

# Detekcja rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej

Detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients with a new molecular method

Banyś Małgorzata<sup>1,2\*</sup>, Krawczyk Natalia<sup>1\*</sup>, Becker Sven<sup>1</sup>, Becker-Pergola Graziella<sup>1</sup>, Banyś Jerzy<sup>3</sup>, Krawczyk Zbigniew<sup>4</sup>, Wallwiener Diethelm<sup>1</sup>, Fehm Tanja<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany

<sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Marienkrankenhaus Hamburg, Hamburg, Germany

<sup>3</sup> NZOZ Strzelińskie Centrum Medyczne, Strzelin, Polska

<sup>4</sup> I Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu, Wrocław, Polska

\* both authors contributed equally to this publication / obie autorki przyczyniły się w jednakowym stopniu do powstania tej publikacji

## Streszczenie

**Cel pracy:** Liczne badania pokazały, że obecność rozsianych komórek nowotworowych (RKN) w szpiku kostnym u pacjentek chorych na raka piersi związana jest z niekorzystnym rokowaniem. Metodą standardową w oznaczaniu RKN jest immunocytochemia (ICC). Metody molekularne, takie jak RT-PCR, są również dostępne, dotychczas jednak nie są one stosowane rutynowo w detekcji RKN. Celem pracy była ewaluacja nowej metody molekularnej do oznaczania RKN.

**Materiał i metody:** Zbadane zostały aspiraty szpiku kostnego pochodzące od 405 pacjentek z rakiem piersi. Połowę pobranego szpiku badano immunocytochemicznie, drugą połowę - nową metodą molekularną opartą na technologii RT-PCR. Immunocytochemię przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Niemieckiego, Austriackiego i Szwajcarskiego Towarzystwa Chorób Piersi oraz grupy ISHAGE (przeciwciała A45B-B3). RT-PCR przeprowadzono w konwencji One-step, amplifikacja mRNA cytokeratyny 19 rejestrowana była w czasie rzeczywistym („real-time”).

**Wyniki:** W 142 z 405 (35%) pobranych szpików wykryto rozsiane komórki nowotworowe metodą RT-PCR. U 34% pacjentek wykryto RKN immunocytochemicznie. 48% aspiratów było pozytywnych przy użyciu przynajmniej jednej z metod. W 73% przypadków uzyskano ten sam wynik przy pomocy obu metod ( $p < 0,001$ ).

**Wnioski:** Prezentowana w tej pracy nowa metoda molekularna do detekcji rozsianych komórek rakowych, a tym samym choroby resztkowej u pacjentek z rakiem piersi, jest czuła, szybka i z uwagi na powtarzalność wyników może zastąpić / uzupełnić dotychczasowe metody.

Słowa kluczowe: rak piersi / rozsiane komórki nowotworowe / immunocytochemia / RT-PCR / cytokeratyna /

## Corresponding author:

Małgorzata Banyś  
Department of Obstetrics and Gynecology University of Tuebingen  
Calwerstrasse 7, 72076 Tuebingen, Germany  
Phone: +49-176-23505735  
Fax: +49-7071-294663  
E-mail: [maggiebanyś@yahoo.de](mailto:maggiebanyś@yahoo.de)

Otrzymano: 12.01.2012  
Zaakceptowano do druku: 11.06.2012

Baryś M, et al. *Detekcja rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej.***Abstract**

**Objectives:** Numerous studies have shown that the presence of clinically occult disseminated tumor cells (DTC) in the bone marrow (BM) of breast cancer patients is associated with an unfavourable clinical outcome. Immunocytochemistry (ICC) remains the gold standard for their detection. Assays based on RT-PCR are available; however, so far they have not been used for routine detection of DTC. Therefore, the purpose of this study was to evaluate a newly established molecular method for the detection of DTC.

**Materials and methods:** BM aspirates from 405 patients were examined. Half of the samples were immediately inserted into ICC and the other half was examined with our newly established molecular method based on RT-PCR. Immunocytochemistry was performed according to the Consensus Recommendations of the German, Austrian, and Swiss Societies of Senology and ISHAGE Working Group (A45B-B3 antibody). RT-PCR was conducted as a one-step real-time assay. Cytokeratin 19-mRNA was amplified.

**Results:** In 142 of 405 (35%) aspirates disseminated tumor cells were detected by RT-PCR. In 34% of patients DTC were detected by ICC. 48% of the BM samples were positive by at least one method. In 73% of the patients identical results were obtained ( $p < 0,001$ ).

**Conclusion:** Our newly established molecular assay for the detection of disseminated tumor cells, and thus minimal residual disease, is sensitive, fast and reproducible, and has a potential to be used as a confirmatory or alternative test for DTC detection.

Key words: **breast cancer / disseminated tumor cells / immunocytochemistry / RT-PCR / cytokeratin /**

**Skróty/Abbreviations**

SK	szpik kostny ( <i>bone marrow – BM</i> )
CK	cytokeratyna ( <i>cytokeratin</i> )
RKN	rozsiane komórki nowotworowe ( <i>disseminated tumor cells – DTC</i> )
ICC	immunocytochemia ( <i>immunocytochemistry</i> )
ISHAGE	<i>International Society for Hematotherapy and Graft Engineering</i>
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy z użyciem odwrotnej transkryptazy ( <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )

**Wstęp**

Rozsiane komórki nowotworowe (RKN) w szpiku kostnym (SK) wykrywane są u ok. 20-40% pacjentek z pierwotnym rakiem piersi i związane są z gorszym rokowaniem [1-3]. Coraz więcej badań sugeruje, iż fenomen przenikania pojedynczych komórek rakowych do obiegu krwi i ich pozostawania w szpiku nie ogranicza się do raka piersi, a obserwowany jest w innych guzach litych, takich jak rak prostaty, okrężnicy i nowotworach ginekologicznych [4-9]. „Złotym standardem” w oznaczaniu RKN jest immunocytochemia (ICC). Metody molekularne, takie jak RT-PCR, również znajdują zastosowanie, jednak jak dotąd nie zostały wprowadzone do rutynowej diagnostyki klinicznej.

Immunocytochemia jest jedyną jak dotąd metodą stosowaną w detekcji RKN, której kliniczne znaczenie zostało potwierdzone w badaniach prognostycznych z długim okresem *follow-up*. Opublikowana w roku 2005 przez Brauna i wsp. metaanaliza pokazała na grupie ponad 4700 pacjentek statystycznie istotny wpływ obecności komórek rozsianych w szpiku kostnym na przeżycie [1]. Daleko posunięta standaryzacja immunocytochemii to zasługa m.in. ujednoliconych rekomendacji towarzystwa ISHAGE oraz „Konsensus-Meeting” Niemieckiego, Szwajcarskiego oraz Austriackiego Towarzystwa Raka Piersi [10, 11].

Nasza grupa badawcza opracowała protokół oparty na metodzie RT-PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym („*real-time*”). Protokół został zoptymalizowany w celu implementacji w rutynowej diagnostyce w laboratorium klinicznym Uniwersyteckiej Kliniki Ginekologii i Położnictwa w Tybindze.

**Materiał i metody**

Po otrzymaniu zgody poinformowanej aspiraty szpiku kostnego zostały pobrane śródoperacyjnie od 405 pacjentek chorych na raka piersi, leczonych w certyfikowanym Centrum Chorób Piersi przy Uniwersyteckiej Klinice Ginekologii i Położnictwa w Tybindze w okresie między styczniem 2003 i lipcem 2006. Protokół badania został zaakceptowany przez komisję etyki Uniwersytetu w Tybindze. W badaniu wzięły również udział pacjentki z rakiem piersi w wywiadzie, u których przeprowadzona została repunkcja SK w ramach badania „*Follow-up*”. W znieczuleniu ogólnym lub miejscowym aspirowano 10-20ml SK z talerza biodrowego do probówek zawierających heparynę, stosując technikę Jamshidi [12]. W ciągu 30 min. po dotarciu do laboratorium aspiraty dzielone były na dwie próby i opracowywane. W jednej połowie pobranego SK komórki rakowe oznaczane były metodą immunocytochemiczną, w drugiej zaś – za pomocą nowej metody molekularnej (RT-PCR).

**Immunocytochemia**

Izolacja i detekcja komórek nowotworowych oparte były na międzynarodowych zaleceniach dotyczących wykrywania RKN [10]. Aspiraty SK poddano wirowaniu w gradiencie gęstości przy użyciu Ficoll-Hypaque (gęstość 1,077g/ml, Biochrom, Niemcy). Komórki jednojądrzaste zbierane zostały z warstwy interfazowej i zwirowane na szkiełko mikroskopowe (centryfuga Hettich, Niemcy) ( $10^6$ MNC /spot). Do oznaczania komórek cytokeratyno(CK)-pozytywnych, preparaty były utrwalane w 4% obojętnej zbuforowanej formalinie przez 10min., a następnie płukane w odczynniku PBS. Zautomatyzowane barwienie przeprowadzano na aparacie DAKO Autostainer przy pomocy przeciwciała monoklonalnego A45-B/B3 (Micromet, Niemcy) i zestawu diagnostycznego DAKO-APAAP (DakoCytomation, Dania) zgodnie z zaleceniami producenta. Przeciwciała A45-B/B3 skierowane jest przeciw epitopom cytokeratyny, takim jak heterodimery 8/18 i 8/19. Linia komórek ludzkiego raka piersi MCF-7 posłużyła jako kontrola pozytywna. Leukocyty zdrowych dawców użyte zostały jako kontrola negatywna. Na każdego pacjenta przeanalizowane zostało  $3 \times 10^6$  komórek jednojądrzastych

Banyś M, et al. Detekcja rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej.

na dwóch szkiełkach mikroskopowych. Analizy dokonano na Automated Cellular Imaging System (ACIS, ChromaVision Medical Systems, San Juan, Capistrano, USA). Szczegółowe informacje dotyczące tego systemu diagnostycznego znaleźć można w innej publikacji [13]. Kryteria morfologiczne do oznaczania RKN oparto na rekomendacjach Europejskiej Grupy Badawczej ISHAGE oraz zaleceniach dot. ustandaryzowanej diagnostyki rozsianych komórek nowotworowych [11, 10].

### RT-PCR

Natychmiast po otrzymaniu aspiratu, do szpiku kostnego dodawano 50ml odczynnika RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy), który powoduje lizę komórek i stabilizuje kwasy nukleinowe za pomocą tiocyjanianu guanidyny. Następnie próby zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po zebraniu 5-10 aspiratów próby były rozmrażane i opracowywane równocześnie. mRNA ekstrahowano przy pomocy mRNA Isolation Kit for Blood and BM (Roche Diagnostics), którego działanie opiera się na technologii szklanych cząstek magnetycznych. System ten pozwala uzyskać oczyszczone mRNA podczas dwustopniowej procedury puryfikującej. Izolację mRNA przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta. W końcowym etapie uzyskane mRNA rozcieńczano w 10 $\mu\text{l}$  wody DEPC. Po zakończeniu etapu izolacji mRNA rozpoczynano jednostopniową (*one-step*) procedurę RT-PCR w systemie LightCycler<sup>®</sup>. Amplifikowano fragment genu syntezującego CK19 przy pomocy RNAMaster Hybridization Probes Kit (Roche Diagnostics). Uzyskiwano produkt amplifikacji o długości 309 par zasadowych. 5  $\mu\text{l}$  mRNA poddawano RT-PCR w mieszaninie o stężeniu 3 mM Mn[OAc]<sub>2</sub>, do której dodawano 0,5 $\mu\text{M}$  każdego z primerów (primer A: AGATCCTGAGTGACATGCGAA; primer B: CCCAGCTGGGCTTCAATAC) oraz 0.125  $\mu\text{M}$  każdej sondy (sonda A: CCCTTCAGGGGTCTTGAGATGAGC<sub>x</sub>, sonda B: LCRedGCAGTCACAGCTGA-GCATGAAAGC<sub>p</sub>).

Primery oraz sondy były specyficzne dla genu CK19 oraz zostały zaprojektowane w taki sposób, aby uniknąć amplifikacji opisanego w literaturze pseudogenu CK19 14 (Tibmolbiol, Niemcy). Fazę odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w temperaturze  $60^{\circ}\text{C}$  w czasie 20 min., a następnie rozpoczynano reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) (Hotstart w temp.  $95^{\circ}\text{C}$  przez 30 sekund i 50 cykli:  $95^{\circ}\text{C}$  przez 1 sek.,  $55^{\circ}\text{C}$  przez 15 sek.,  $72^{\circ}\text{C}$  przez 13 sek.). Produkty PCR analizowano przy pomocy metody *Fit Points* dostępnej w oprogramowaniu LightCycler<sup>®</sup>. Specyficzność sprawdzano dołączając do prób kontrolę negatywną w postaci mRNA wyizolowanego z krwi zdrowego dawcy. Dodatkowo opracowywano próbę o zawartości wody destylowanej, aby wykluczyć potencjalne zanieczyszczenie odczynników oraz sprzętu. Do każdej transzy dołączano jedną kontrolę pozytywną z komórek linii MCF-7 w 5ml krwi od zdrowego dawcy.

Dane opracowywano posługując się oprogramowaniem LC 3.5 *Fit Points*. Wyniki porównywane były z wyznaczoną uprzednio krzywą standardową. Granicą wykrywalności było 5 komórek linii MCF-7 dodanych do 3 x 10<sup>6</sup> komórek jednojądrzastych. Gen referencyjny (*house-keeping*) GAPDH amplifikowano wraz ze specyficznymi primerami w celu sprawdzenia integralności RNA.

### Statystyka

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy pomocy programu SPSS (Version 16). Test Chi-kwadrat został użyty do

określenia związku pomiędzy obecnością RKN w szpiku kostnym a czynnikami kliniczno-patologicznymi. Wartości *p* poniżej 0,05 uznano za istotne statystycznie.

## Wyniki

### Charakterystyka badanych grup pacjentek

405 pacjentek zostało włączonych do badania. Szpik kostny został pobrany śródoperacyjnie od 331 pacjentek z pierwotnym nieprzerzutowym rakiem piersi, z czego 29 pacjentek znajdowało się po chemioterapii neoadjuwantowej. Kolejnych 19 szpików pobrano od pacjentek ze wznową lub przerzutami. Punkcję SK przeprowadzono również u 55 pacjentek z rakiem piersi w wywiadzie, bez objawów nawrotu choroby bądź zmian przerzutowych. W tabeli I przedstawiono wyniki badania zarówno immunocytochemicznego, jak i RT-PCR, wśród poszczególnych grup pacjentek.

### Analiza immunocytochemiczna

W 34% aspiratów wykryte zostały komórki nowotworowe. Rycina 1 przedstawia typowo zabarwioną komórkę nowotworową ze szpiku kostnego. Ilość CK-pozytywnych komórek sięgała od 1 do 8 (średnia 2,17; odchylenie standardowe 0,11). Najwięcej wyników pozytywnych obserwowano w grupie pacjentek ze wznową / przerzutami (58%), najmniej – u asymptomatycznych pacjentek z rakiem piersi w wywiadzie (20%).

### Analiza metodą RT-PCR

U 142 z 405 (35%) pacjentek wykryto RKN za pomocą RT-PCR. Rycina 2 pokazuje przykładowy przebieg analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym (*real-time*). U 48% pacjentek po zakończonej terapii neoadjuwantowej badanie RT-PCR dało wynik pozytywny, jak również u 42% pacjentek ze wznową lub przerzutami oraz 37% pacjentek z pierwotnym rakiem piersi, u których pierwszym etapem leczenia była operacja. Najmniej wyników pozytywnych zaobserwowano w grupie pacjentek po przebytych raku piersi bez objawów nawrotu choroby (15%).

### Porównanie immunocytochemii i RT-PCR

405 aspiratów zostało zbadanych przy pomocy obydwu metod. 48% aspiratów dało wynik pozytywny przy użyciu przynajmniej jednej z nich. W 294 przypadkach (73%) uzyskano taki sam wynik ( $p < 0,001$ , test chi-kwadrat; tabela II). W przypadku 111 aspiratów przeprowadzone badanie dały odmienne rezultaty. Częstość wyników pozytywnych wynosiła: RT-PCR – 35%, natomiast ICC – 34%. 196 z 405 (48%) szpików było pozytywnych za pomocą przynajmniej jednej z dwóch metod.

### Rozsiane komórki nowotworowe a uznane czynniki kliniczno-patologiczne

Na grupie 302 nieleczonych neoadjuwantowo pacjentek z pierwotnym rakiem piersi przeprowadzono dalszą analizę statystyczną. W grupie tej badanie immunocytochemiczne wykazało 33% wyników pozytywnych, natomiast przy pomocy RT-PCR uzyskano wynik pozytywny w 37% przypadków. Tabela III przedstawia częstość występowania RKN (zarówno w ICC, jak i RT-PCR) w zależności od czynników kliniczno-patologicznych, takich jak lokalizacja guza, stadium TNM, stopień zróżnicowania (*grading*), typ histologiczny, lymphangiosis carcinomatosa, stan receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz HER2. Dla żadnego z tych czynników nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji, niezależnie od zastosowanej metody.

Baryś M, et al. *Detekcja rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej.***Porównanie obu metod pod względem możliwości ich zastosowania w pracy laboratorium onkologicznego**

W ramach badania przetestowana została nowa metoda molekularna oparta na RT-PCR. Szczególną uwagę zwrócono na następujące aspekty: czułość, specyficzność, powtarzalność wyników, czas trwania, koszty oraz obciążenie personelu. Zarówno immunocytochemia, jak i RT-PCR wykazywały podobną czułość, jak i specyficzność. Czas ręcznego opracowywania był podobny, jednak czas oczekiwania na wynik był istotnie dłuższy dla immunocytochemii (5 godzin vs. 2 dni). Różnica ta wynika z konieczności pozostawienia szkiełek mikroskopowych do wysuszenia i wznowienia obróbki następnego dnia. Koszt opracowania jednego szpiku kostnego był niższy w przypadku immunocytochemii (13 euro vs. 35 euro), analiza ta nie zawiera jednak kosztów personelu. W przypadku RT-PCR nie jest konieczna natychmiastowa obróbka aspiratu, co pozwala na przechowywanie próbek do czasu zgromadzenia materiału od większej liczby pacjentek (*batching*). W ten sposób zmniejszone zostaje obciążenie personelu. Tabela IV przedstawia porównanie obu metod pod względem najważniejszych aspektów.

Hematogeny rozsiew komórek guza pierwotnego jest ważnym krokiem w kaskadzie przerzutowej. Mimo wolnych od przerzutów węzłów chłonnych i bezpiecznego marginesu resekcji (R0), u ok. 30% pacjentek z pierwotnym rakiem piersi zdiagnozowane zostaną przerzuty odległe bądź wznowa w przebiegu choroby. W ciągu ostatnich dwóch dekad określono szereg nowych czynników rokowniczych w pierwotnym raku piersi. Wielu badaczy wykazało, iż obecność rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym istotnie pogarsza rokowanie pacjentek [1, 15]. W literaturze anglojęzycznej fenomen rozsiewu pojedynczych komórek guza do krwiobiegu przyjęło się określać jako *tumor cell dissemination*, a same komórki nabłonkowe jako *disseminated tumor cells* (rozsiane komórki guza) bądź *disseminated epithelial cells* (rozsiane komórki nabłonkowe). W istocie, ze względu na brak specyficznych markerów rakowych, zdecydowana większość metod diagnostycznych opiera się na detekcji antygenów epitelialnych. Obecnie standardem w wykrywaniu rozsianych komórek nowotworowych jest oznaczanie cytokeratyny za pomocą immunocytochemii. Istnieją prace udowadniające złośliwy charakter wykrywanych komórek również na poziomie molekularnym [16].

W ostatnim czasie obserwuje się dynamiczny rozwój metod molekularnych, które w sposób czuły i wysoce swoisty wspierają, a niejednokrotnie zastępują, dotychczasowe metody diagnostyczne. Różne protokoły oparte na technologii RT-PCR znajdują zastosowanie w wykrywaniu minimalnej choroby resztkowej (*minimal residual disease*) w raku piersi. Jednoznaczna analiza porównawcza tych procedur utrudniają znaczne różnice metodyczne. Dodatkowo wiele metod opiera się na niezwykle wymagających i czasochłonnych protokołach, których implementacja w rutynowej pracy laboratoryjnej wydaje się niemożliwa. Celem naszego badania było zatem opracowanie i wdrożenie powtarzalnej oraz szybkiej metody o wysokiej czułości i swoistości.

**Wybór odpowiedniego markera**

W ostatnich latach zaproponowane zostały liczne protokoły molekularnej diagnostyki rozsianych komórek rakowych. Podobnie jak w przypadku immunocytochemii, większość metod wykorzystuje fakt, iż komórki pochodzące z raka piersi są zdefiniowane komórkami nabłonkowymi i ekspresują markery epitelialne, takie jak cytokeratyny, EGFR oraz EpCAM [17, 18].

Dodatkowo część autorów stosuje markery specyficzne tkankowo, takie jak mammoglobina, jednakże ich swoistość pozostaje kontrowersyjna [19, 20]. Istnieją również doniesienia o wpływie białek ostrej fazy na poziom mammoglobiny oraz markera CEA [21, 22].

Wśród cytokeratyn do najlepiej przebadanych należy cytokeratyna 19 [23-26]. Jej zaletą jest wysoka i stała swoistość ekspresji [27]. Mniej specyficzne cytokeratyny 8, 18 i 20 wykrywane są również w tkankach pozanabłonkowych, co może prowadzić do fałszywie dodatnich wyników [28-30, 22, 31]. Czułość RT-PCR dla mRNA cytokeratyny 19 oceniana jest w literaturze na 1-10 komórek / 10<sup>6</sup> MNC [32, 33, 34, 35].

**Preselekcja komórek**

W celu zwiększenia czułości detekcji RKN w SK część grup badawczych korzysta z procesów pozytywnej bądź negatywnej preselekcji, jak i wirowania w gradiencie gęstości. Metody te pozwalają na odseparowanie komórek zbędnych od frakcji potencjalnych komórek rakowych i są z powodzeniem stosowane w kombinacji z immunocytochemią. Jednakże w przeciwieństwie do stabilnego białka w przypadku immunocytochemii, RT-PCR bazuje na niestabilnym mRNA, a głównym ograniczeniem

**Tabela I.** Wynik badania immunocytochemicznego oraz RT-PCR w poszczególnych grupach pacjentek.

Liczba pacjentek	N	Wyniki pozytywne w immunocytochemii		Wyniki pozytywne w RT-PCR	
		n	%	n	%
Pierwotny rak piersi	331	117	35%	126	38%
Pierwotnie operacyjny rak piersi	302	101	33%	112	37%
Stadium I	207	71	34%	76	37%
Stadium II	50	13	26%	19	38%
Stadium III	33	14	42%	13	40%
Stadium IV	12	3	25%	4	33%
Po terapii neoadjuwantowej	29	16	55%	14	48%
Wznowa / Rak przerzutowy	19	11	58%	8	42%
Punkcja kontrolna	55	11	20%	8	15%
<b>Wszystkie pacjentki</b>	<b>405</b>	<b>139</b>	<b>34%</b>	<b>142</b>	<b>35%</b>

Banyś M, et al. Detekcja rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej.

Tabela II. Korelacja wyników immunocytochemii oraz RT-PCR w grupie 405 pacjentek.

	Immunocytochemia – wynik pozytywny	Immunocytochemia – wynik negatywny	Wszystkie pacjentki
RT-PCR wynik pozytywny	85 (21%)	57 (14%)	142 (35%)
RT-PCR wynik negatywny	54 (13%)	209 (52%)	263 (65%)
<b>Wszystkie pacjentki</b>	<b>139 (34%)</b>	<b>266 (66%)</b>	<b>405 (100%)</b>

Tabela III. Korelacja wyników immunocytochemii oraz RT-PCR z czynnikami kliniczno-histologicznymi guza w grupie 302 pacjentek z pierwotnym rakiem piersi.

Cecha	N	Wyniki pozytywne w ICC			Wyniki pozytywne w RT-PCR		
		n	%	wartość p	n	%	wartość p
<b>Wszystkie pacjentki</b>	302	101	33%		112	37%	
<b>Lokalizacja guza</b>				n.s.			n.s.
Prawa pierś	149	50	34%		55	37%	
Lewa pierś	141	49	35%		51	36%	
Rak bilateralny	12	2	17%		6	50%	
<b>Stopień zróżnicowania</b>				n.s.			n.s.
G1	24	4	17%		7	29%	
G2	226	79	35%		82	36%	
G3	36	16	44%		17	47%	
<b>Typ histopatologiczny</b>				n.s.			n.s.
Przewodowy inwazyjny	175	59	34%		66	38%	
Zrądkowy inwazyjny	54	18	33%		21	39%	
Przewodowo-zrądkowy	34	13	38%		11	32%	
Inne	26	10	39%		10	39%	
<b>Stadium</b>				n.s.			n.s.
I	207	71	34%		76	37%	
II	50	13	26%		19	38%	
III-IV	45	17	38%		17	38%	
<b>Wielkość guza</b>				n.s.			n.s.
T1	208	67	32%		77	37%	
T2	84	29	35%		30	36%	
T3	8	5	63%		5	63%	
T4	2	0	0%		0	0%	
<b>Przerzuty w węzłach chłonnych</b>				n.s.			n.s.
Nie (N0)	219	71	32%		80	37%	
Tak	83	30	36%		32	39%	
<b>Przerzuty odległe</b>				n.s.			n.s.
M0	290	98	34%		108	37%	
M1	12	3	25%		4	33%	
<b>Lymphangiosis carcinomatosa</b>				n.s.			n.s.
L0	263	89	34%		98	37%	
L1	22	9	41%		8	36%	
<b>Receptor estrogenowy</b>				n.s.			n.s.
Negatywny	50	16	32%		19	38%	
Pozytywny	234	81	35%		88	38%	
<b>Receptor progesteronowy</b>				n.s.			n.s.
Negatywny	93	36	39%		29	31%	
Pozytywny	189	60	32%		78	41%	
<b>Receptor Her-2/neu</b>				n.s.			n.s.
Negatywny	237	83	35%		86	36%	
Pozytywny	36	9	25%		16	44%	

Baryś M, et al. Detekcja rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej.

w jego izolacji jest powszechna w ludzkim organizmie obecność rybonukleazy. Zbyt długi odstęp czasu pomiędzy pobraniem szpiku a rozpoczęciem RT-PCR prowadzić może zatem do degradacji mRNA [36, 37]. Z tego względu zrezygnowaliśmy w naszym protokole z procedury selekcji komórek.

### RT-PCR

Analiza ilości produktu w czasie rzeczywistym (*real-time*) pozwala na monitorowanie kinetyki w każdym cyklu prowadzonej reakcji PCR. Metoda ta posiada wszystkie zalety konwencjonalnej PCR, takie jak szybkość, wysoka czułość oraz powtarzalność, a przy tym ze względu na ominięcie czasochłonnego etapu elektroforezy żelowej szczególnie nadaje się do rutynowej pracy diagnostycznej laboratorium onkologicznego.

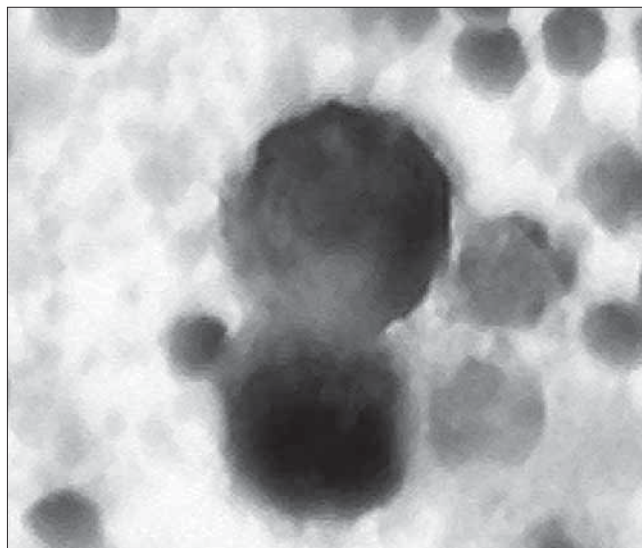
Jednym z komercyjnie dostępnych urządzeń do przeprowadzania PCR w technice *real-time* jest system LightCycler. Jest to zamknięty system, w którym RT-PCR odbywa się w technice *one-step*. Oznacza to, iż reakcja odwrotnej transkryptazy i PCR przeprowadzane są w jednej probówce, co z kolei wymaga zastosowania primerów specyficznych dla badanych sekwencji. Metoda jest dzięki temu szybsza, a zminimalizowana liczba etapów pozytywnie wpływa na powtarzalność oraz zmniejsza ryzyko kontaminacji do minimum.

### Korelacja obu metod

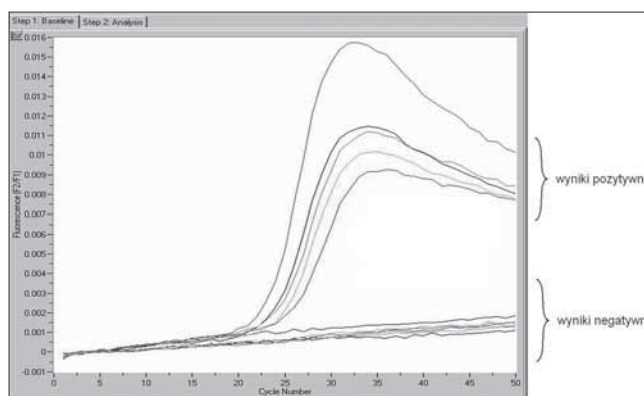
W omawianej pracy przebadano szpiki kostne od 405 chorych na raka piersi pacjentek w różnych stadiach choroby. Wszystkie aspiraty poddane zostały zarówno standardowej metodzie wykrywania rozsianych komórek nowotworowych (immunocytochemii), jak i nowej molekularnej metodzie opartej na RT-PCR. U 48% pacjentek przy pomocy przynajmniej jednej z metod wykryto komórki nowotworowe w szpiku kostnym. U 73% obie metody dały taki sam wynik ( $p < 0,001$ ). Podobne rezultaty uzyskali inni autorzy [26, 24, 38].

Ilość wyników pozytywnych w immunocytochemii oraz RT-PCR była zbliżona (odpowiednio 34% oraz 35%). Mimo to u 13% pacjentek tylko badanie immunocytochemiczne wykryło komórki nowotworowe w szpiku kostnym (negatywny wynik RT-PCR), natomiast w 14% przypadków detekcja RKN możliwa była tylko z zastosowaniem metody molekularnej (przy negatywnej immunocytochemii). W tym kontekście należy rozważyć rozmaite aspekty czułości i specyficzności obu metod oraz możliwe źródła tej rozbieżności. Bostick i wsp., a także Ko i wsp. opisują niski, lecz stały poziom ekspresji cytokeratyny w komórkach hematopoetycznych [39, 40]. Tym samym specyficzność danej metody zależy bezpośrednio od jej czułości, gdyż podwyższona czułość może prowadzić do sytuacji, w której ta ekstremalnie niska ekspresja oceniona zostanie jako wynik (fałszywie) pozytywny. Wprowadzenie poziomu odcięcia (*cut-off*) stanowi rozsądne rozwiązanie, jednakże protokoły ilościowej, a nie jakościowej, techniki RT-PCR są znacznie bardziej czasochłonne i podatne na zakłócenia i jako takie z trudnością znajdują zastosowanie w rutynowej pracy klinicznej. Ponadto podwyższona czułość niekoniecznie prowadzić musi do udoskonalenia metody diagnostycznej. Wiedswang i wsp. pokazali na przykładzie 464 pacjentek, iż zastosowanie dodatkowych metod preselekcji komórek, a tym samym poprawienie czułości metody, nie podnosi jej skuteczności jako czynnika prognostycznego [2].

W naszym badaniu u 27% pacjentek zaobserwowano odmienne wyniki. Przyczyny tej rozbieżności wydają się złożone.



**Rycina 1.** Skupisko komórek nowotworowych (ang. cluster) u pacjentki chorej na raka piersi. Komórki wykazują typową morfologię oraz immunofenotyp (dodatnie barwienie cytokeratynowe, duże jądro komórkowe, wysoki stosunek objętości jądra do cytoplazmy, jądro wykazuje częściowo pozytywne barwienie w kierunku cytokeratyny, ziarnista chromatyna w jądrze) [10].



**Rycina 2.** Wykres krzywej amplifikacji cytokeratyny 19 w systemie LightCycler. Na osi X pokazana jest ilość cykli (ang. PCR-cycle number), przy której PCR przechodzi w fazę amplifikacji. Intensywność fluorescencji oddaje oś Y. W tym przykładzie pięć próbek zostało ocenionych jako pozytywne, natomiast w przypadku sześciu aspiratów nie zaobserwowano amplifikacji cytokeratyny 19.

Po pierwsze, przeciwciała w immunocytochemii skierowane jest przeciw cytokeratynom 8, 18 i 19, natomiast w przypadku RT-PCR dochodzi do amplifikacji tylko mRNA cytokeratyny 19. Ponadto immunocytochemicznie pozytywne komórki znajdujące się w stanie „uśpienia” (*dormancy*) charakteryzują się zredukowanym metabolizmem, a tym samym obniżoną syntezą mRNA [41]. Również apoptotyczne komórki nowotworowe mogą zostać ocenione jako immunocytochemicznie pozytywne, zwłaszcza jeśli klasyfikacja komórek nie odbywa się stricte wedle kryteriów morfologicznych. Ważnym źródłem fałszywych wyników w metodach molekularnych są pseudogeny. Pojęcie to odnosi się do nieaktywnych odcinków genomu, które wykazują daleko posuniętą zbieżność z genem funkcjonalnym, np. cytokeratyną. Dla CK19 opisano jak dotąd cztery pseudogeny (chromosomy: 4, 6, 10 oraz 12). Ich sekwencja przypomina w 85% sekwencję genu funkcjonalnego [42]. Ruud i wsp. porównali sekwencję primerów wykorzystywanych w badaniach, których wyniki wskazywały na wysoki poziom ekspresji CK19 w grupach kontrolnych.

Banyś M, et al. Detekcja rozszianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej.

Tabela IV. Porównanie standardowej metody wykrywania rozszianych komórek nowotworowych (immunocytochemia) oraz nowej metody molekularnej opartej na RT-PCR.

	Immunocytochemia	RT-PCR
Antygen / mRNA	CK 8, 18, 19	CK19-mRNA
Cel („target”)	Stabilne białko	Niestabilne mRNA
Czułość	1-5 komórek / 10 <sup>6</sup> MNC	5 komórek / 10 <sup>6</sup> MNC
Specyficzność	Wyniki fałszywie pozytywne: 1 / 100; Przeciwciała specyficzne przeciw epitopom nabłonkowym	Wyniki fałszywie pozytywne: 1 / 100; Wysoce specyficzna sekwencja primerów
Separacja komórek	Tak (gradient gęstości)	Nie
Czas trwania	2 dni	5 h
Czas obróbki ręcznej (Hand-on)	3 h	2,5 h
Koszt	€ 13,- / szpik	€ 35,- / szpik
Możliwość grupowania szpików w celu opracowania kilku na raz (Batching)	Nie	Tak
Możliwość długoterminowego przechowywania materiału	Nie (tylko gotowe preparaty-szkiełka mogą podlegać przechowywaniu)	Tak
Komputerowa analiza danych	Tak	Tak
Możliwość powtórnej analizy danych	Tak	Tak
Analiza subiektywna	Tak	Nie
Wynik badania	Wizualne przedstawienie barwionych komórek	Krzywe amplifikacyjne
Kryteria morfologiczne uwzględnione w analizie	Tak	Nie

Tabela V. Znaczenie prognostyczne metod molekularnych w diagnostyce rozszianych komórek rakowych w guzach litych.

Badanie	Marker	Materiał	Liczba pacjentów	Odsetek wyników pozytywnych	Znaczenie prognostyczne
Zach i wsp., 2002 [47]	hMAM	KO	467	11%	OS
Benoy i wsp., 2006 [48]	CK19, hMAM	SK, KO	148	CK19: 28% w SK; 15% w KO. hMAM: 20% w SK i KO	DFS, OS <sup>1</sup>
Stathopoulou i wsp., 2002 [32]	CK19	SK, KO	198	KM: 63% <sup>2</sup> , 74% <sup>3</sup> ; PB: 30% <sup>2</sup> , 52% <sup>3</sup>	DFS, OS <sup>4</sup>
Xenidis i wsp., 2006 [49]	CK19	KO	167 <sup>5</sup>	22%	DFS, OS
Ntoulia i wsp., 2006 [50]	hMAM-A	KO	140	15%	DFS
Smith i wsp., 2000 [24]	CK19	KO	22 <sup>6</sup>	50%	Korelacja obecności komórek rozszianych z odpowiedzią na leczenie
Sienel i wsp., 2007 [51]	MAGE-A	SK	50 <sup>7</sup>	52%	DFS <sup>5</sup>
Koch i wsp., 2006 [52]	CK20	SK, KO	90 <sup>8</sup>	-	DFS

**Skróty:**

SK – szpik kostny; KO – krew obwodowa; DFS (*disease-free survival*) – czas przeżycia bez objawów choroby; OS (*overall survival*) – czas przeżycia całkowitego;  
<sup>1</sup> zarówno CK19, jak i hMAM, ale tylko szpik kostny był istotny prognostycznie  
<sup>2</sup> stadium I-II raka piersi  
<sup>3</sup> pacjenci z przerzutami

<sup>4</sup> analiza *Follow-Up* została przeprowadzona wyłącznie dla operacyjnego raka piersi i krwi obwodowej  
<sup>5</sup> niezajęte węzły chłonne  
<sup>6</sup> 145 próbek od 22 pacjentów z przerzutami  
<sup>7</sup> rak oskrzeli  
<sup>8</sup> rak jelita grubego

W istocie w badaniach tych użyto niespecyficznych primerów, które mogły amplifikować zarówno poszukiwany gen, jak i pseudogeny [14]. Z tego względu primery oraz sondy hybrydujące w naszym badaniu zaprojektowane zostały tak, aby różniły DNA i cDNA oraz aby niemożliwa była przypadkowa amplifikacja pseudogenów cytokeratyny 19.

**Korelacja wyników z czynnikami kliniczno-histologicznymi**

Najwięcej wyników pozytywnych z zastosowaniem immunocytochemii uzyskano w grupie pacjentek ze wznową bądź przerzutami (58%). Wysoki odsetek pacjentek z minimalną chorobą resztkową wśród tej grupy odnotowują również inni autorzy [43].

Przy użyciu metody molekularnej RT-PCR najwięcej rozszianych komórek rakowych wykryto u pacjentek po terapii neoadjuwantowej (55%). Monitoring komórek rozszianych podczas terapii neoadjuwantowej pozwala ocenić jej skuteczność. Wysoki odsetek pacjentek z pozytywnym statusem szpikowym w tej grupie po zakończeniu terapii opisuje m.in. Fehm i wsp. [44].

Należy jednak pamiętać, iż pacjentki zakwalifikowane do terapii neoadjuwantowej znajdują się w znacznie bardziej zaawansowanym stadium choroby niż pacjentki pierwotnie operacyjne. Najmniej pacjentek z minimalną chorobą resztkową odnotowano w grupie bezobjawowych pacjentek z rakiem piersi w wywiadzie. Mimo to u 15-20% (zależnie od metody) wykryto komórki rakowe w szpiku kostnym. Być może rokowanie tej grupy pacjentek

Banyś M, et al. *Detekcja rozsianych komórek nowotworowych w szpiku kostnym u pacjentek z rakiem piersi z zastosowaniem nowej metody molekularnej.*

poprawiłyby dodatkowe strategie terapeutyczne mające na celu eliminację tych komórek (leczenie celowane) [45]. Jednym z mechanizmów leżących u podłoża fenomenu uspionych (*dormant*) komórek rakowych wydaje się być krucha równowaga pomiędzy apoptozą a proliferacją tych komórek. Meng i wsp. udało się przy pomocy badań genetycznych (FISH) wykryć komórki rakowe w szpiku bezobjawowych pacjentek aż 22 lata po operacji raka piersi [46].

Immunocytochemiczna detekcja komórek rakowych w szpiku kostnym uważana jest obecnie za niezależny czynnik rokowniczy w raku piersi [1]. Badania *follow-up* prowadzone były również przy użyciu metod molekularnych. Jednakże biorąc pod uwagę różnice metodyczne, trudno o zbiorczą metaanalizę tych danych.

W tabeli V przedstawione są dotychczasowe badania przeżywania oparte na diagnostyce RKN metodami molekularnymi.

## Wnioski

Reasumując, w niniejszej publikacji przedstawiamy nową molekularną metodę diagnostyki rakowych komórek rozsianych w szpiku kostnym pacjentek z rakiem piersi opartą na RT-PCR. Metoda ta może uzupełnić dotychczasowe techniki diagnostyczne i dostarczyć nowych informacji na temat choroby resztkowej.

## Piśmiennictwo

- Braun S, Vogl F, Naume B, [et al.]. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005, 353, 793-802.
- Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, [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.
- Braun S, Pantel K, Muller P, [et al.]. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* 2000, 342, 525-533.
- Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, [et al.]. Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung. *Cancer.* 1999, 86, 2398-2405.
- Fehm T, Becker S, Bachmann C, [et al.]. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol.* 2006, 103, 942-947.
- Lukyanchuk V, Friess H, Kleeff J, [et al.]. Detection of circulating tumor cells by cytokeratin 20 and prostate stem cell antigen RT-PCR in blood of patients with gastrointestinal cancers. *Anticancer Res.* 2003, 23, 2711-2716.
- Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, [et al.]. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99, 2246-2251.
- Banyś M, Gruber I, Krawczyk N, [et al.]. Hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination may be detected in patients diagnosed with ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2011, Epub ahead of print.
- Banyś M, Solomayer E, Becker S, [et al.]. Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer.* 2009, 19, 948-952.
- Fehm T, Braun S, Muller P, [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.
- Borgen E, Naume B, Nesland J, [et al.]. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy.* 1999, 5, 377-388.
- Jamshidi K, Swaim W. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J Lab Clin Med.* 1971, 77, 335-342.
- Bauer K, de la Torre-Bueno J, Diel I, [et al.]. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 6 (9):3552-3559
- Ruud P, Fodstad O, Hovig E (1999) Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer.* 2000, 80, 119-125.
- Molloy T, Bosma A, Baumbusch L, [et al.]. The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2011, 13, R61.
- Fehm T, Morrison L, Saboorian H, [et al.]. Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2002, 75, 227-239.
- Schlimok G, Funke I, Holzmann B, [et al.]. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84, 8672-8676.
- Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, [et al.]. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother.* 1994, 3, 165-173.
- Aihara T, Fujiwara Y, Miyake Y, [et al.]. Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers. *Cancer Lett.* 2000, 150, 79-84.
- Zippelius A, Kufer P, Honold G, [et al.]. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol.* 1997, 15, 2701-2708.
- Kowalewska M, Chechlińska M, Markowicz S, [et al.]. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer.* 2006, 42, 2671-2674.
- Kruger W, Jung R, Dettlefsen B, [et al.]. Interference of cytokeratin-20 and mammaglobin-reverse-transcriptase polymerase chain assays designed for the detection of disseminated cancer cells. *Med Oncol.* 2001, 18, 33-38.
- Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, [et al.]. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, 5145-5151.
- Smith B, Slade M, English J, [et al.]. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol.* 2000, 18, 1432-1439.
- Schoenfeld A, Kruger K, Gomm J, [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.
- Benoy I, Elst H, Van der Auwera I, [et al.]. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2004, 91, 1813-1820.
- Bartek J, Bartkova J, Schneider J, [et al.]. Expression of monoclonal antibody-defined epitopes of keratin 19 in human tumours and cultured cells. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1986, 22, 1441-1452.
- Champelovier P, Mongelard F, Seigneurin D. CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 1999, 19, 2073-2078.
- Dandachi N, Balic M, Stanzer S, [et al.]. Critical evaluation of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in colorectal cancer patients. *J Mol Diagn.* 2005, 7, 631-637.
- Bustin S, Gyselman V, Siddiqi S, [et al.]. Cytokeratin 20 is not a tissue-specific marker for the detection of malignant epithelial cells in the blood of colorectal cancer patients. *Int J Surg Investig.* 2000, 2, 49-57.
- Vlems F, Diepstra J, Cornelissen I, [et al.]. Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Mol Pathol.* 2002, 55, 156-163.
- Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, [et al.]. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol.* 2002, 20, 3404-3412.
- Traweek S, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1993, 142, 1111-1118.
- Schoenfeld A, Lugmani Y, Sinnott H, [et al.]. Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastases in lymph nodes in breast cancer patients. *Br J Cancer.* 1996, 74, 1639-1642.
- Datta Y, Adams P, Drobyski W, [et al.]. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol.* 1994, 12, 475-482.
- Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, [et al.]. Time is an important factor when processing samples for the detection of disseminated tumor cells in blood/bone marrow by reverse transcription-PCR. *Clin Chem.* 2004, 50, 785-786.
- Burchill S, Lewis I, Selby P. Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells. *Br J Cancer.* 1999, 79, 971-977.
- Zhong X, Kaul S, Diel I, [et al.]. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999, 125, 286-291.
- Bostick P, Chatterjee S, Chi D, [et al.]. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 1998, 16, 2632-2640.
- Ko Y, Grunewald E, Totzke G, [et al.]. High percentage of false-positive results of cytokeratin 19 RT-PCR in blood: a model for the analysis of illegitimate gene expression. *Oncology.* 2000, 59, 81-88.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, [et al.]. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1993, 85, 1419-1424.
- Zhang Z, Harrison P, Liu Y, [et al.]. Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res.* 2003, 13, 2541-2558.
- Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Schindler A, [et al.]. A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocols (Review). *Int J Oncol.* 2002, 20, 1027-1034.
- Fehm T, Becker S, Becker-Pergola G, [et al.]. Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2006, 8, R60.
- Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, [et al.]. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2007, 106, 239-243.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel E, [et al.]. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res.* 2004, 10, 8152-8162.
- Zach O, Kasparu H, Wagner H, [et al.]. Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients. *Acta Med Austriaca.* 2002, Suppl 59, 32-34.
- Benoy I, Elst H, Philips M, [et al.]. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2006, 94, 672-680.
- Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, [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.
- Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, [et al.]. Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem.* 2006, 39, 879-887.
- Sienel W, Mecklenburg I, Dango S, [et al.]. Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 3840-3847.
- Koch M, Kienle P, Kastrati D, [et al.]. Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in patients with stage II colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2006, 118, 3072-3077.