

Krążące komórki nowotworowe – znaczenie kliniczne u chorych na raka jajnika

Circulating tumor cells (CTCs) – clinical significance in patients with ovarian cancer

Magnowski Piotr¹, Bochyński Hubert¹, Nowak-Markwitz Ewa¹, Zabel Maciej², Spaczyński Marek¹

¹ Klinika Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Polska

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Polska

Streszczenie

Krążące komórki nowotworowe (ang. Circulating Tumor Cells – CTCs) są krążącymi we krwi obwodowej komórkami uwolnionymi z guza pierwotnego. Uważa się, że CTCs są ważnym elementem w biologii powstawania przerzutów nowotworowych. Pojawienie się CTCs jest sygnałem zagrożenia powstawania przerzutów drogą układu krwionośnego. W przyszłości, ich oznaczanie może być użyte jako biomarker do oceny progresji oraz nawrotów procesu nowotworowego. Obecność CTCs we krwi obwodowej została opisana w różnych nowotworach i wykazano możliwość ich wykorzystania w postępowaniu klinicznym.

Rak jajnika jest szczególnym nowotworem, ponieważ rozrasta się i daje nawroty głównie w jamie brzusznej. Rzadko powstają przerzuty drogą krwionośną. Istniejące dane sugerują, że u chorych na raka jajnika CTCs mogą być czynnikiem prognostycznym odpowiedzi terapeutycznej na chemioterapię, nawrotu choroby, czasu remisji oraz całkowitej długości przeżycia.

W przyszłości, ocena i analiza molekularna CTCs może również stanowić nieinwazyjny test dla wykrycia wczesnej fazy choroby, niemożliwej do rozpoznania za pomocą obecnie dostępnych narzędzi diagnostycznych. Wykrywanie CTCs powinno się także przyczynić do poprawy wyników leczenia chorych poprzez zastosowanie usprawnionego systemu diagnostyki oraz monitorowania terapii pacjentów, umożliwiającego w uzasadnionych przypadkach niezwłoczne wdrożenie leczenia lub jego zmianę.

Słowa kluczowe: **krążące komórki nowotworowe / rak jajnika / chemioterapia /**

Adres do korespondencji:

Piotr Magnowski
Klinika Onkologii Ginekologicznej UM
Polska, 60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel. +61 841 92 71
fax: +61 841 94 65
e-mail: piotrek.magnowski@poczta.fm

Otrzymano: 08.12.2011
Zaakceptowano do druku: 20.03.2012

Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) are cells released from the primary tumor and circulating in peripheral blood. CTCs are an important element in the process of understanding the biology of metastases. In the future CTCs may be used as biomarkers for the assessment of neoplastic process progression and recurrence. The CTCs presence in peripheral blood was described in various tumors, and the possibility of their use in clinical procedures was demonstrated. The appearance of CTCs is a sign of metastasis formation and its spread via the circulatory system.

Ovarian cancer is a special type of tumor as it grows and recurs mainly in the abdominal cavity. Despite advances in therapeutic methods, more than half of the patients with ovarian cancer experience disease recurrence which cannot be cured. Therefore, it is important to seek better treatment strategies for patients with advanced disease. There is evidence that CTCs in patients with ovarian cancer may be associated with the appearance of recurrences, disease-free time and total survival time. Detection and molecular analysis of CTCs may also be a non-invasive test for detecting an early stage of the disease, impossible to diagnose using currently available diagnostic tools. Monitoring can also be a prognostic factor enabling the evaluation of the therapeutic response. CTCs detection will contribute to better patient outcomes by using an improved system of diagnosis and monitoring of patient therapy, allowing for immediate implementation or change of the treatment when necessary.

Key words: **circulating tumor cells / ovarian cancer / chemotherapy /**

Rak jajnika jest trzecim pod względem częstości występowania nowotworem narządów płciowych u kobiet w Polsce [1]. Według raportów Centralnego Rejestru Nowotworów w 2009 roku zachorowały 3204 kobiety a zmarło 2510 [2].

Odsetek pięcioletnich przeżyć dla wszystkich stopni zaawansowania tego nowotworu wynosi poniżej 20% [3]. Według bazy danych Survival, Epidemiology and End Results (SEER) obserwuje się marginalną poprawę we wskaźnikach śmiertelności dla kobiet z rakiem jajnika z 10 na 100 000 populacji do nieco ponad 9 na 100 000 populacji w ciągu ostatnich 30 lat [4].

Podstawową przyczyną tak wysokiej śmiertelności jest wykrywanie tego nowotworu w wysokim stopniu klinicznego zaawansowania, co w sposób oczywisty związane jest z gorszą prognozą przeżycia tych pacjentek. Pomimo tego, że u większości chorych, u których wykonano optymalną operację cytoredukcyjną osiąga się, po zakończeniu chemioterapii remisję kliniczną, większość kobiet doświadcza nawrotu choroby. Znane obecnie czynniki prognostyczne wystąpienia nawrotu są mało precyzyjne i nigdy nie wiadomo, czy i kiedy należy się spodziewać kolejnego rzutu choroby. W związku z tym w wielu ośrodkach na świecie próbuje się wykorzystać różne metody: molekularne, genetyczne i kliniczne w celu wypracowania prognostycznego modelu nawrotu raka. Jedną z nich jest wykrywanie krążących komórek nowotworowych (ang. *circulating tumor cells* – CTCs).

Krążące komórki nowotworowe

CTCs są komórkami oddzielnymi od guza pierwotnego i krążącymi we krwi obwodowej. Istnieje szereg danych świadczących o fakcie obfitego uwalniania komórek nowotworowych z guza pierwotnego i krążenia ich w krwiobiegu. CTCs wydają się być kluczowym czynnikiem do zrozumienia biologii przerzutów i mogą stanowić biomarker progresji i wznowy procesu nowotworowego. Już w 1868 roku Thomas Ashworth obserwował krążące komórki nowotworowe w krwi mężczyzny z przerzutami nowotworowymi [5]. Porównanie morfologii krążących komórek z komórkami guza pozwoliło Ashworthowi stwierdzić, że jeżeli CTCs pochodzą z guza to muszą przechodzić przez większą część układu krążenia.

Dzisiaj, badania pokazują kluczową rolę CTCs w powstawaniu przerzutów nowotworowych [6]. Mechanizm ten nie jest jednak całkowicie wyjaśniony. Wiadomo, że pojedyncze komórki nowotworowe lub ich agregaty mogą wnikać do naczyń krwionośnych lub chłonnych z guza pierwotnego. Naciekanie przestrzeni okołonaczyniowych jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym wyleczenia chorych. Zdolność CTCs do wzrostu w guz jest jednak ograniczona, ponieważ wraz ze zmianą lokalizacji zmienia się ich mikrośrodowisko [7]. Nie wiadomo, dlaczego część CTCs jest zdolna zasiedlać i rozwijać się w guz w pewnych narządach a w innych podobny proces nie zachodzi. Nie znamy także warunków, jakie powinno spełniać mikrośrodowisko, aby doszło do nowotworowej proliferacji komórek.

Wykrywanie CTCs, a właściwie ich rozpoznawanie spośród innych komórek obecnych w krwi jest przedmiotem licznych badań. Dotychczas stosowane strategie wykrywania CTCs opierają się na ocenie antygenu adhezyjnego komórek nabłonkowych (ang. *epithelial cell adhesion molecule*-EPCAM). Antygen ten nie występuje fizjologicznie na nienowotworowych komórkach obecnych we krwi. Do oznaczania CTCs używa się testu CellSearch Circulating Tumor Cells Test (Veridex LLC, San Diego, CA), który jako pierwszy został dopuszczony do użycia przez FDA [8]. Wykrywanie CTCs przy zastosowaniu EPCAM jest efektywne, jednak zauważono, że jego ilość na powierzchni CTCs spada w procesie odróżnicowywania się komórek nabłonkowych, co często ma miejsce przy rozpoczęciu procesu migracji komórek nowotworowych. Wykazano między innymi, że niektóre komórki nowotworowe raka piersi charakteryzujące się dużą ekspansją nie są przez niego rozpoznawane [9]. Metoda jest jednak stosowana i wykorzystując tę technikę wykazano kliniczną wartość oznaczeń CTCs w raku piersi, raku jelita grubego i raku prostaty. U chorych z tymi nowotworami, zależnie od obecności CTCs różnił się czas przeżycia [10].

Dane z piśmiennictwa dotyczące możliwości a przede wszystkim efektywności izolacji CTCs za pomocą metod wykorzystujących EPCAM są nieliczne. Wydaje się, że wynika to z faktu bardzo niewielkiej liczby krążących komórek nowotworowych (CTCs), co powoduje, że trudno je „złapać” w odpowiedniej ilości.

Nie ma dotychczas opracowanej technologii gromadzenia CTCs z krwi obwodowej. Pojawiające się doniesienia dotyczą w zasadzie dwóch metod izolacji CTCs - immunomagnetycznej (MACS) oraz izolacji w komorach mikroprzepływowych. Izolację magnetyczną przeprowadza się za pomocą cząstek żelaza opłaszczonych przeciwciałami przeciwko antygenom nowotworowym. W mikroprzepływowych komorach ich ściany są pokryte przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom nowotworowym obecnym na CTCs. W jednym i drugim systemie w warunkach *in vitro* z pozytywnym efektem stosowano użycie przeciwciał przeciwko antygenowi Ep-CAM [11].

W opublikowanych do tej pory badaniach oceniono, że rosący guz uwalnia około 10^5 do 3×10^6 CTCs/dzień/gram tkanki nowotworowej [12]. Stąd też ocena liczby CTCs we krwi obwodowej może stanowić jedną z najczulszych metod oceny choroby resztkowej [13]. W jednych z badań wykazano, że analiza CTCs może prognozować wynik leczenia licznych nowotworów włączając w to raka piersi, prostaty czy raka jelita grubego [14,15]. Konsekwentnie wkłada się wiele wysiłku, aby usprawnić metody wykrywania CTCs we krwi chorych na nowotwory złośliwe [16].

CTCs u chorych na raka jajnika

Teoria, że rozsiew nowotworu złośliwego jajnika przez krew może odgrywać istotną rolę w progresji tego nowotworu została zapoczątkowana przez Cain w 1990 roku [17]. Od tego czasu tylko w niewielu pracach wykazano związek pomiędzy CTCs we krwi obwodowej w powiązaniu z długością przeżycia chorych na raka jajnika [18,19]. Nowotwór złośliwy jajnika przez długi czas jest pozornie ograniczony do jamy otrzewnej. Ocenia się jednak, że około 50% pacjentek z chirurgicznie udokumentowaną całkowitą odpowiedzią na leczenie doświadcza nawrotu choroby. Ukryte hematologiczne mikroprzerzuty są częste w większości nowotworów nabłonkowych i są znajdowane u około 30% chorych w szpiku kostnym pacjentek z rakiem jajnika. Wykazano, że CTCs w szpiku kostnym u chorych na raka jajnika są związane z wystąpieniem nawrotu, czasem przeżycia wolnym od choroby i długością przeżycia [20].

Niewiele jest prac oceniających wykrywanie i znaczenie kliniczne występowania CTCs u chorych na raka jajnika.

W pracy He i wsp. zastosowano połączenie dwóch wysoko-czułych specyficznych dla guza ligandów: folate-AlexaFluor488 i DUPA-FITC, które wiążą komórki guza ponad 20 razy bardziej efektywnie niż przeciwciała znakowane fluorescencyjnie [21]. CTCs były wykrywane u 18/20 chorych z rakiem jajnika, podczas gdy liczba CTCs w porównywalnej grupie zdrowych ochotników była nieistotna.

W pracy Obermayr i wsp. podjęto próbę identyfikacji nowych markerów w oparciu o PCR do wykrywania CTCs u kobiet z nowotworami narządów płciowych [22]. Spośród wielu ocenianych genów sześć z nich wykazywało nadekspresję: CCNE2, DKFZp762E1312, PPIC, EMP2, MAL2, SLC6A8. Panel tych sześciu genów był lepszy niż tradycyjnie stosowany EpCAM czy hMAM do wykrywania CTCs we krwi obwodowej chorych na raki narządów płciowych. Autorzy zauważyli, że detekcja CTCs w oparciu o analizę antygenów nabłonkowych może być ograniczona przez genetyczną heterozygotyczność guza pierwotnego i utratę antygenów nabłonkowych. Obecność CTCs potwierdzono u 19% pacjentek z rakiem jajnika.

Celem badania Fehm i wsp. była ocena obecności CTCs w szpiku kostnym u chorych z nowotworami złośliwymi narządów płciowych oraz korelacja obecności CTCs z innymi, powszechnie stosowanymi czynnikami prognostycznymi [23]. Do identyfikacji CTCs zastosowano metodę immunocytochemiczną z zastosowaniem przeciwciał CK (cytokeratynowych A45B/B3). CTCs wykryto w szpiku kostnym u 36% z rakiem jajnika. Obecność CTCs była istotnie skorelowana z stopniem zaawansowania nowotworu. Pojawienie się nawrotu choroby oceniono na 14% u chorych z CK pozytywnymi komórkami w porównaniu z 8% z CK negatywnymi pacjentkami.

Celem opracowania Marth i wsp. była ocena możliwego prognostycznego znaczenia CTCs wykrywanych we krwi obwodowej i szpiku kostnym u pacjentek z rakiem jajnika przy zastosowaniu metody immunomagnetycznej. Autorzy wykryli CTCs w szpiku kostnym u 21% chorych na raka jajnika. Średnia czasu przeżycia wynosiła 25 miesięcy w porównaniu do 28 dla pacjentek bez wykrywanych CTCs.

W badaniu Judson i wsp. podjęto próbę oceny występowania CTCs (metodą immunomagnetyczną) u chorych na raka jajnika lub raka otrzewnej we krwi obwodowej w czasie rozpoznania choroby i nawrotu choroby w powiązaniu z oceną istotności prognostycznej CTCs. Znalezione CTCs u 18,7% kobiet chorych na raka jajnika. Kobiety z CTCs miały istotnie częściej wyższy stopień morfologicznej złośliwości nowotworu. W trakcie średniej czasu obserwacji (18,7 miesięcy) wykazano, że czasy przeżycia nie różniły się istotnie pomiędzy pacjentkami z obecnością i brakiem CTCs.

Celem badania Fan i wsp. była ocena związku inwazyjnych CTCs wykrywanych przy pomocy nowej metody w powiązaniu ze stopniem zaawansowania raka jajnika, stężeniem CA125 i długością przeżycia pacjentek [24]. Analizowano występowanie inwazyjnych komórek krążących przy zastosowaniu CAM (ang. *cell adhesion matrix*) - u 71 pacjentek we krwi obwodowej. Inwazyjne komórki krążące były identyfikowane jako komórki wykazujące zdolność do inwazji macierzy międzykomórkowej (CAM+) i wykazujące ekspresję standardowego markera nabłonkowego. Przeanalizowano kliniczne parametry, takie jak: stopień zaawansowania nowotworu, stopień morfologicznej złośliwości, typ histologiczny guza, stężenie CA125 oraz związek tych cech z całkowitym przeżyciem i czasem wolnym od choroby. CTCs wykryto u 60,6% chorych. Nie znaleziono CTCs u żadnej z pięciu pacjentek ze zmianami niezłośliwymi. Wykazano CTCs tylko u jednej chorej na 10 z wczesnym stopniem zaawansowania raka jajnika oraz u 73,1% z rakiem zaawansowanym. Liczba znajdowanych CTCs wahała się od 0-149 CTCs/ml u chorych z FIGO III/IV w porównaniu do 0-41,3 CTCs/ml w stopniach FIGO I/II. Udowodniono pozytywną korelację pomiędzy liczbą CTCs a stężeniem CA125. Stwierdzono istotne skrócenie czasu wolnego od choroby u pacjentek z wykrywalnymi CTCs. Średnia przeżycia wynosiła u nich 15 miesięcy w porównaniu z 35 miesięcy u chorych bez stwierdzonych CTCs. Nie wykazano związku pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym guza a wykrywaniem CTCs.

W pracy Wimberger i wsp. oceniano występowanie CTCs w szpiku kostnym i krwi obwodowej przed oraz po pierwszorazowej chemioterapii opartej o karboplatynę i paklitaxel [25]. Badaniu poddano 57 chorych na pierwotnego raka jajnika. W wykrywaniu CTCs zastosowano antygen nabłonkowy EpCAM. CTCs były wykrywane metodą immunocytochemiczną przy

zastosowaniu przeciwciała antycytkeratinowego Ig A45-B/B3. Przed chemioterapią zidentyfikowano CTCs u 21% chorych we krwi obwodowej i u 54% w szpiku kostnym. Po chemioterapii CTCs we krwi znaleziono tylko u jednej pacjentki, ale w szpiku u 50% chorych. W badaniu wykazano, że u pacjentek z istotnym wzrostem CTCs występuje istotne skrócenie PFS- czasu wolnego od nawrotu choroby (*progression free survival* – PFS).

Celem badania Banys i wsp. było ocenienie występowania CTCs w szpiku i ich znaczenia prognostycznego u chorych z nowotworami złośliwymi narządów płciowych [26]. CTCs były identyfikowane przy zastosowaniu metody immunocytochemicznej, stosowano przeciwciała pancytkeratinowe A45B/B3 i cytomorfologię. CTCs wykryto u 19% badanych pacjentek ze złośliwymi nowotworami ginekologicznymi. Występowanie CTCs u chorych z rakiem jajnika oceniono na 25%. Zajęcie szpiku kostnego przez CTCs u chorych z rakiem jajnika związane było z istotnie krótszym czasem wolnym od choroby.

Perspektywy na przyszłość

W oparciu o istniejące dane należy stwierdzić, że wykrywanie CTCs u chorych na raka jajnika wydaje się być nową, obiecującą metodą, szczególnie w aspekcie prognozowania przebiegu choroby. Dotychczas w niewielu pracach udało się wykazać związek pomiędzy CTCs a stopniem zaawansowania raka i długością przeżycia. Także wartość prognostyczna CTCs we wczesnych postaciach choroby nie jest obecnie znana. Ocena profilu ekspresji genów w CTCs może być pomocna w określeniu czynników prognostycznych odpowiedzi na leczenie i długości przeżycia chorych.

Profilowanie genetyczne CTCs może dać sposobność do wypracowania metod indywidualizacji terapii u chorych. Jednak wydaje się, że pierwszym elementem badań powinno być wypracowanie efektywnej metody izolacji CTCs z krwi obwodowej. Metody działające w oparciu o przeciwciała wykrywają CTCs na poziomie 12-18%. W kolejnych etapach należy przeprowadzić badania kliniczne potwierdzające skuteczność i przydatność tej nowej metody.

10. Miller M, Doyle G, Terstappen L. Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch System in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *J Oncol*. 2010, 2010, 617421.
11. Nagrath S, Sequist L, Maheswaran S, [et al.]. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007, 450, 1235-1239.
12. Butler T, Gullino P. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1975, 35, 512-516.
13. Cristofanilli M, Hayes D, Budd G, [et al.]. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005, 23, 1420-1430.
14. Cohen S, Alpaugh R, Gross S, [et al.]. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2006, 6, 125-132.
15. Moreno J, Miller M, Gross S, [et al.]. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology*. 2005, 65, 713-718.
16. Krivacic R, Ladanyi A, Curry D, [et al.]. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101, 10501-10504.
17. Cain J, Ellis G, Collins C, [et al.]. Bone marrow involvement in epithelial ovarian cancer by immunocytochemical assessment. *Gynecol Oncol*. 1990, 38, 442-445.
18. Marth C, Kistic J, Kaern J, [et al.]. Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer*. 2002, 94, 707-712.
19. Judson P, Geller M, Bliss R, [et al.]. Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognosis significance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2003, 91, 389-394.
20. Schindlbeck C, Hantschmann P, Zerzer M, [et al.]. Prognostic impact of Ki67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisomerase II alpha, epidermal growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow. *Int J Gynecol Cancer*. 2007, 17, 1047-1055.
21. He W, Kularatne S, Kalli K, [et al.]. Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands. *Int J Cancer*. 2008, 123, 1968-1973.
22. Obermayr E, Sanchez-Cabo F, Tea M, [et al.]. Assessment of six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients. *BMC Cancer*. 2010, 10, 666.
23. Fehm T, Becker S, Bachmann C, [et al.]. Detecting of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol*. 2006, 103, 942-947.
24. Fan T, Zhao Q, Chen J, [et al.]. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009, 112, 185-191.
25. Wimberger P, Heubner M, Otterbach F, [et al.]. Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2007, 107, 331-338.
26. Banys 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.

Piśmiennictwo

1. Synowiec A, Wcisło G, Bodnar L, [et al.]. Surgical treatment in ovarian cancer prevention in carriers of the BRCA1/BRCA2 mutation. *Ginekol Pol*. 2012, 83, 51-56.
2. http://85.128.14.124/km/std_zach_rozp/default.asp
3. Roett M, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*. 2009, 80, 609-616.
4. SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results Program 2004.
5. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J*. 1869, 14, 146-149.
6. Maheswaran S, Haber D. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev*. 2010, 20, 96-99.
7. Ruiter D, van Krieken J, van Muijen G, et al. Tumor metastasis: is tissue an issue? *The Lancet Oncology*. 2001, 2, 109-112.
8. Patent FDA. Medical devices; immunology and microbiology devices; classification of the immunomagnetic circulating cancer cell selection and enumeration system. Final rule. *Fed Regist*. 2004, 69, 26036-26038.
9. Sieuwerts A, Kraan J, Bolt J, [et al.]. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009, 101, 61-66.