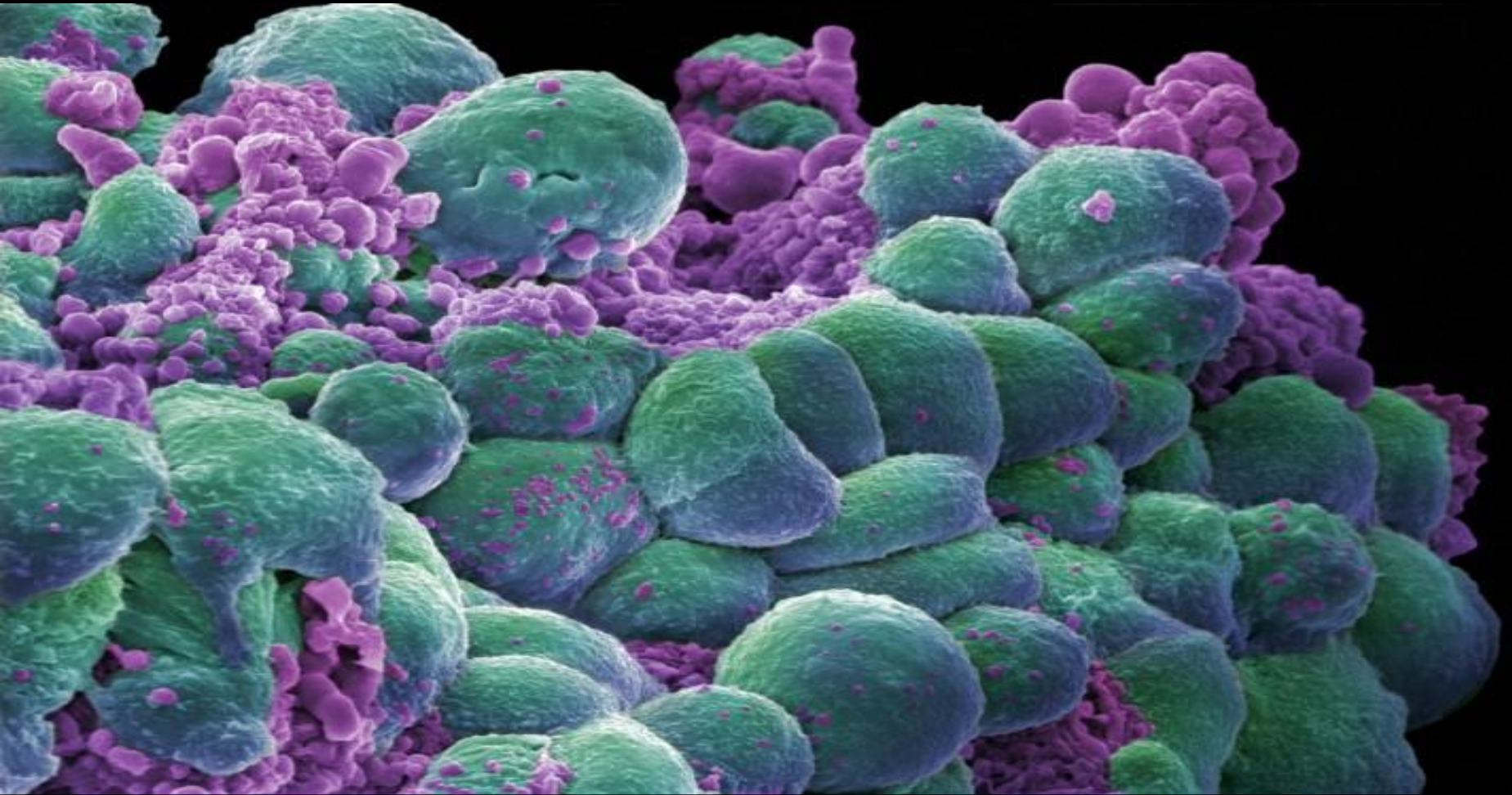


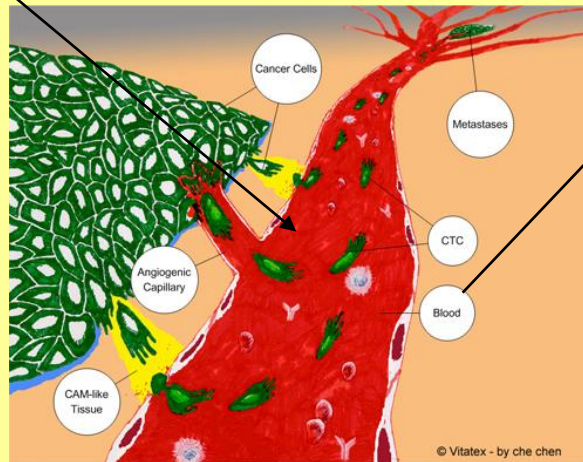
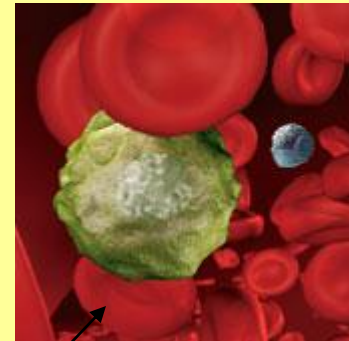
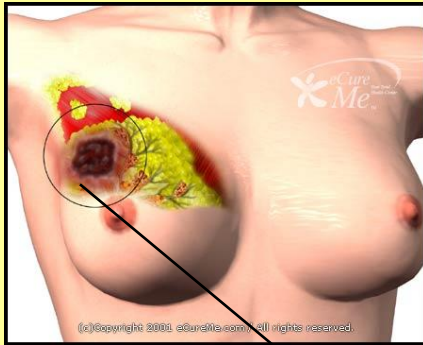
# Cirkulující nádorové buňky

## Circulating Tumor Cells (CTC)



Kološtová K, Pintérová D, Bobek V, Janatková I, Prokopová V, Kubecová M, Čtrnáctá V, Šindelka R, Kubista M, Barkmanová J, Tesařová P.

# Rakovina a metastázy ( 1% CTC)

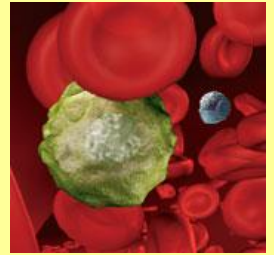


# Z pohľadu lekára



- Upresnenie diagnózy na základe molekulárnej klasifikácie nádoru a CTC
- Monitoring priebehu ochorenia
- Molekulárna analýza nových cielených liečiv
- Stratifikácia terapie „pacientovi na mieru“ (personalizovaná medicína )
- Včasná detekcia metastatického rozsevu

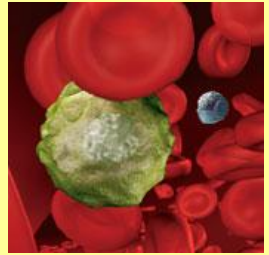
# CTC



- *diagnostikované post mortem 1869*
- „ A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death“

Ashworth T.R., Austr.Med.J. 1869, 14,146

# CTC



- Bunky v periférnej krvi, patriace antigénne alebo geneticky k typom jednotlivých nádorov
- Zdroj CTC nie je presne definovaný (ložisko primárneho tumoru alebo – následok mutačného procesu v kmeňových bunkách kostnej drene?).

# Prečo CTC?

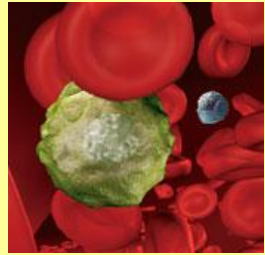
- Odpoveď na liečbu: Primárny nádor vs. Metastázy
- Stratifikácia skupín pacientov – napr. Pozitivita CTC - indikácia k analýze sentinelovej uzliny
- pozitivita CTC – rádioterapia ?

- **CTC**

nový štandard v liečbe rakoviny ????

- detekcia relapsu s vyššou presnosťou aj v prípadoch, keď ešte štandardné dg.postupy nie sú schopné metastázy detekovať

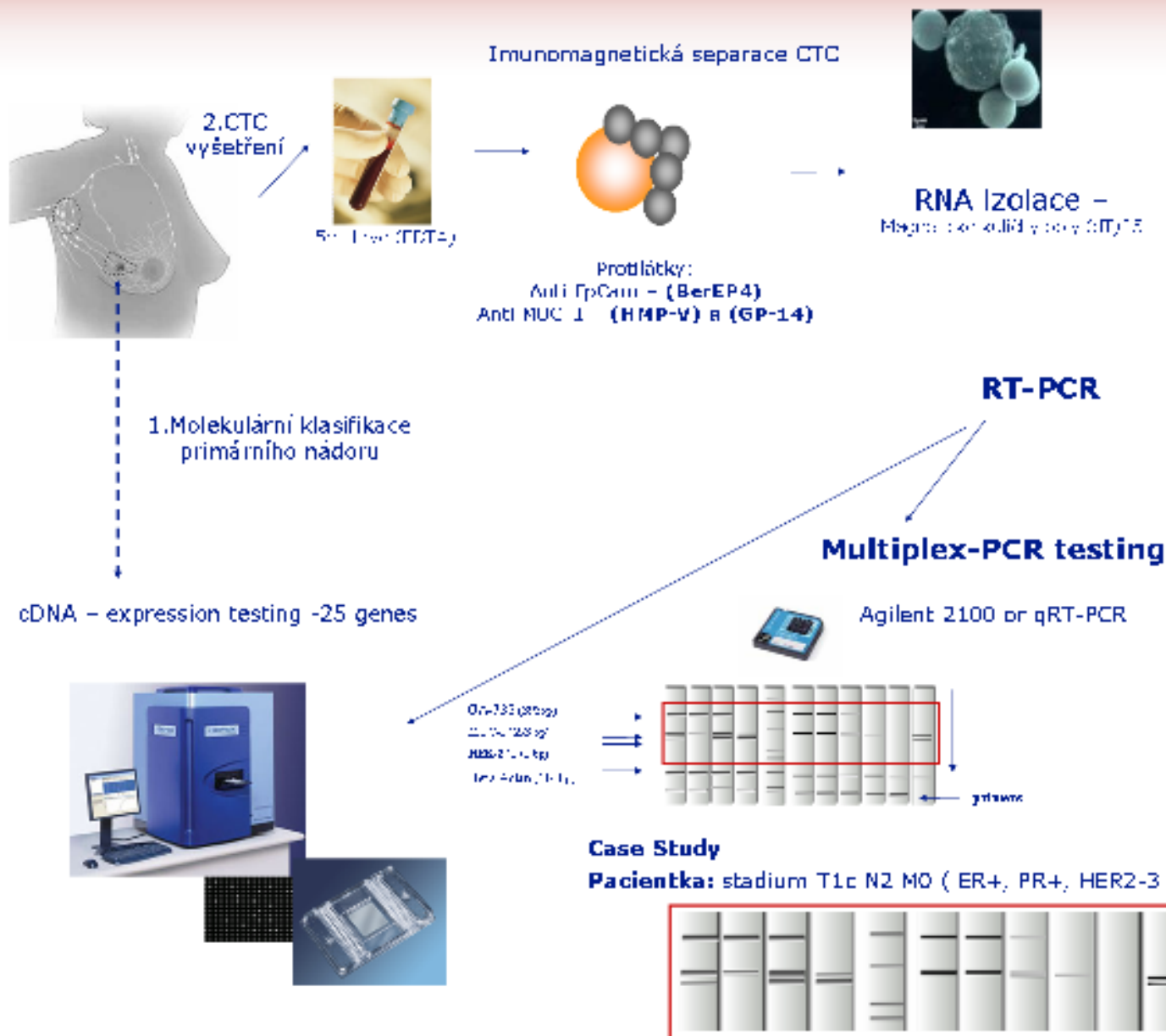
# CTC



- pacientka s CTC bunkami trpí agresívnejšou formou ochorenia
- prítomnosť CTC v krvi a rozdielna expresia onkomarkerov na úrovni mRNA v CTC - stanovenie algoritmov skorej detekcie diseminácie (metastáz).
- ideálny prostriedok monitorovania dynamiky priebehu ochorenia - periférna krv je dostupná a umožňuje tak opakovanie vyšetrenia v prípade potreby



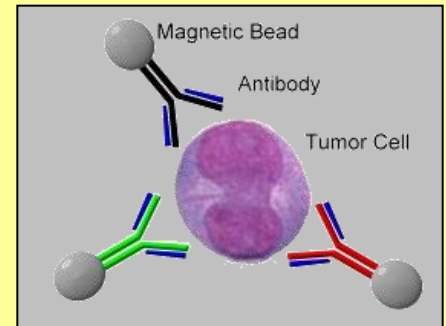
# Standardní operační protokol (SOP)



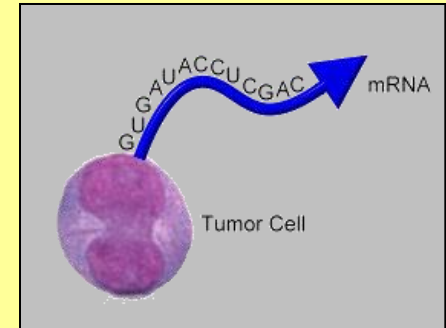
# Štandardný operačný protokol pre CTC test



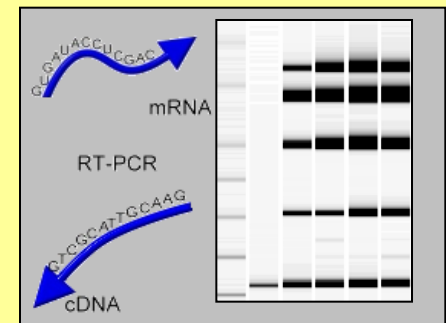
**(1) Imunomagnetická separácia buniek z krvi ( 5 ml EDTA) – magnetické guľičky s protilátkami špecifikými proti nádorovej bunke**



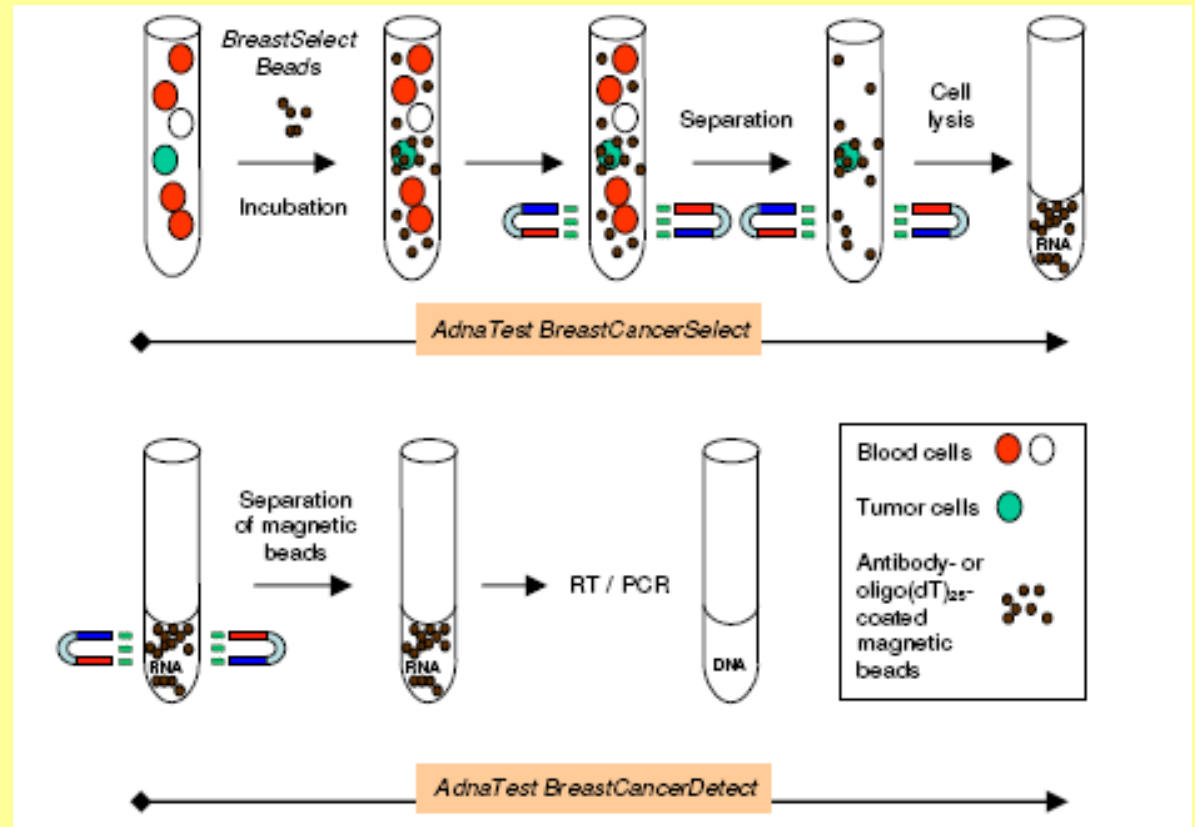
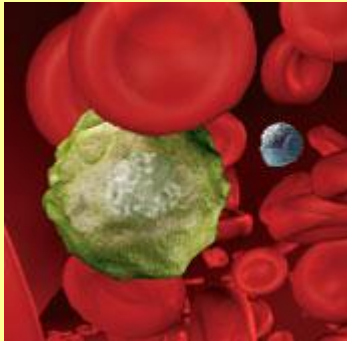
**(2) mRNA izolácia a RT - PCR**  
mRNA stabilizácia, mRNA izolácia s oligo(dT) magnetic.guličkami and cDNA syntéza pomociu enzýmu reverná transkriptáza.



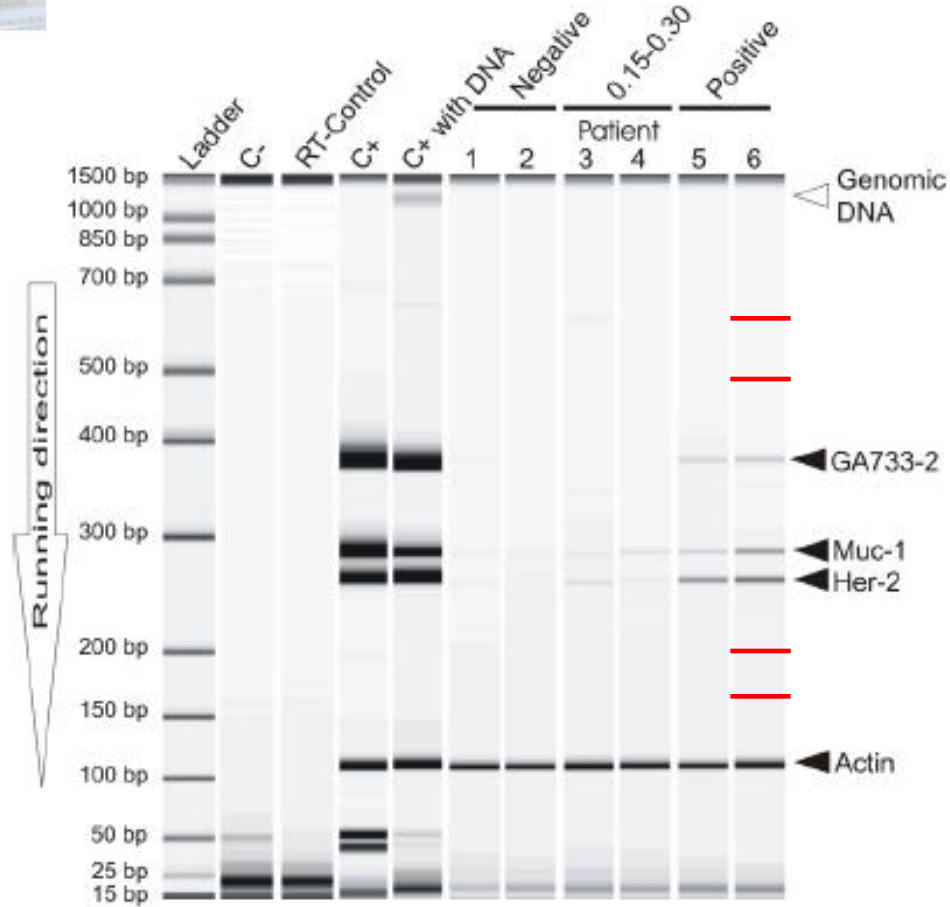
**(3) Multiplex-PCR**  
analýza expresie nádorových markerov – MUC-1, EpCAM, HER2, ER, PR.



# CTC test



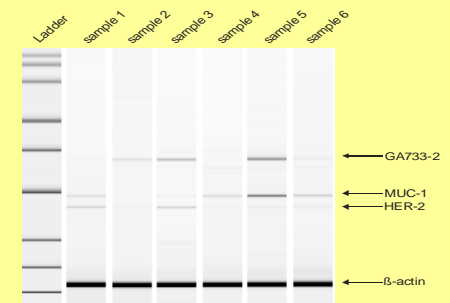
# Agilent 2100



- uPA
- PAI-1
- PTEN
- PR
- ER

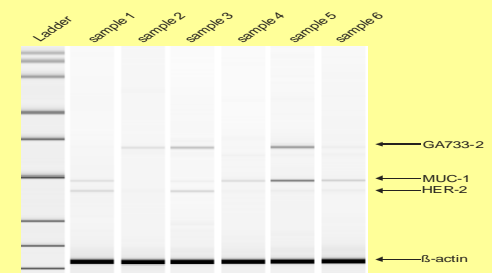
# ***Pokrok v diagnostike rakoviny = zisk pre pacienta aj lekára***

- **Prognóza:** CTC v krvi pred operačným zákrokom indikujú zvýšené riziko metastáz
- indikácia k pooperačnej chemoterapii



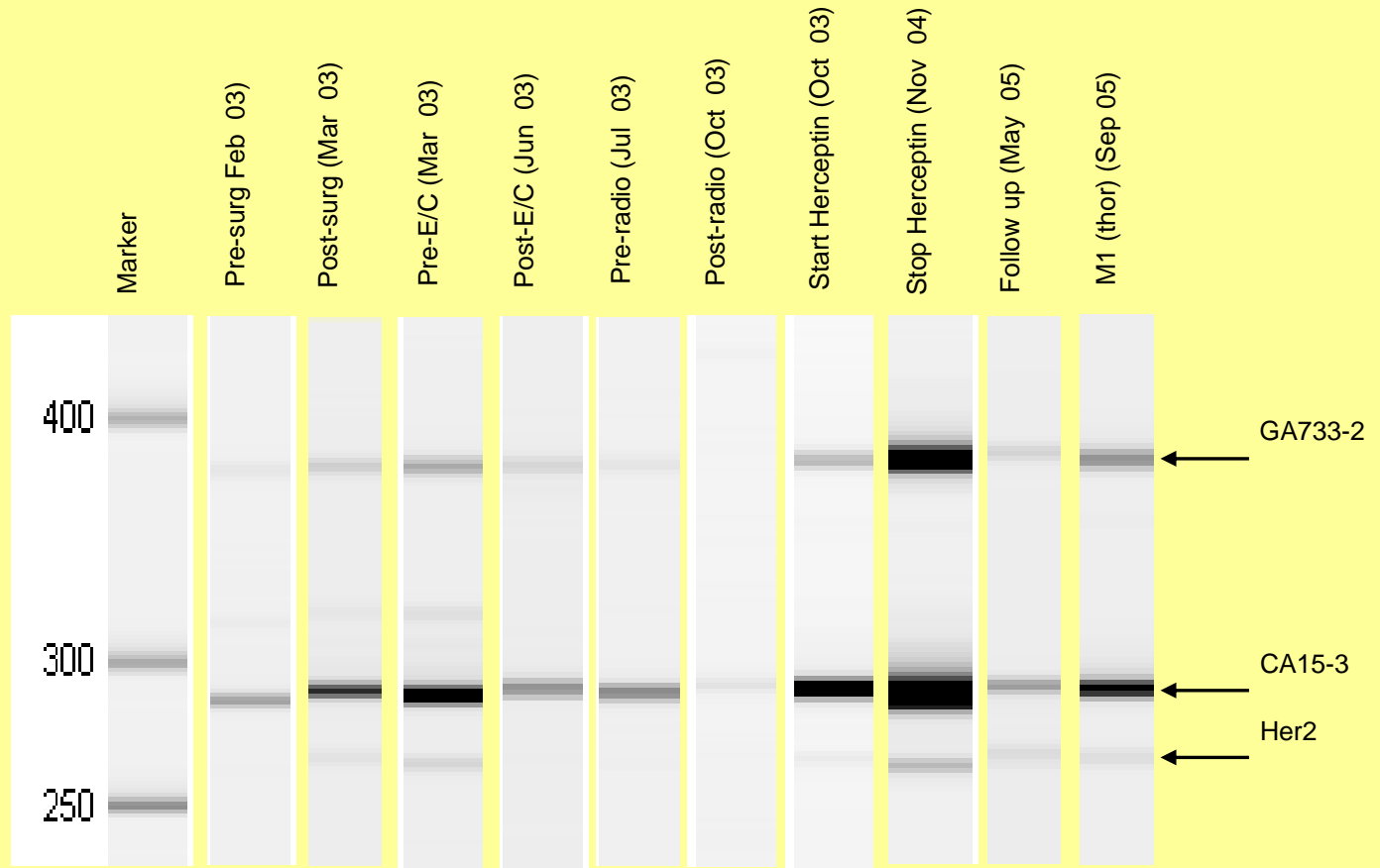
# *Monitoring v priebehu terapie*

- efektivita terapie je meraná efektom úbytku CTC v periférnej krvi
- ak sa CTC vyskytujú v periférii aj po terapii, je potrebné aplikovať alternatívne terapeutické režimy



# pT1c N2a M0

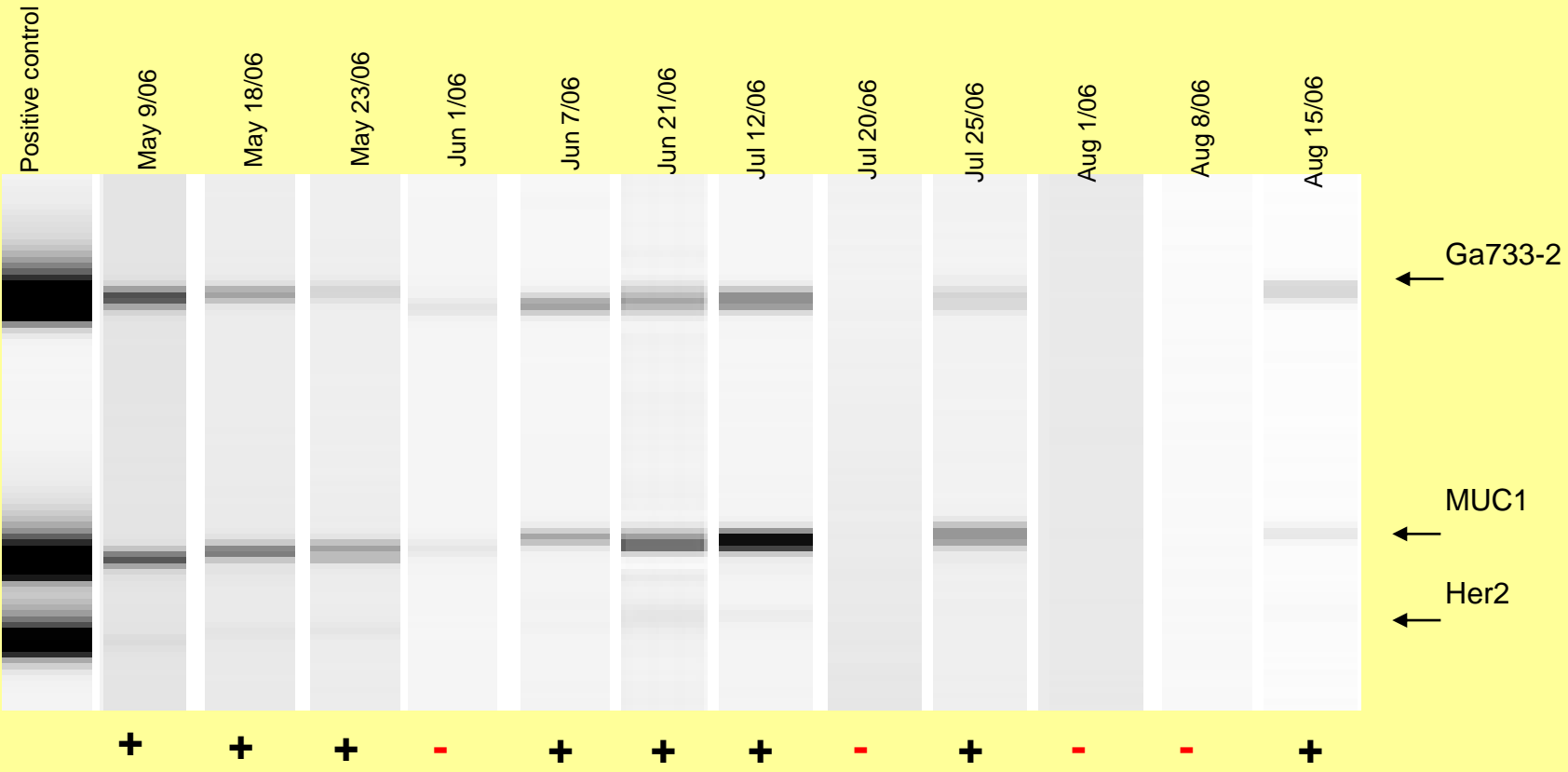
pT1c, N2a, M0;  
ER (IRS)2, PR (IRS)2  
T: Epirubicin,  
Cyclophosphamid;  
radio, Herceptin



<i>AdnaTest</i> result	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Navelbine

Taxotere





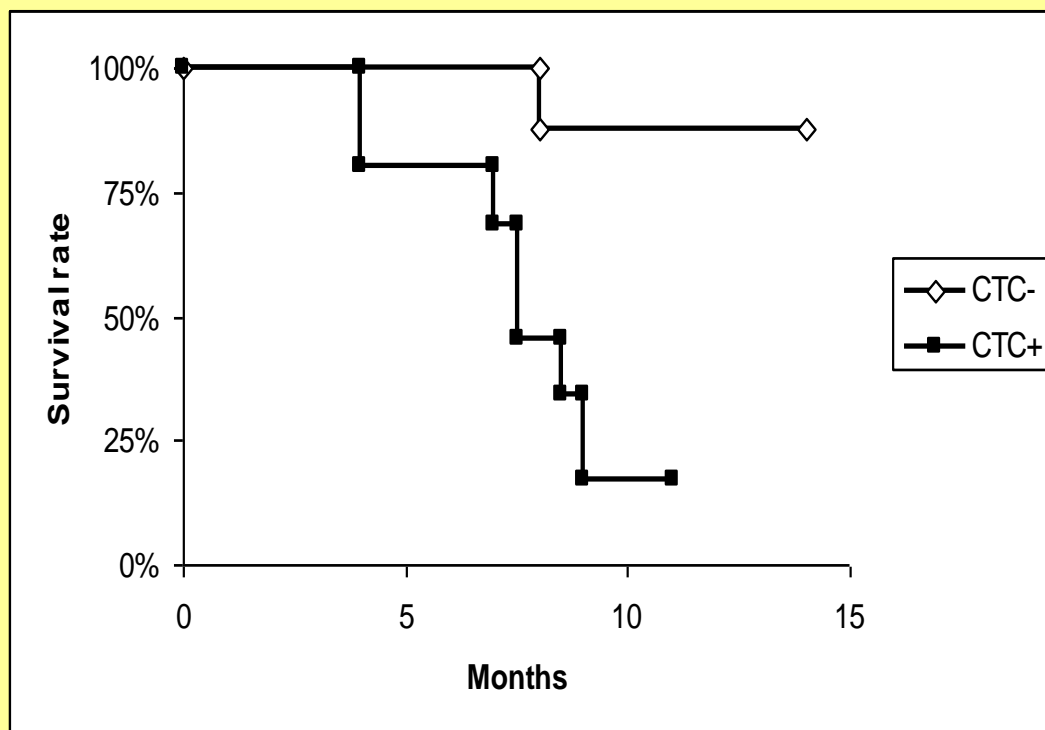
# *Skorá detekcia relapsu*

- *AdnaGen* test detekuje možný relaps niekoľko mesiacov pre inými dg.metódami (cca. 9 mesiacov)
- **CTC - najsilnejší nezávislý faktor rizika i v porovnaní so sérovými markermi**



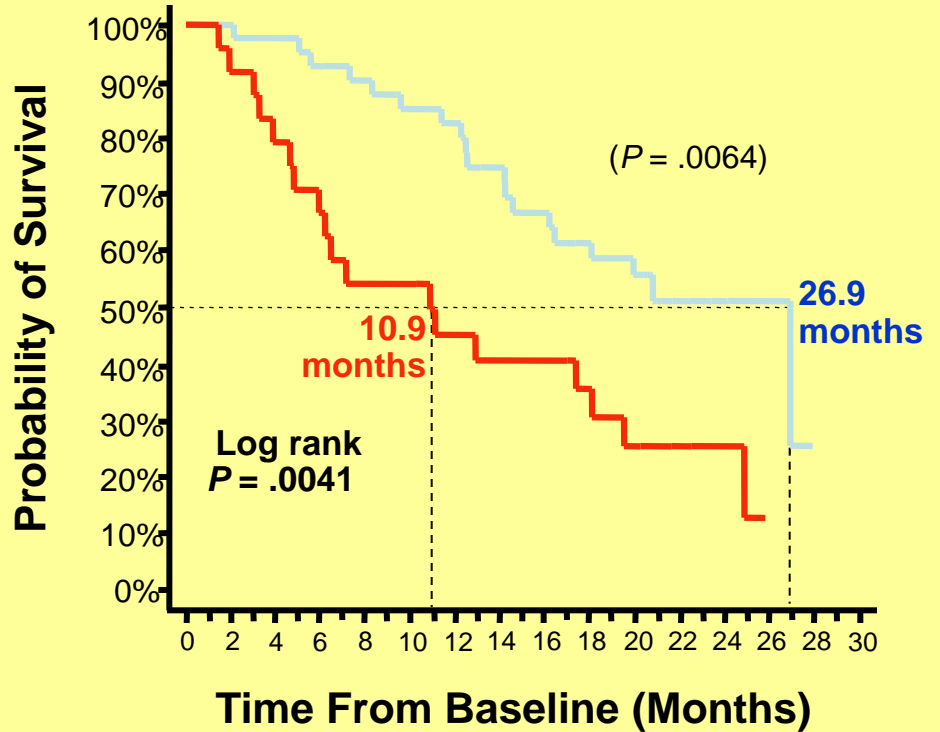
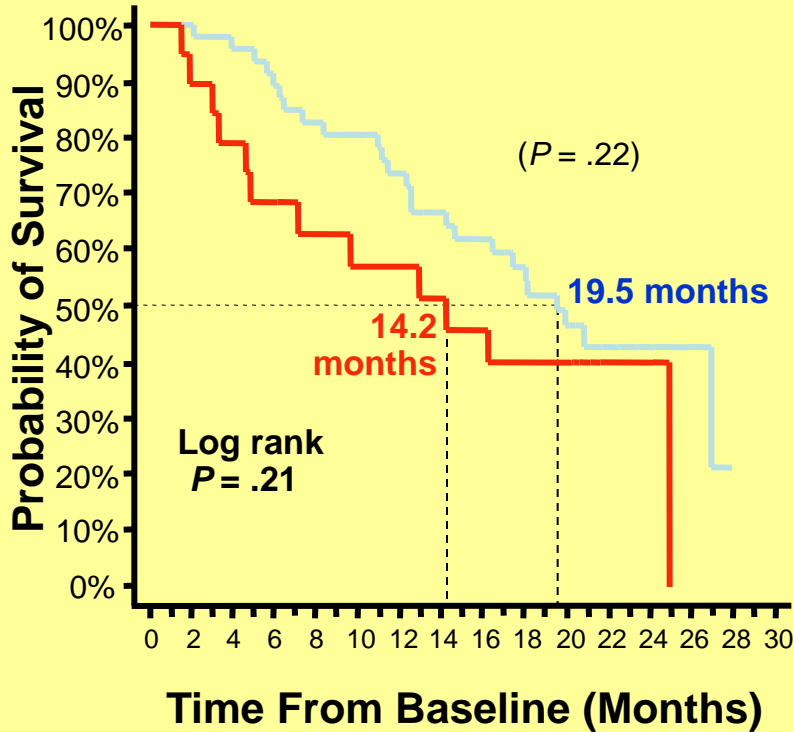
# Predikcia

## OS u Metastazujúceho nádoru



**7/10 CTC posit. zomrelo v priebehu 12 mesiacov, ale len 1/10 v skupine CTC negativnej. Prítomnosť CTC je významným prognostickým faktorom s ohľadom na OS ( $p < 0.008$ ).**

# MUC-1(CA15.3) a CTC

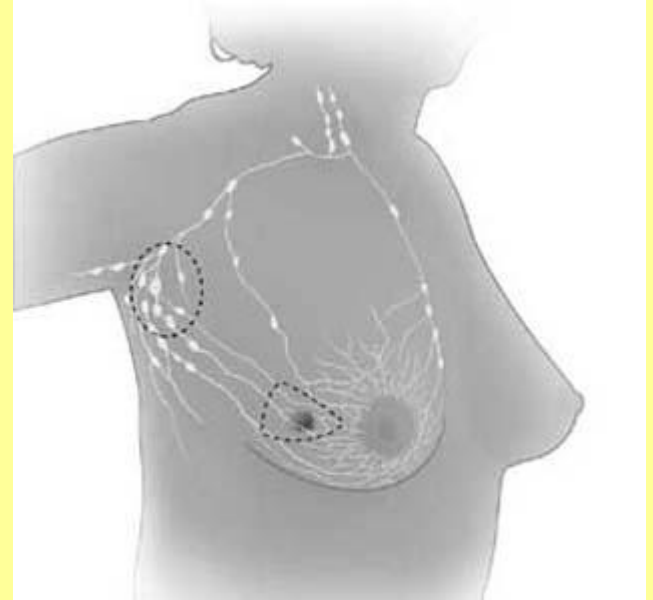


# *Metastatic Breast Cancer*

- MBC je veľmi heterogénna
- Liečba je paliatívna
- Súčasné klinické, laboratórne a rádiologické metódy sú neadekvátne pre
  - Biologickú definíciu nádoru
  - Stanovenie prognózy
  - A dynamické meranie efektu terapie a odpovedi na liečbu

# *MBC - Metastatic Breast Cancer*

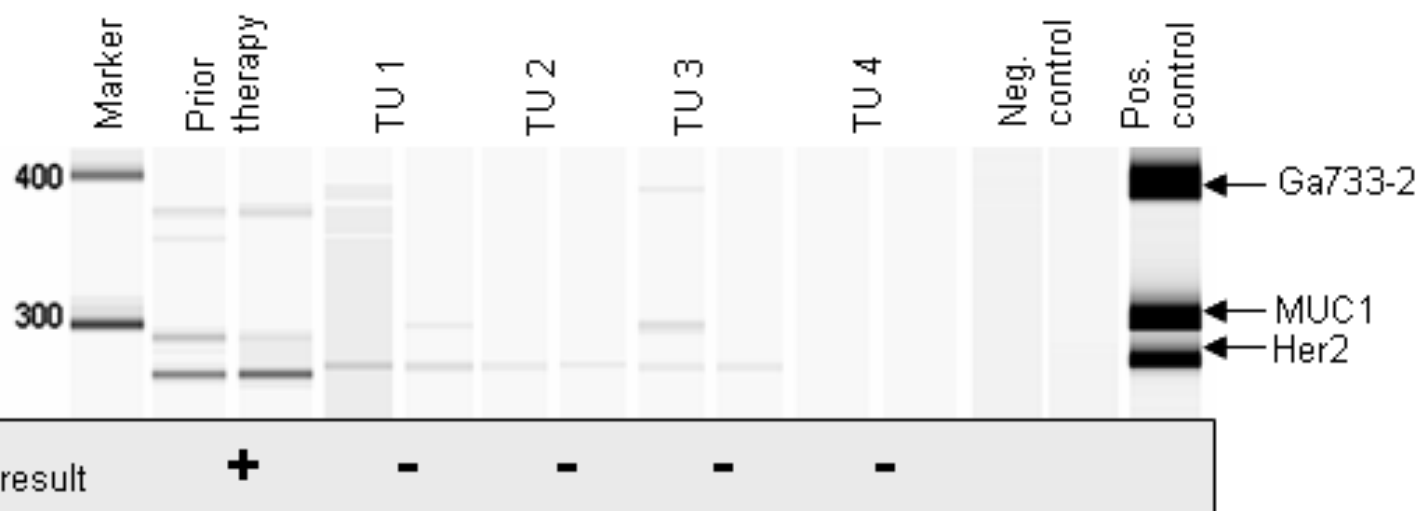
- Axilárne uzliny
- Kostná dreň
- Periférna krv



- Prítomnosť metastáz v regionálnych lymfatických uzlinách je navýznamnejším prognostickým faktorom

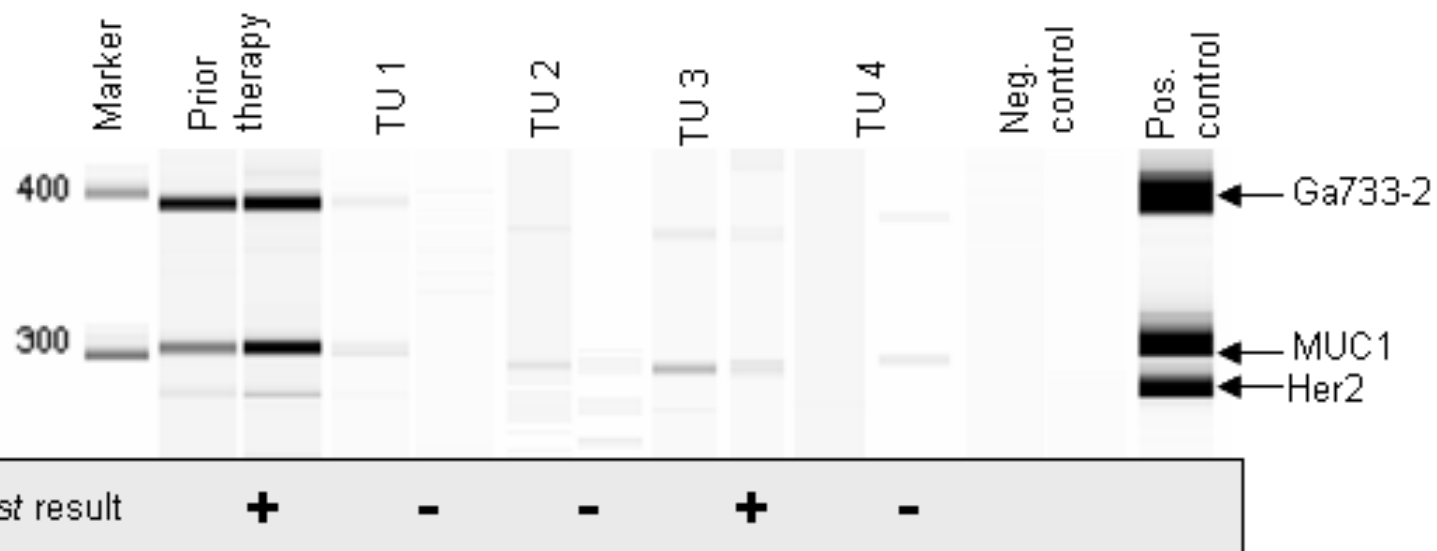
# Patient 1

M1(hep,pul,oss);  
ER+;PR+;Her2-;  
T:Docetaxel



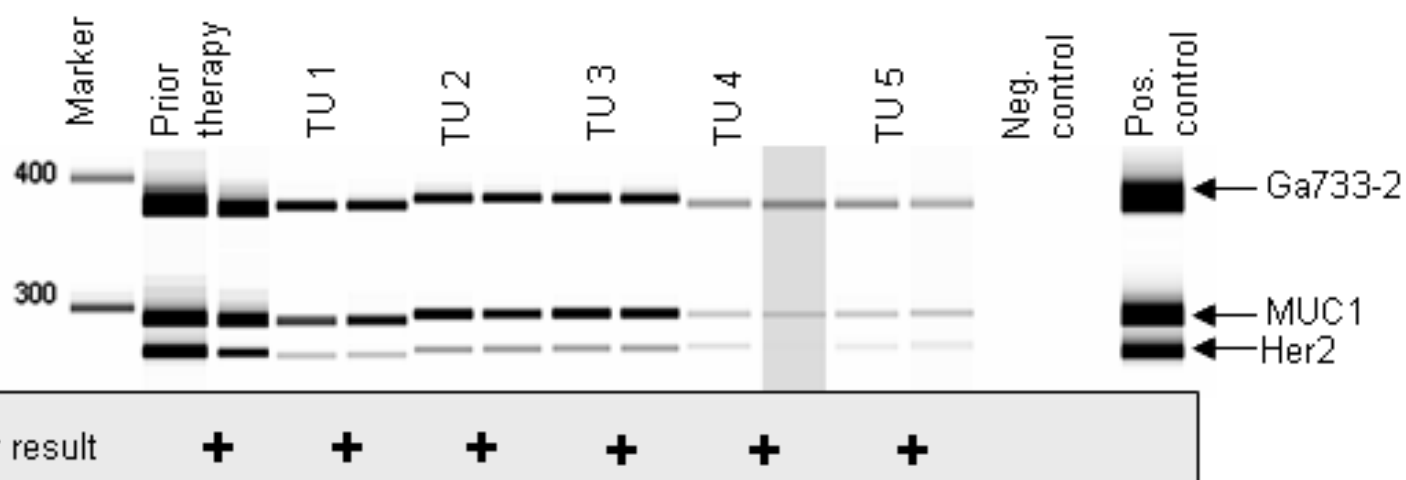
## Patient 2

M1(thorac,oss);  
ER-; PR-;Her2-;  
T:Paclitaxel



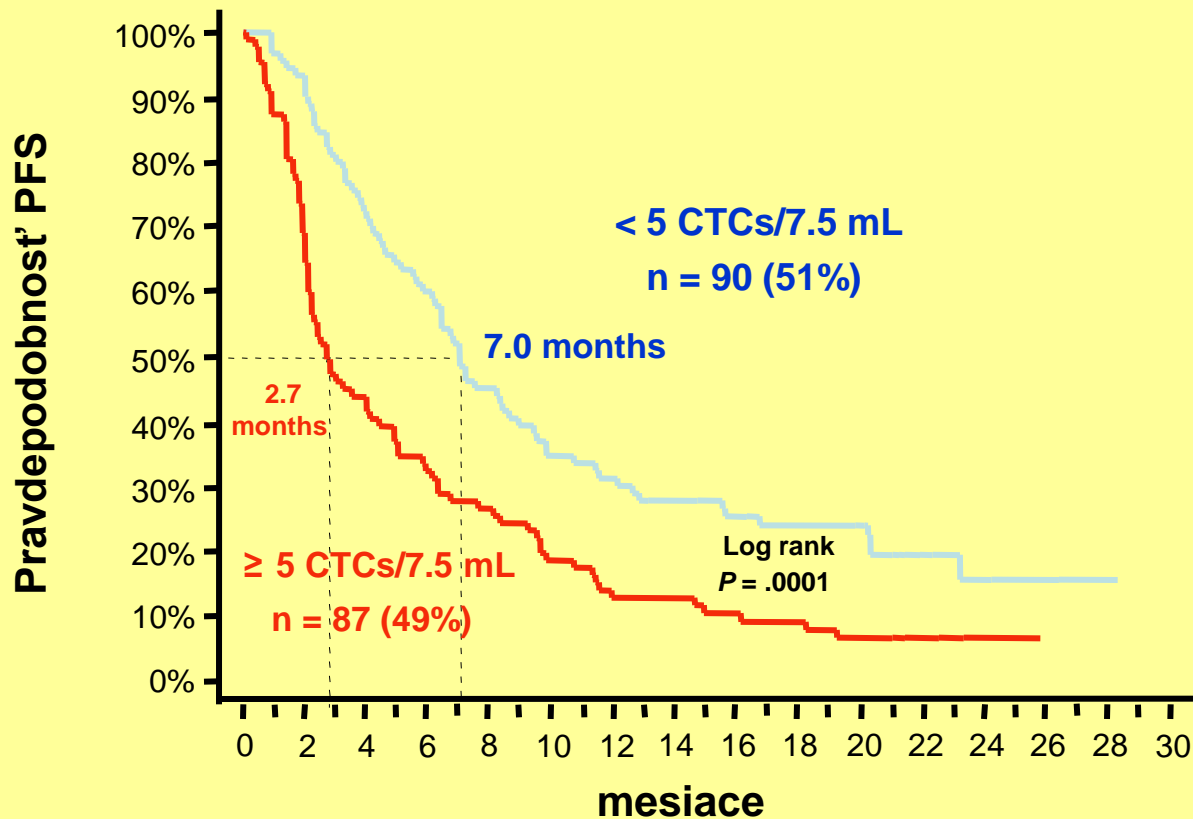
### Patient 3

M1(hep,pul,oss);  
ER+; PR+; Her2+;  
T:Anthracyclin

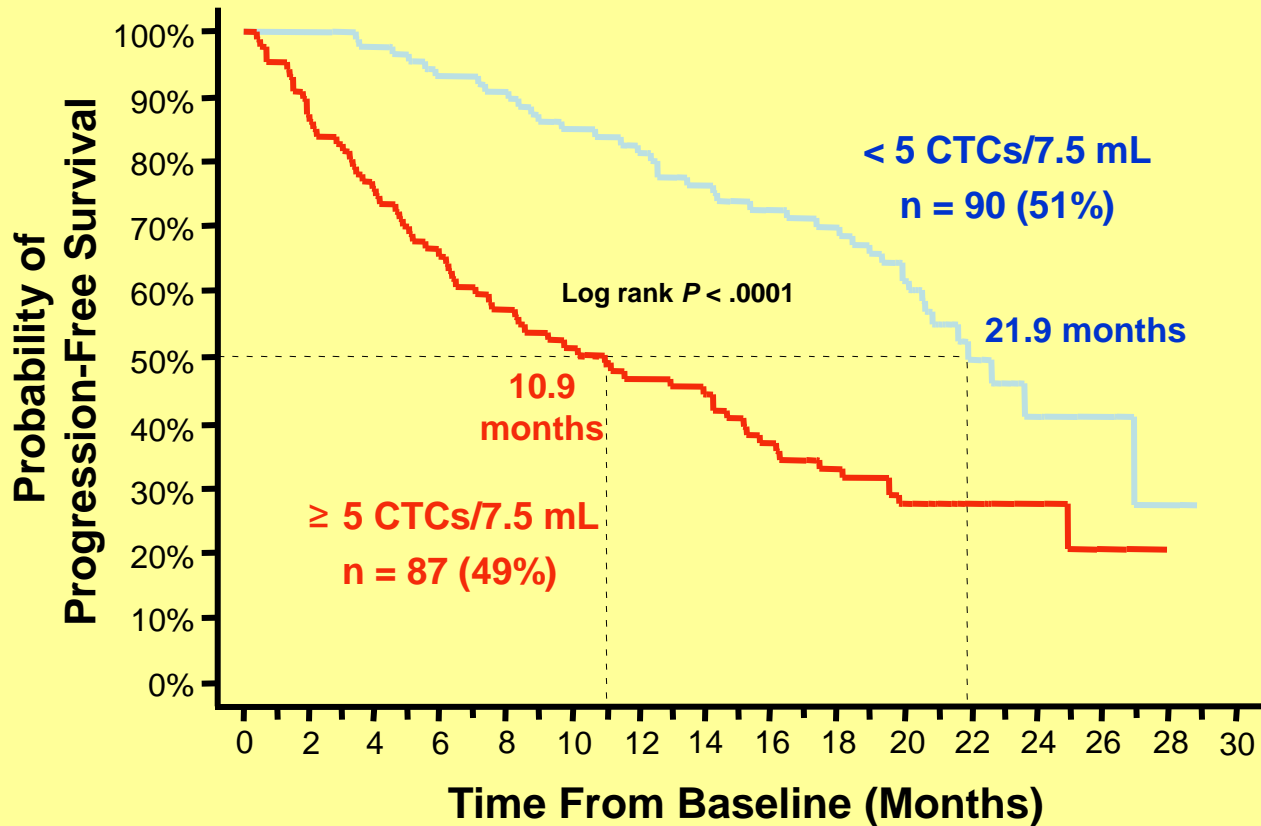




# Progression-Free Survival (PFS)

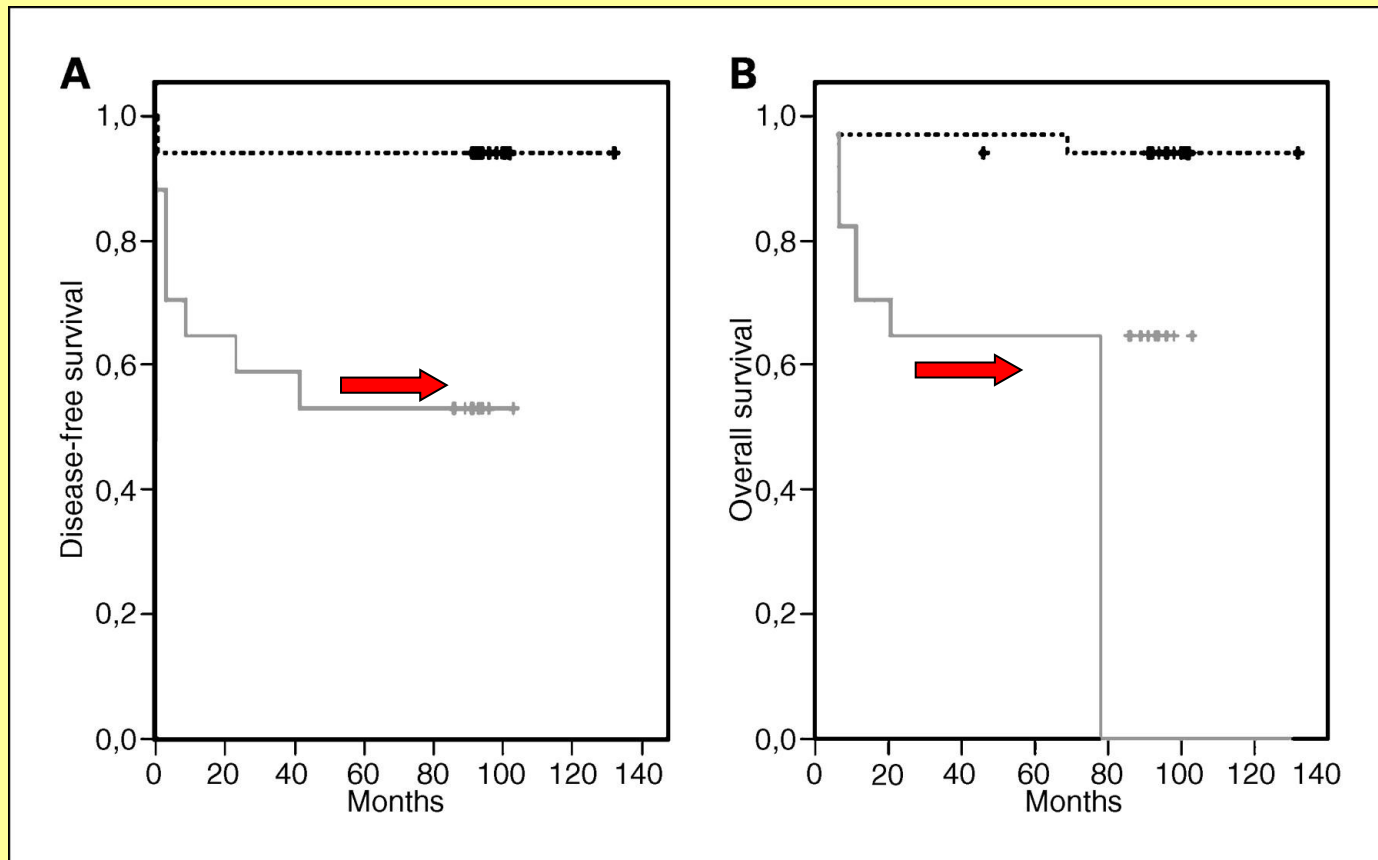


# Overall Survival (OS)



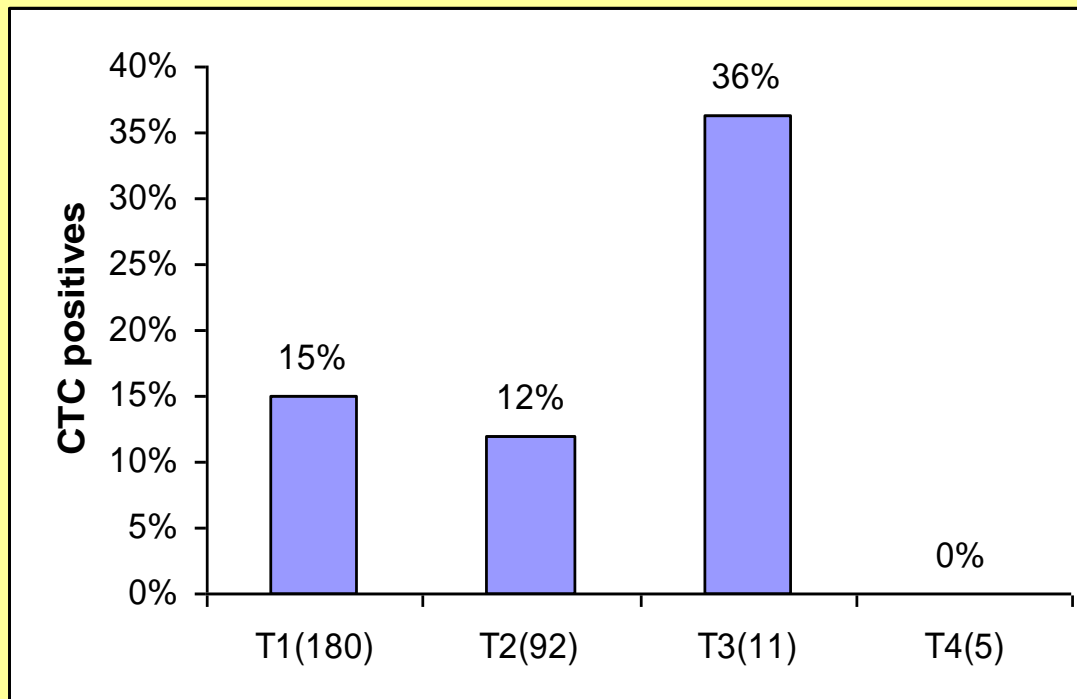
# Prežívávanie pacientiek s HER2+ CTC

## Až 29% pacientiek s HER2- primárnym nádorom ma HER2 + CTC

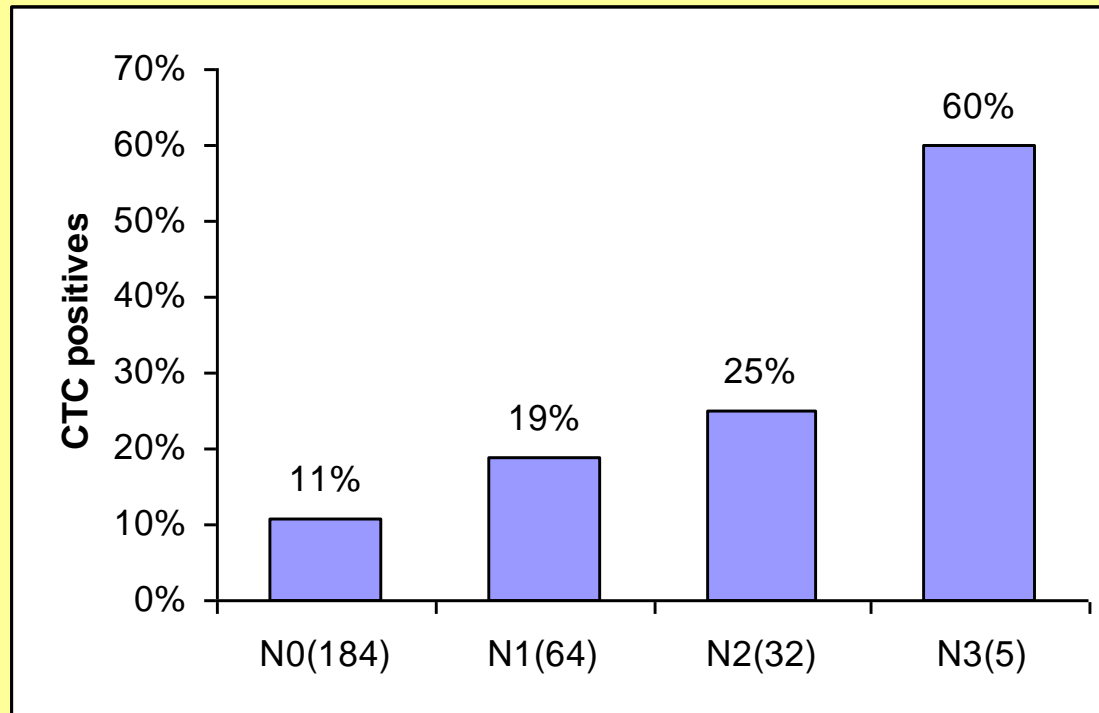


Wulfing, P. et al. Clin Cancer Res 2006;12:1715-1720

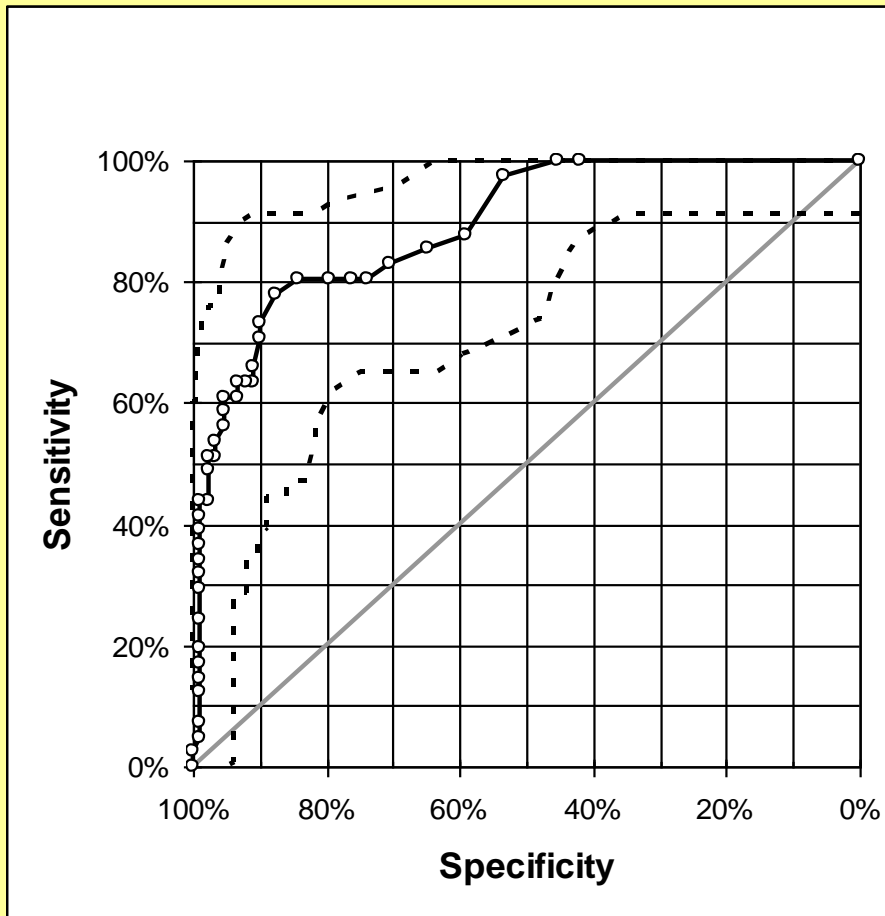
# Staging a CTC



# Nodal Stage



# Specificita ROC Analýza



HD	M1
88	41

ROC CURVE	P1
AUC	0.8907
SE	0.0352
low. CI (0,95)	0.8234
upp. CI (0,95)	0.9389

SPEC	SENS
95%	61.0%
90%	65.9%
80%	80.5%

- CTC

- výpovedný marker pre stanovenie benefitov v priebehu terapie
- použiteľné a nutné pre stratifikáciu rizika

- CTC u pacientiek s MBC

- Nezávislý prognostický faktor
- Vyššia výpovedná hodnota ako pri iných vyšetrovacích metódach

- Budúcnosť

- Lepšia charakteristika CTC fenotypov (profilovanie génovej expresie pre jednotlivé rizikové skupiny)
- Presné stanovenie prediktívnej hodnoty aj pre pacientky s primárnym ochorením

# 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 Res Treat. 2008 Aug 5

[Tewes M](#), [Aktas B](#), [Welt A](#), [Mueller S](#), [Hauch S](#), [Kimmig R](#), [Kasimir-Bauer S](#).

Department of Internal Medicine (Cancer Research), University Hospital Essen,  
University of Duisburg-Essen, 45122, Essen, Germany.

**Purpose** We analyzed circulating tumor cells (CTC) in blood of metastatic breast cancer patients (n = 42) and determined the ability of this method to predict therapy response. **Methods** CTC from blood were analyzed before and during therapy for EpCAM, MUC1 and HER2 transcripts with the AdnaTest BreastCancer. The estrogen (ER) and progesterone (PR) receptor expression was assessed by RT-PCR. **Results** The overall detection rate for CTC was 52% (thereof 86% EpCAM; 86% MUC1; 32% HER2; 35% ER; 12% PR). CTC were ER, PR and HER2 negative in 45% (ER), 78% (PR) and 60% (HER-2) of patients with steroid receptor-positive tumors. 29% of patients with HER2-negative tumors had HER2-positive CTC. The test predicted therapy response in 78% of all cases. Persistence of CTC significantly correlated with shorter overall survival (P = 0.005). **Conclusions**

**Molecular profiling of CTC may offer superior prognostic information with regard to risk assessment for recurrence and predictive judgement of therapeutical regimens.**



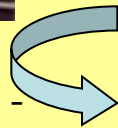
# Cíle projektu: sledování exprese genů v cirkulujících nádorových buňkách (CTC) u karcinomu prsu jako součást procesu individualizace léčby a časně detekce metastatického procesu



# Česká Republika – Praha



Laboratory of Immunology -  
Oncology VFN a 1. LF UK  
U nemocnice 2 , Prague



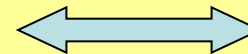
Tumor biology, 3.LF UK, Prague



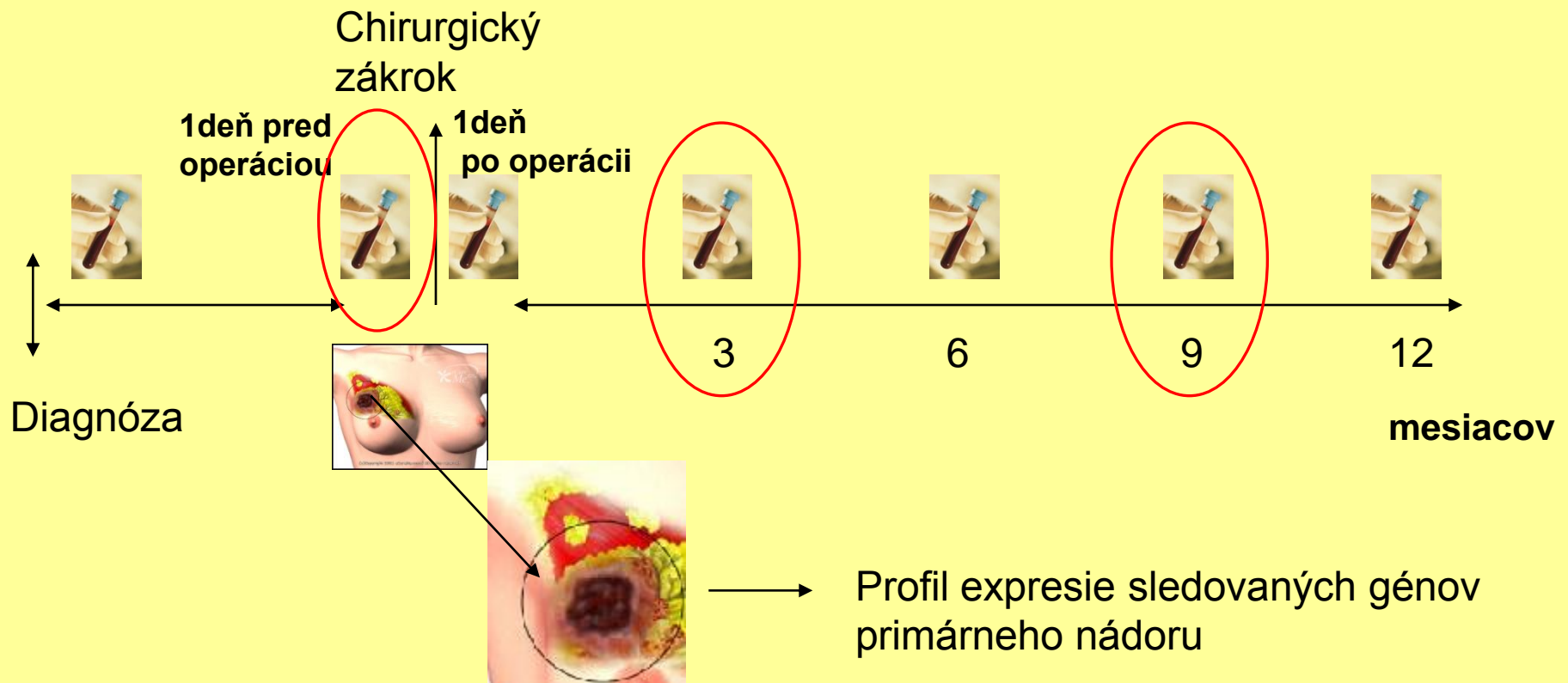
Faculty Hospital Královské Vinohrady Prague  
Radiotherapy and Oncology



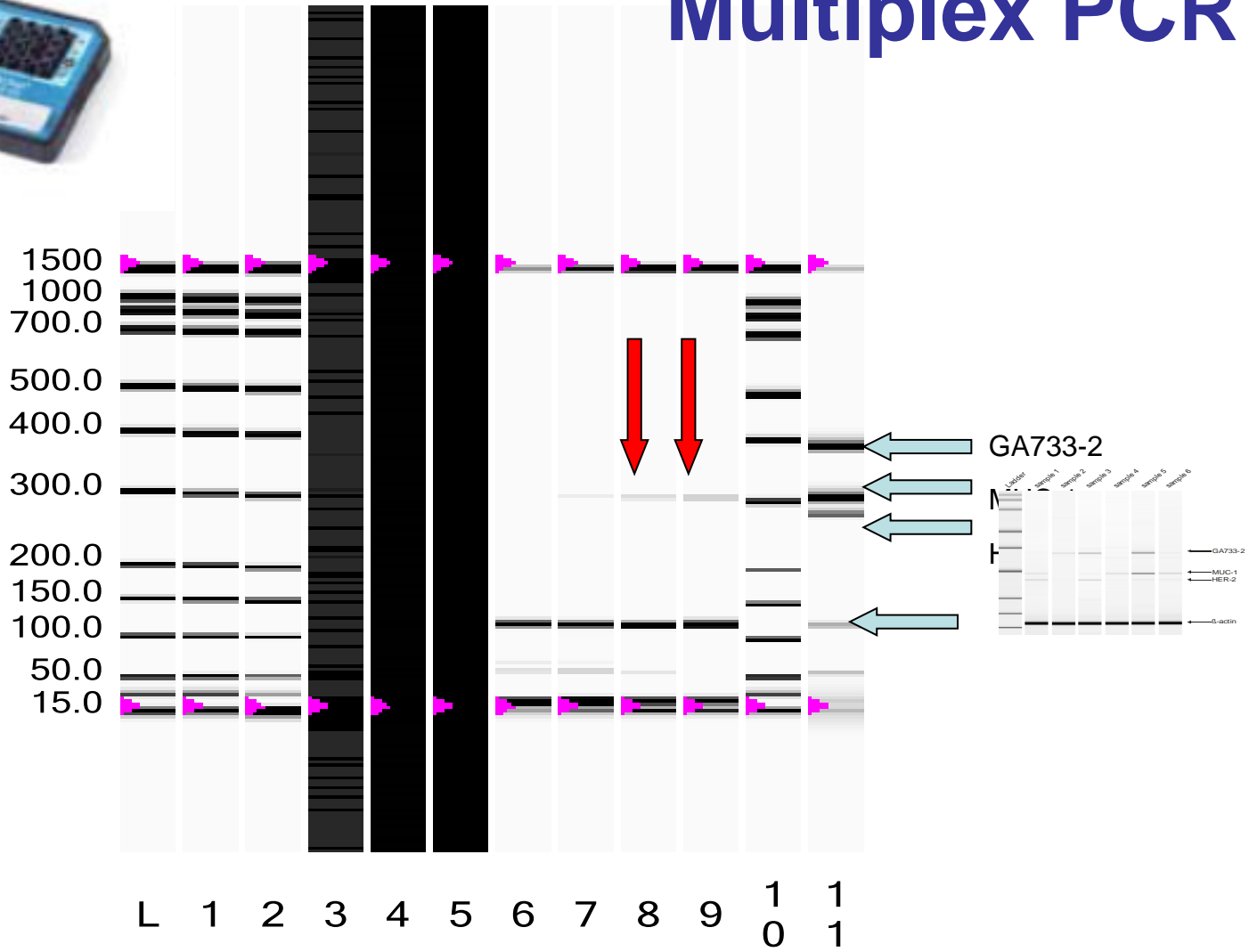
Academy of Sciences Dr. Kubista, Prague  
Sweden TAATA biocenter



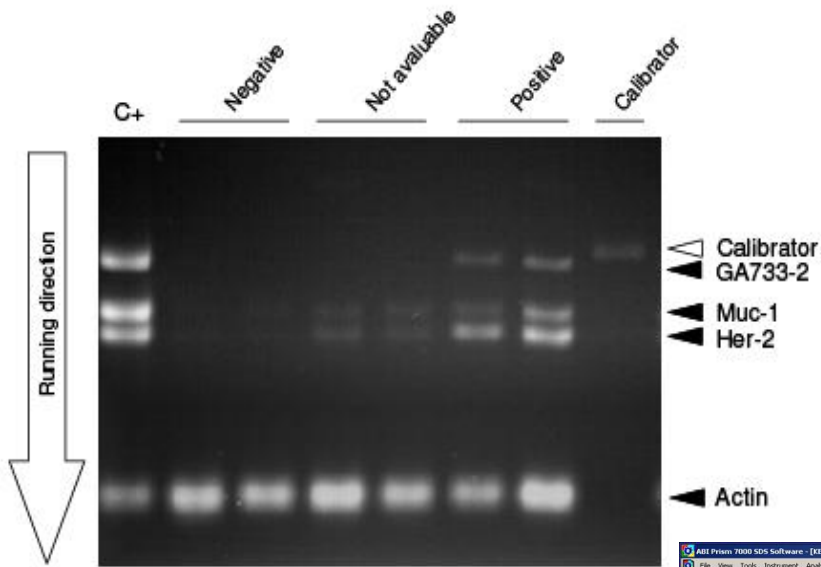
# Projekt



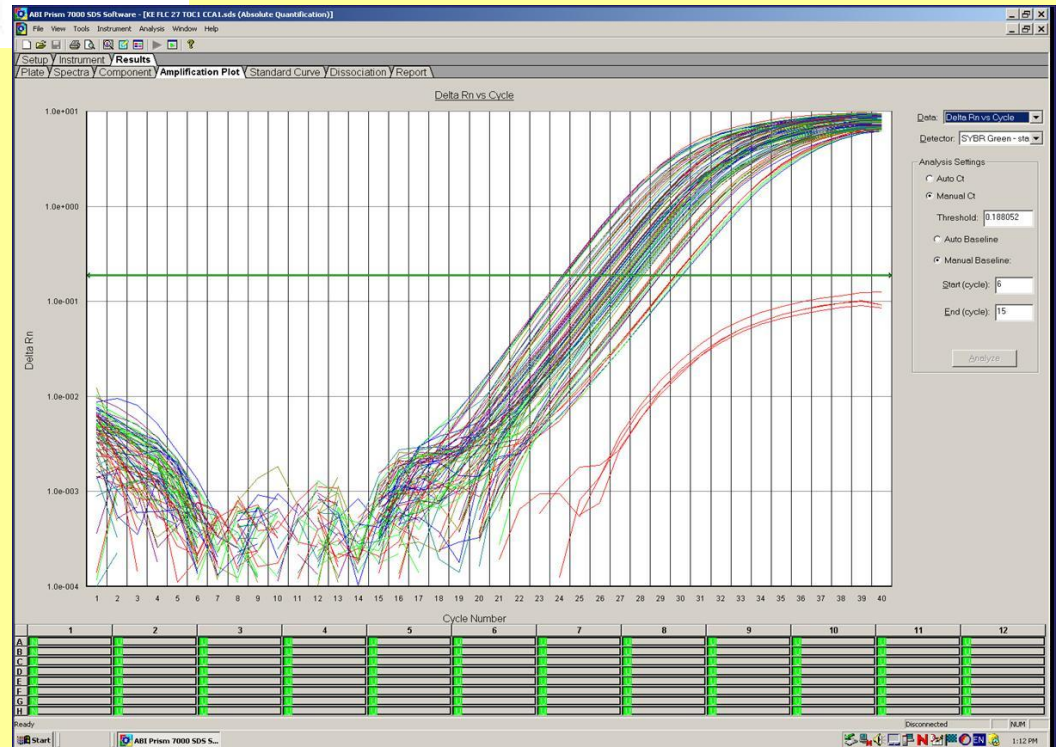
# Multiplex PCR



# Alternatív



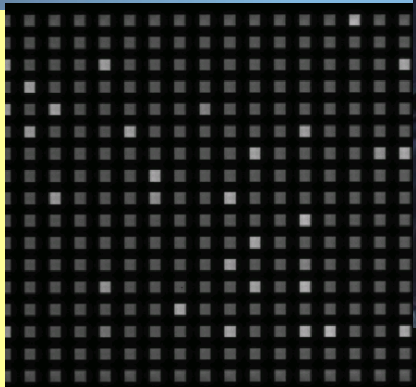
qRT-PCR



# High-Density Microfluidic PCR



- 48 vzoriek x 48 reakcií x 2 farby
- 2304 reakcií
- 10 nl objem reakcie
- vysoká senzitivita – 24 génov z jednej vzorky



Ďakujeme 😊

- ASCOMED, spol. s r. o.  
Innogenetics Inc



Pod Cihelnou 6/664  
161 00 Praha 6  
tel.: +420 233 313 578  
fax: +420 233 313 582  
e-mail: [asco@ascomed.cz](mailto:asco@ascomed.cz)

- Egis Praha, spol. s r.o.



Ovocný trh 1096/8  
110 00 Praha 1  
tel: (420) 227 129 111  
fax: (420) 227 129 199  
DIČ: CZ63982722

*Kde sa o vyšetrení dozviete viac ?*

**onkologie.ctc@seznam.cz**