

Cirkulirajoče tumorske celice in njihov pomen pri raku dojke – pregled izsledkov dosedanjih raziskav

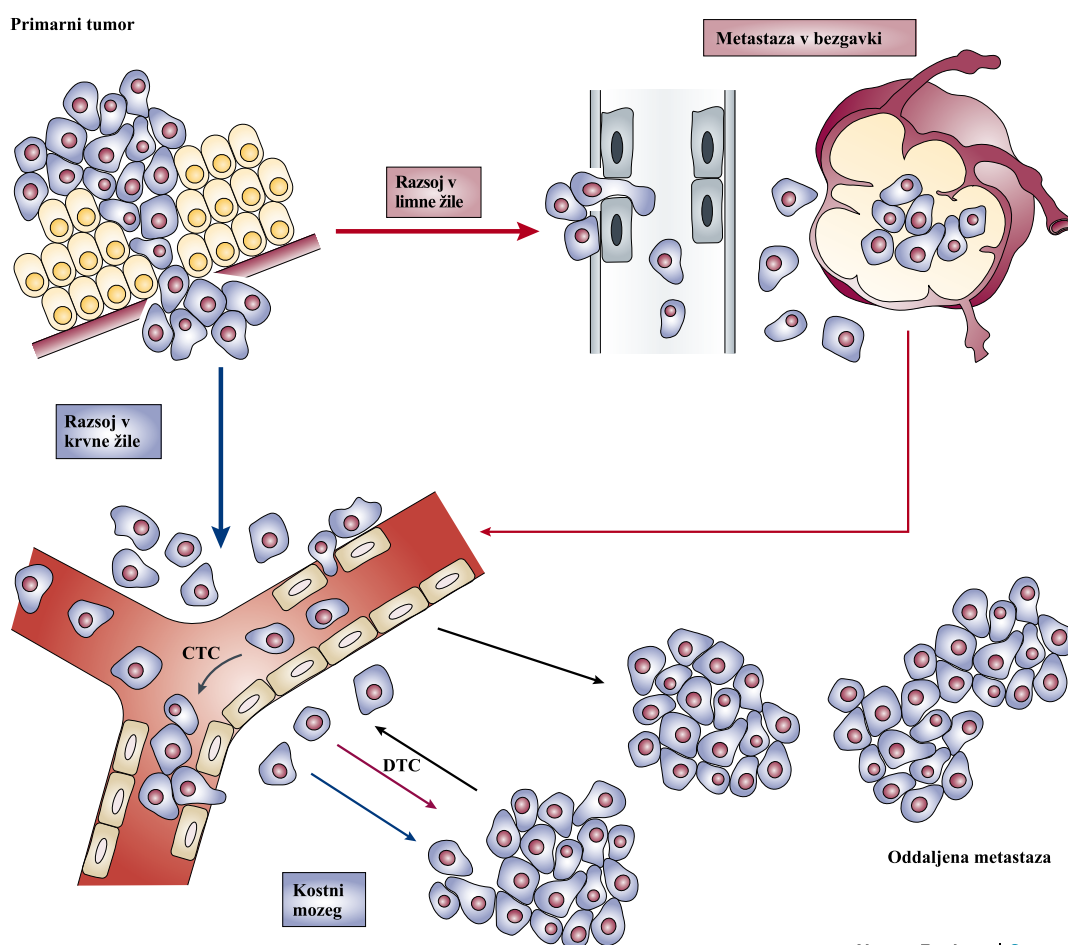
Tanja Marinko, Tamara Lah Turnšek in Gregor Serša

Pojav oddaljenih zasevkov je najpomembnejši vzrok smrti pri bolnicah z rakom dojke. Žal še vedno ne poznamo ključnih dejavnikov, ki povzročijo premik tumorskih celic iz primarnega tumorja in njihovo rast v oddaljenih organih (1). Raziskovanje posameznih tumorskih celic, ki jih najdemo v krvi ali kostnem mozgu bolnikov z rakom, prinaša nova spoznanja o tumorski biologiji ter odpira nove možnosti zdravljenja raka v prihodnosti. Studije so pokazale, da so pri metastatskem raku dojke cirkulirajoče tumorske celice (CTC) kazalec slabše prognoze. Za zgodnji rak dojke je podatkov iz literature nekoliko manj, vendar rezultati raziskav tudi pri zgodnji obliki

raka dojke nakazujejo, da je prisotnost CTC slab prognostični dejavnik (16). Preučevanje in določanje CTC je trenutno še domena kliničnih raziskav in ga v redni klinični praksi še ne uporabljamo.

CIRKULIRAJOČE IN DISEMINIRANE TUMORSKE CELICE

CTC so epiteljske tumorske celice, ki so prisotne v periferni krvi in izvirajo iz primarnega tumorja. Najdemo jih pri različnih rakih, pri benignih tumorjih pa jih v krvi ni. Največ smo o njih izvedeli iz raziskav o diseminiranih tumorskih



Nature Reviews | Cancer

Slika 1. CTC in DTC izvirajo iz primarnega tumorja.
CTC- tumorske celice, ki so prisotne v periferni krvi.
DTC- tumorske celice, ki so prisotne v kostnem mozgu.
(objavljeno z dovoljenjem revije Nature Reviews)

celicah (DTC), ki prav tako izhajajo iz primarnega tumorja in jih proučujejo že dve desetletji. DTC so tumorske celice, ki so prisotne v kostnem mozgu.

DTC IN NJIHOV POMEN PRI RAKU DOJKE

Številne raziskave so pokazale, da ima pri bolnicah s primarnim rakom dojke prisotnost DTC v kostnem mozgu prognostični pomen. Bolnice, pri katerih so ob diagnozi zgodnjega raka dojke (stadij I, II in IIIA) odkrili tudi DTC, imajo pomembno večje tumorje, višjo stopnjo diferenciacije tumorskih celic, pogosteje prizadete pazdušne bezgavke, pozneje pa se pri njih pogosteje pojavijo oddaljeni zasevki. Pri tej skupini bolnic je večja tudi umrljivost zaradi raka dojke (2, 3). Po mnenju raziskovalcev DTC pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke predstavljajo mikro-zasevke primarnega tumorja. Več let lahko mirujejo, ob do sedaj še nepojasnjenih dejavnikih pa se znova začnejo razmnoževati in zrastejo v klinično ugotovljive oddaljene zasevke.

Bolnice z zgodnjim rakom dojke, pri katerih po končanem sistemskem zdravljenju najdemo DTC, so bolj ogrožene za ponovitev bolezni. Bolezen se pri njih hitreje ponovi, pri njih je tudi pomembno večja umrljivost zaradi raka dojke (4, 5). Več raziskav je pokazalo povezavo med DTC in CTC pri primarnem in pri metastatskem raku dojke (6-10). Ker je punkcija kostnega mozga boleč in neprijeten postopek, preiskava pa je tudi slabo ponovljiva, se je raziskovanje bolj usmerilo v CTC, ki so lažje dostopne.

METODE ZA ODKRIVANJE CTC

Koncentracija CTC v periferni krvi je zelo majhna - ena CTC na 10^5 do 10^7 celic (11). Edini sistem za štetje CTC, ki ga je odobrila FDA (Food and Drug Administration, ZDA) je sistem CellSearch. To je imunomagneti sistem, ki uporablja anti-EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) in protitelesa CD45. Test ima visoko ponovljivost, njegova glavna omejitev pa je heterogenost CTC pri ekspresiji EpCAM. CTC nato dokazujemo z molekularnimi tehnikami kot je kvantitativni PCR v realnem času, z mikromrežami in imunokemijskimi metodami, kot je pretočna citometrija (12, 13).

CTC IN ZGODNJE METASTAZIRANJE

Dolgo časa je prevladovalo mnenje, da zasevki raka nastanejo pozno v napredovanju bolezni. Ugotovitve raziskav o CTC oz. DTC pa so to ovrgle in pokazale, da je zasevanje lahko zgodnji dogodek, CTC oz. DTC so namreč odkrili tudi pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke. Prisotnost CTC oz. DTC pri teh bolnicah ni povezana z velikostjo primarnega tumorja (14). Izkazalo se je tudi, da se pri vseh bolnicah, ki imajo ob ugotovljeni diagnozi zgodnjega raka dojke, že prisotne CTC oziroma DTC, klinično zaznavna metastatska bolezen kasneje ne razvije. Meng s sod. (15) poroča, da je pri 36 bolnicah, ki so imele zaradi raka dojke pred 7-22 leti operativno odstranjeno prizadeto dojko, pri 36 % bolnic našel prisotne CTC, ob tem pa so bile bolnice brez znakov klinične bolezni. Braun s sod. (3) pa je ugotovil, da je do klinične ponovitve bolezni prišlo le pri polovici bolnic, pri katerih je 10 let po zdravljenju primarnega raka dojke dokazal DTC. Raziskovalci menijo, da gre v primerih, ko odkrijemo CTC oz. DTC pri bolnicah, ki so po kliničnih merilih brez bolezni, za dormantne oz. speče tumorske celice. Mehanizem prehoda teh tumorskih celic v klinično pomembne zasevke še ni znan. Najverjetneje je pro-

ces odvisen od mikro-okolja mesta zasevanja, gostiteljevega imunskega sistema in genetskih sprememb v samih tumorskih celicah (16).

FENOTIPSKA RAZNOLIKOST MED CTC IN PRIMARNIM TUMORJEM

Več raziskav je pokazalo, da se celice primarnega tumorja in CTC oz. DTC razlikujejo v bioloških lastnostih, še posebno to velja za t.i. tumorski status HER 2, s katerim opredelimo izraženo beljakovino HER 2 (humani epidermalni receptor 2 za rastni faktor) in/ali pomnožitev gena HER 2. Beljakovina HER 2 je čezmerno izražena (gen HER 2 je pomnožen) pri okoli 20 % bolnic z rakom dojke. V nedavno objavljeni študiji, v katero so bile vključene bolnice z metastatskim rakom dojke, so pri 29% bolnic, pri katerih so bile celice primarnega tumorja negativne za HER 2, našli za HER 2 pozitivne CTC, pri 42% bolnic, ki so imele primarni tumor pozitiven za HER 2, pa so v krvi našli CTC, ki so bile negativne za HER 2 (17). Razlike v statusu HER 2 med CTC in celicami primarnega tumorja so opisali tudi pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke (18, 19). Na podlagi najdenih razlik raziskovalci menijo, da je zdravljenje s trastuzumabom, monoklonskim protitelesom proti receptorju HER 2, ki ga v sedanjih kliničnih praksi prejmejo bolnice s tumorjem, ki je pozitiven za HER 2, morda lahko učinkovito tudi pri bolnicah, ki imajo po sedanjih kliničnih merilih bolezen opredeljeno kot negativno za HER 2 (20, 21). Vendar pa zdravljenje s trastuzumabom pri bolnicah, ki so negativne za HER 2, glede na rezultate dosedanjih kliničnih raziskav ne izboljša preživetja niti ne podaljša časa do napredovanja bolezni (21).

CTC IN METASTATSKI RAK DOJKE

Prisotnost CTC pred zdravljenjem metastatskega raka dojke napoveduje krajši čas do napredovanja bolezni in krajše preživetje bolnic (22). Tudi povečana koncentracija CTC glede na izhodiščno vrednost ob uvedbi sistemkega zdravljenja, izmerjena kadarkoli med zdravljenjem, je povezana s krajšim časom do napredovanja bolezni in s krajšim preživetjem (19, 23, 24). Napovedna vrednost CTC je večja, kot jo omogočajo slikovne preiskave, ki jih uporabljamo v klinični praksi (25, 26). Trenutno poteka randomizirana klinična študija faze III (SWOG S0500), v kateri v eni študijski skupini ob ugotovljeni povečani vrednosti CTC glede na izhodiščno vrednost ob uvedbi zdravljenja bolnici z metastatskim rakom dojke zdravljenje spremenijo, v drugi skupini pa ostaja nespremenjeno ne glede na spremembe koncentracije CTC (16).

VPLIV CTC NA PRIMARNI TUMOR

Na mišjem modelu karcinoma dojke so dokazali, da CTC lahko kolonizirajo primarni tumor (tumor self seeding) (27). Primarni tumor izloča različne citokine, ki privlačijo CTC, npr. IL-6 in IL-8. Ko CTC infiltrirajo tumor, izločajo faktorje, ki vplivajo na mikrookolje primarnega tumorja, ter tako vplivajo na rast tumorja, angiogenezo ter infiltracijo z levkociti. Faktorji, ki so vključeni v interakcijo med CTC in primarnim tumorjem, raziskovalcem predstavljajo morebitne tarče za nova zdravila (28).

ZGODNJI RAK DOJKE

Zgodnji rak dojke predstavlja najmanj raziskano področje dosedanjega vedenja o CTC. Objavljena literatura navaja, da je CTC- pozitivnih od 9,4 do 48,6% bolnic z zgodnjim rakom

dojke (16, 18). Krishnamurthy s sod. (29) je prikazal, da je prisotnost CTC in tudi DTC neodvisna od statusa pazdušnih bezgavk, stopnje diferenciacije tumorja, velikosti tumorja ali hormonskega statusa tumorja. Njegove ugotovitve so v nasprotju z rezultati študije SUCCESS, ki poroča o pozitivni korelaciji med statusom pazdušnih bezgavk in CTC (29). Lang s sod. (31) je proučeval CTC in DTC. V svoji študiji je ugotovil povezanost med CTC in statusom HER 2 primarnega tumorja. V nasprotju z ugotovitvami prejšnjih raziskav pa niti Krishnamurthy ne Lang nista našla povezanosti med prisotnostjo DTC in CTC (31).

Več raziskav, ki so proučevale zgodnjega raka dojke, je pokazalo, da je prisotnost CTC povezana s slabšo prognozo. Wulfing s sod. (32) je prikazal, da je prisotnost CTC, pozitivnih za HER 2, povezana z značilno krajšim časom do ponovitve bolezni in slabšim preživetjem.

SPREMLJANJE ZDRAVLJENJA S POMOČJO CTC

Želja raziskovalcev je, da bi CTC nekoč lahko uporabljali kot kazalce napredovanja bolezni in odgovora na zdravljenje. Žal večina raziskav zgodnjega raka dojke ne pokaže povezanosti med odgovorom CTC in odgovorom tumorja na zdravljenje. Raziskava GeparQuattro je primerjala število CTC pred začetkom predoperativnega zdravljenja in tik pred operacijo pri 213 bolnicah z operabilnim lokalno napredovalim rakom dojke. Predoperativno zdravljenje je vključevalo trastuzumab, če je bil tumor pozitiven za HER 2, vse bolnice pa so prejele predoperativno kemoterapijo. Incidenca CTC se z 21,6% pred zdravljenjem zmanjšala na 10,6% po zdravljenju. Od bolnic, ki so bile pred zdravljenjem CTC-pozitivne, jih je po zdravljenju 15% postalo CTC-negativnih, nasprotno pa je 8,3 % ob diagnozi CTC-negativnih bolnic po zdravljenju postalo CTC-pozitivnih. Med kliničnim oz. slikovnim odgovorom primarnega tumorja na predoperativno zdravljenje in koncentracijo CTC niso našli značilne povezanosti (18), kar so ugotovili tudi v drugih raziskavah.

Več raziskav pa je nedvomno pokazalo, da prisotnost CTC napoveduje zgodnjo ponovitev bolezni. Študija SUCCESS, v katero so vključili 1489 bolnic z nemetastatskim rakom dojke in CTC določali s sistemom CellSearch, je pokazala, da imajo bolnice, pri katerih so pred zdravljenjem ugotovili CTC, krajši čas do napredovanja bolezni in slabše preživetje. Pri bolnicah, ki so imele prisotne CTC po končanem zdravljenju, se je bolezen ponovila prej, vpliv na preživetje pa ni bil več značilen (30). Podobne rezultate je prikazala tudi že prej omenjena raziskava Piergea s sodelavci (33). Ugotovili so, da je koncentracija CTC pred začetkom predoperativnega sistemskega zdravljenja boljši napovedni dejavnik preživetja in časa do pojava oddaljenih zasevkov kot pa koncentracija CTC po končanem sistemskega zdravljenju.

Več raziskav je spremljalo tudi CTC med dopolnilnim hormonskim zdravljenjem. Pachmann s sod. (34) je prikazal, da je naraščajoče število CTC med zdravljenjem s tamoxifenom zelo pomemben napovedni dejavnik ponovitve bolezni. Enako se je izkazalo tudi za zdravljenje z zaviralci aromataze (16).

ZAKLJUČEK

Dosedanje raziskave so pokazale, da imajo CTC prognostični pomen tako pri zgodnjem, kot pri metastatskem raku dojke. Pri bolnicah z zgodnjim rakom dojke lahko s pomočjo CTC

odkrijemo tiste bolnice, ki so bolj ogrožene za ponovitev bolezni in bi morda imele dobrobit od dodatnega zdravljenja. Tako pri zgodnjem kot pri metastatskem raku dojke pa CTC predstavljajo lahko dostopno pot za spremljanje učinkovitosti zdravljenja, ki ga bolnica prejema. Čeprav rezultatov študije SWOG še nimamo, raziskovalci menijo, da bi s spremljanjem CTC med zdravljenjem lahko prej ugotovili napredovanje bolezni in zdravljenje prej, kot je sedaj v klinični praksi, tudi ustrezno spremenili. Z molekularno in genetsko karakterizacijo CTC pa bi pri kemorezistentni bolezni morda v prihodnosti lahko določili tudi najprimernejšo shemo citostatskega zdravljenja.

V tumorski biologiji so CTC, ki jih najdemo pri zgodnjem raku dojke, dokaz, ki govori v prid teoriji zgodnjega zasevanja. Žal še vedno nimamo odgovora na vprašanje, kdaj natančno v procesu kancerogeneze pride do zasevanja tumorskih celic. V teku so študije, ki proučujejo morebitne CTC pri neinvazivnem raku dojke (DCIS), ki po sedanjem prepričanju ne zaseva. Vemo tudi, da vse CTC ne ustvarijo metastatskih depozitov. Raziskovalci predvidevajo, da se morajo najprej nekako ustvariti metastatske niše v sekundarnem organu, šele nato lahko začne nastajati zasevek. Z vidika biologije je pomembno tudi to, da se lahko CTC celo pri zgodnjem raku dojke precej razlikujejo od primarnega tumorja. Klinično se zdi najpomembnejša razlika v statusu HER 2. S tarčnim zdravljenjem, usmerjenim proti CTC oz. DTC, bi nekoč morda lahko preprečili nastanek metastatskih depozitov. S cepivom proti HER 2 in drugim pomembnim molekularnim potem pri raku dojke, ki bi delovalo na TC, pa bi teoretično lahko zmanjšali verjetnost zasevanja CTC (CTC seeding), s tem pa tudi lokalne ponovitve bolezni oz. nastanka oddaljenih zasevkov (16). Ne nazadnje je problem tudi v diagnostiki CTC z metodo CellSearch, ki temelji na predpostavki, da te celice izražajo EpCam. Nedavno se pojavljajo dvomi, ali so CTC res homogena populacija. Predvidevajo možnost, da so CTC lahko tudi migrirajoče tumorske matične celice, za katere vemo, da imajo zmanjšano izražanje celičnih adhezivnih beljakovin, kot je EpCam, zato jih ne zajamemo z metodo določanja števila CTC.

LITERATURA:

1. Riethdorf S, Pantel K. Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and Circulating Tumor Cells in Blood of Breast Cancer Patients: Current State of Detection and Characterization. *Pathobiology* 2008; 75: 140–148.
2. S. Braun, K. Pantel, P. Muller et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2000; 342: 525–533.
3. S. Braun, F. D. Vogl, B. Naume et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2005, 353: 793–802.
4. W. Janni, B. Rack, C. Schindlbeck et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005; 103: 884–891.
5. G. Wiedswang, E. Borgen, R. Karesen et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 5342–5348.
6. J. Y. Pierga, C. Bonneton, A. Vincent-Salomon et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow

- of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 1392–1400.
7. V. Muller, N. Stahmann, S. Riethdorf et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 3678–3685.
 8. G. Wiedswang, E. Borgen, C. Schirmer et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *International Journal of Cancer* 2006; 118: 2013–2019.
 9. A. Daskalaki, S. Agelaki, M. Perraki et al. Detection of cytokine-*ratin-19* mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *British Journal of Cancer* 2009; 101: 589–597.
 10. M. J. Slade, R. Payne, S. Riethdorf et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. *British Journal of Cancer* 2009; 100: 160–166.
 11. M. Alunni-Fabbroni and M. T. Sandri. Circulating tumour cells in clinical practice: methods of detection and possible Characterization. *Methods* 2010; 50: 289–297.
 12. W. J. Allard, J. Matera, M. C. Miller et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 6897–6904.
 13. S. Riethdorf, H. Fritsche, V. Muller et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system. *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 920–928.
 14. Y. Husemann, J. B. Geigl, F. Schubert et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 58–68.
 15. S. Meng, D. Tripathy, E. P. Frenkel et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 8152–8162.
 16. H. Graves, B.J. Czerniecki. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: An Evolving Role in Patient Prognosis and Disease Progression. *Pathology Research International* 2011; ID 621090, doi:10.4061/2011/621090.
 17. M. Pestrin, S. Bessi, F. Galardi et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009; 118: 523–530.
 18. S. Riethdorf, V. Muller, L. Zhang et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant Gepar-Quattro trial. *Clinical Cancer Research* 2010; 16: 2634–2645.
 19. E. F. Solomayer, S. Becker, G. Pergola-Becker et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006; 98: 179–184.
 20. S. Paik, C. Kim, J. Jeong et al. Benefit from adjuvant trastuzumab may not be confined to patients with IHC3+ and/or FISH-positive tumors: central testing results from NSABP B-31. *Journal of Clinical Oncology*, 2007; 25 (18S), abstract 511.
 21. A. D. Seidman, D. Berry, C. Cirincione et al. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of cancer and leukemia group B protocol 9840. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 1642–1649.
 22. M. Cristofanilli, G. T. Budd, M. J. Ellis et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2004; 351: 781–791.
 23. M. Tewes, B. Aktas, A. Welt et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009; 115: 581–590.
 24. D. F. Hayes, M. Cristofanilli, G. T. Budd et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 4218–4224.
 25. M. Cristofanilli, K. R. Broglio, V. Guarneri et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clinical Breast Cancer* 2007; 7: 471–479.
 26. F. C. Bidard, A. Vincent-Salomon, B. Sigal-Zafrani et al. Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Annals of Oncology* 2008; 19: 496–500.
 27. Norton L, Massagué J. Is cancer a disease of self-seeding? *Nat Med.* 2006; 12 (8): 875–878.
 28. M. Y. Kim, T. Oskarsson, S. Acharyya et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009; 139: 1315–1326.
 29. S. Krishnamurthy, M. Cristofanilli, B. Singh et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer* 2010; 116: 3330–3337.
 30. B. K. Rack et al. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: the SUCCESS trial. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28 (supplement 15): 1003.
 31. J. E. Lang, K. Mosalpuria, M. Cristofanilli et al. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009; 113: 501–507.
 32. P. Wulfing, J. Borchard, H. Buerger et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 1715–1720.
 33. J. Y. Pierga, F. C. Bidard, C. Mathiot 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. *Clinical Cancer Research* 2008; 14: 7004–7010.
 34. Pachmann K, Camara O, Kohlhase A et al. Assessing the efficacy of targeted therapy using circulating epithelial tumor cells (CETC): the example of SERM therapy monitoring as a unique tool to individualize therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 821–8.