MC *et al.*: **Circulating tumor cells and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for outcome prediction in metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2009, **27**: 3303-3311.
35. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C *et al.*: **A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation.** *Cancer* 2006, **107**: 885-892.

36. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, Rau T, Loibl S, Komor M *et al.*: **Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**: 2634-2645.

# Seznam vlastních publikací

## Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

- s impact factorem

1. **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. **IF=1,642**
2. Mikulová V, **Čabiňaková M**, Janatková I, Mestek O, Zima T, Tesařová P. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014 Mar;74(2):132-42. **IF =2,009**
3. **Čabiňaková M**, Tesařová P. Disseminated and circulating tumour cells and their role in breast cancer. *Folia Biol (Praha)*. 2012;58(3):87-97. **IF=1,219**