

## Cirkulujúce nádorové bunky ako markery využiteľné pri manažmente pacientov s nádorovými ochoreniami

Tatiana Sedláčková<sup>1</sup>, Gabriel Minárik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Komenského Lekárska fakulta, Bratislava

<sup>2</sup>Lekárska genetika, Medirex, a. s., Bratislava

Nádorové bunky majú schopnosť špecifickej dediferenciácie a vďaka tomu môžu získať vlastnosti umožňujúce ich uvoľnenie z primárneho nádoru do cirkulácie, kde dokážu dlhodobo prežívať a stávajú sa z nich cirkulujúce nádorové bunky. Tie majú preukázateľný potenciál vytvárať metastázy, a to vo forme jednotlivých buniek aj ako ich aglomeráty. Možnosť ich identifikácie a kvantifikácie má preto významnú prognostickú hodnotu, pričom tá sa na základe už dostupných metód schválených autoritami vo vyspelom svete využíva v rámci prognostiky, napr. u pacientov s rakovinou prsníka. V súčasnosti bežia viaceré klinické štúdie, ktoré s veľkou pravdepodobnosťou preukážu aj prediktívnu hodnotu analýzy prítomnosti a množstva cirkulujúcich nádorových buniek u pacientov s rôznymi onkologickými ochoreniami a prispievajú k rozvoju neinvazívnych analýz prostredníctvom tzv. tekutej biopsie. **Kľúčové slová:** cirkulujúce nádorové bunky, metastázovanie, tekutá biopsia

### *Circulating tumour cells as markers usable in management of patients with oncological diseases*

Tumour cells have the ability of specific form of dedifferentiation, and thus they can acquire properties enabling their release from the primary tumour to circulation, where they can survive for a long time and become circulating tumour cells. These have the demonstrable potential to produce metastases, both in the form of single cells as well as their agglomerates. The possibility of their identification and quantification has, therefore, a significant prognostic value, which is based on already available and authority-approved methods also used in clinical routine, e. g. in patients with breast cancer. Moreover, there are ongoing several clinical trials that are likely to prove the predictive value of such analysis in patients with various oncological diseases and will contribute to the development of non-invasive tests working as part of the tests performed as so-called liquid biopsies.

**Keywords:** circulating tumour cells, cancer metastasis, liquid biopsy

NewsLab, 2018; roč. 9 (2): 108 – 112

### Cirkulujúce nádorové bunky

Cirkulujúce nádorové bunky (CTC) sú bunky uvoľňované do krvného riečiska z primárneho nádoru už včasne počas jeho formovania a rastu a/alebo jeho metastázami. Sú preukázateľne asociované s metastázovaním, pričom sú schopné invázie do okolia cez extracelulárnu matrix a vrstvy stromálnych buniek, nasleduje intravazácia týchto buniek do lúmenu ciev, ich transport krvným riečiskom, zachytenie v inej vzdialenej lokalite a následná extravazácia do parenchýmu vzdialeného tkaniva. Bunky ďalej prežívajú v novom mikroprostredí a majú potenciál tvorby mikrometastáz, ak znovu spustia svoj proliferatívny program na danom mieste, čím dávajú vznik makroskopickým, klinicky detegovateľným neoplastickým útvarom<sup>(1)</sup>.

Z cytologického pohľadu sú CTCs heterogénnou skupinou buniek obsahujúcou životaschopné, apoptické, dormantné (spiace) bunky, ako aj bunky schopné založiť metastázu. Ich vnútrobunkové zmeny môžu viesť k vzniku diseminovaných nádorových buniek (DTCs), ktoré sú považované za samotné mikrometastázy. Kým CTCs sú nádorové bunky prítomné v krvnom obehú onkologických pacientov, DTCs sú nádorové bunky, ktoré sa už usídlili v cieľovom tkanive, napríklad v kostnej dreni. DTCs sú najčastejšie detegované a opísané práve v kostnej dreni onkologických pacientov. Jedným z dôvodov je aj to, že tento orgán je ľahšie prístupný pre biopsiu

v porovnaní s inými orgánmi, ako je pečeň, pľúca alebo mozog. DTCs môžu zostať v spiacom stave aj niekoľko rokov po odstránení primárneho nádoru a následne vyvolať vznik metastáz<sup>(2)</sup>. Navyše, DTCs z týchto metastáz sa môžu opätovne uvoľniť do krvného obehu a šíriť sa jeho prostredníctvom do ďalších vzdialených tkanív a vytvárať tak sekundárne metastázy. Dokonca takéto DTCs konvertované späť na CTCs môžu kolonizovať primárny nádor a už existujúce metastázy v procese nazývanom samovýsev (self-seeding), čím dávajú možnosť vzniku agresívnych typov metastáz<sup>(3)</sup>.

### Koncentrácia CTCs

Predpokladá sa, že jeden gram nádorovej masy uvoľňuje denne desaťtisíce CTCs do krvného obehu<sup>(4)</sup>. Ich životnosť v cirkulácii je však časovo veľmi obmedzená a pohybuje sa v rozmedzí 1 – 2,4 hodiny<sup>(5)</sup>. Odhaduje sa, že len asi 1 z 1 000 buniek zostáva v cirkulácii životaschopných a len 1 z 10 000 z týchto CTCs je schopných vytvoriť metastázy<sup>(6)</sup>. Je to tak pre nutnosť prekonania vplyvu hemodynamických síl a pôsobenia buniek imunitného systému (predovšetkým NK buniek)<sup>(4)</sup>. Navyše k tomu prispieva strata kontaktu s okolitými bunkami, a tým spôsobená smrť v procese anoikózy. Vo výsledku sú preto CTCs v periférnej krvi prítomné vo veľmi nízkej koncentrácii, ktorá sa pohybuje medzi 1 – 10 bunkami na 10 ml krvi u väčšiny onkologických pacientov<sup>(7)</sup>.

## Prechod CTCs do cirkulácie a epiteliálno-mezenchymálny prechod

CTCs sa môžu do cirkulácie dostať dvomi spôsobmi, a to aktívne – vycestovaním buniek so zvýšeným migračným potenciálom, alebo pasívne – uvoľňovaním buď jednotlivých buniek, prípadne bunkových zhlukov. Biologicky významnejšie sú práve tie CTCs, ktoré sú schopné aktívne vycestovať, čo je spojené s ich vstupom do procesu epiteliálno-mezenchymálneho prechodu (EMT)<sup>(8)</sup>.

Epiteliálno-mezenchymálny prechod je proces, ktorý sa fyziologicky uplatňuje počas embryogenézy a zahŕňa migráciu ektodermálnych buniek v embryu počas gastrulácie za vzniku mezodermu (EMT typu I)<sup>(9)</sup>. V neskoršom období hrá veľmi dôležitú úlohu počas hojenia rán, regenerácie tkanív a fibrózy orgánov (EMT typu II)<sup>(10)</sup> a z pohľadu nádorového tkaniva je spojený s metastatickým šírením (EMT typu III). Umožňuje diferencovaným epitelovým bunkám, ktoré interagujú s bazálnou membránou prostredníctvom ich povrchu, podstúpiť také biologické zmeny, ktoré im umožňujú získať fenotyp mezenchymálnych buniek. Ten zahŕňa zvýšenú migračnú kapacitu, invazívnosť, zvýšenú odolnosť proti apoptóze a značne zvýšenú produkciu zložiek extracelulárnej matrix (ECM)<sup>(8)</sup>. Dokončenie EMT je signalizované degradáciou bazálnej membrány a vytvorením mezenchymálnych buniek, ktoré sú schopné migrovať z epitelovej vrstvy, z ktorej vznikli (**obrázok 1**).

EMT je zložitý proces, do ktorého je zapojených viacero signálnych dráh, pretože bunky musia prejsť funkčnými aj morfológickými zmenami. EMT môže byť indukovaný

rôznymi mechanizmami, medzi ktoré patrí zápal, acidóza, hypoxia, rastové faktory a v neposlednom rade aj vplyv mikroprostredia nádoru, ktoré môže stimulovať bunkovú migráciu a inváziu. Na druhej strane však ide o reverzibilný proces, keď cirkulujúce nádorové bunky po dosiahnutí vzdialeného orgánu a extravazácii do jeho parenchýmu získavajú znovu fenotyp epiteliálnych buniek v procese nazývanom mezenchymálno-epiteliálny prechod (MET), aby mohli ďalej proliferovať ako epiteliálne metastatické depozity.

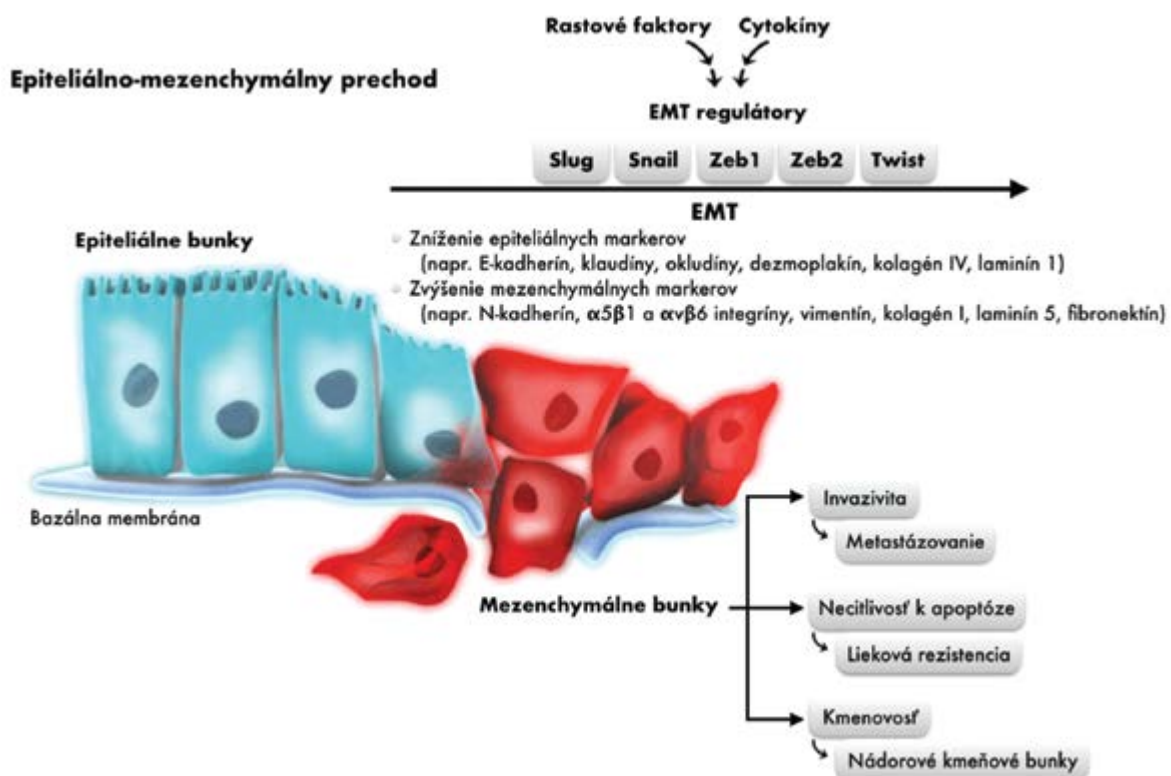
## Nádorové kmeňové bunky

Malá časť nádorových buniek vykazuje vlastnosti dospelých kmeňových buniek, čiže majú schopnosť samoobnovenia, sú multipotentné a dávajú tak možnosť vzniku diferencovaných nádorových buniek a sú schopné iniciovať rast nádoru. Tieto bunky sú označované ako nádorové kmeňové bunky (CSCs), bunky podobné kmeňovým bunkám, prípadne ako bunky iniciujúce nádor a sú spájané s mezenchymálnym fenotypom.

## Cirkulujúce nádorové mikroembólie

Cirkulujúce nádorové bunky môžu v obehu cirkulovať ako samostatné bunky alebo z primárneho tumoru sa môže odlúčiť zároveň viacero buniek, ktoré potom putujú v zhlukoch. Tie môžu obsahovať od dvoch do viac ako 50 buniek a označujú sa ako cirkulujúce nádorové mikroembólie (CTMs). CTMs tvoria buď len nádorové bunky, alebo môžu byť spojené s inými typmi buniek, ako sú fibroblasty, leukocyty, endotelálne bunky, pericyty, krvné doštičky<sup>(12)</sup>. O významnosti CTC

**Obrázok 1.** Schematický prehľad epiteliálno-mezenchymálneho prechodu. Proces EMT je spustený cytokínmi, ktoré regulujú aktivitu efektorových transkripčných faktorov. V dôsledku ich pôsobenia dochádza k významným zmenám cytoskeletu a vo vylučovaní proteínov extracelulárnej matrix, čo sa využíva pri ich detekcii. Upravené podľa Shih a kol., 2011<sup>(17)</sup>.



zhlukov sa dlho diskutovalo, avšak CTMs pochádzajúce od pacientov s malobunkovým karcinómom pľúc vykazovali neprítomnosť apoptických buniek, čo im dávalo výhodu v prežívaní, a tiež nízky podiel proliferatívnych buniek, čím sa stávali rezistentnejšími proti chemoterapii<sup>(13)</sup>. Dôležitým zistením tiež bolo, že bunky nachádzajúce sa v CTMs nevznikli de novo jedinej migrujúcej bunky, ale sú oligoklonálneho pôvodu a hoci sa v cirkulácii vyskytujú oveľa zriedkavejšie ako samostatné CTCs, majú signifikantne vyšší metastatický potenciál (23- až 50x) a ich prítomnosť je spojená so zhoršeným celkovým prežívaním<sup>(14)</sup>.

## Detekcia CTCs

Identifikácia a charakterizácia CTCs si vyžaduje vysokosenzitívne a špecifické metódy, keďže CTCs sa v cirkulácii nachádzajú vo veľmi nízkej koncentrácii, navyše s vysokým pozadím iných krvných buniek (na jednu CTC pripadajú milióny iných krvných buniek). Pri ich detekcii ide zvyčajne o kombináciu izolačných a detekčných metód. Na izoláciu CTCs sa využívajú rôzne technológie, ktoré sú založené na rôznych vlastnostiach CTCs, ktoré ich odlišujú od normálnych hematopoetických buniek. Ide o vlastnosti fyzikálneho (veľkosť, denzita, elektrický náboj, tvarová flexibilita) aj biologického charakteru (expresia proteínov na povrchu buniek, životaschopnosť).

Výhodou technológií využívajúcich fyzikálne vlastnosti je separácia CTCs bez ich farbenia. Patrí sem napr. centrifugácia v hustotnom gradiente (Ficoll, OncoQuick), filtrácia cez špeciálne filtre na základe veľkosti CTCs (ISET), všestranný biočip využívajúci jedinečné rozdiely vo veľkosti a deformovateľnosti nádorových buniek (zachytávané sú väčšie a tuhšie CTCs v porovnaní s krvnými bunkami), fotoakustická prístrojová cytometria, dielektroforéza (DEP)<sup>(15)</sup>.

Medzi technológie využívajúce biologické vlastnosti CTCs patria imunofluorescenčné metódy. V tomto prípade sa používajú protilátky proti nádorovo asociovaným antigénom, keď ide o pozitívnu selekciu, alebo protilátky proti bežnému leukocytovému antigénu CD45, keď ide o negatívnu selekciu. Protilátky proti danému antigénu sú naviazané na magnetických partikulách, ktoré umožňujú separáciu CTCs naviazaných na antigén pôsobením magnetického poľa. Pri pozitívnej selekcii sa zvyčajne využívajú protilátky proti adhezívnej molekule epitelových buniek (EpCAM). CTCs sú následne detegované imunocytologicky protilátkami na cytokeratíny (CKs). Medzi metódy využívajúce na separáciu CTCs EpCAM protilátky patrí systém CellSearch® (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Tento systém umožňuje stanoviť početnosť CTCs epitelálneho pôvodu použitím magnetických partikul pokrytých molekulami EpCAM a CTCs identifikuje podľa morfológických charakteristík, pozitívnej expresie cytokeratínov 8, 18 a/alebo 19 a absencie hematopoetických antigénov CD45<sup>(16)</sup>. Ide o jediný systém, ktorý schválil americký Úrad pre kontrolu liekov a potravín (FDA) ako prostriedok na určenie prognózy u pacientov s metastatickou rakovinou prsníka, prostaty a kolorekta<sup>(17-19)</sup>.

Novými sľubnými metódami založenými na EpCAM sú platformy využívajúce mikrofluidickú technológiu, najmä CTC-čip, Herringbone čip, iCHIP, IsoFlux<sup>(12)</sup>, ktoré umožňujú spracúvať vzorky s veľmi malým objemom.

Biologický význam CTCs epitelálneho pôvodu (EpCAM a bunky pozitívne na cytokeratín) je zrejmy z prognostickej

dôležitosti CTCs, ktoré boli zachytené CellSearch® systémom v rôznych typoch nádorov<sup>(17-19)</sup>. Ak však nejaká časť cirkulujúcich nádorových buniek podstúpi EMT, keď sú downregulované epitelálne markery, a, naopak, upregulované tie mezenchymálne, dôležitá subpopulácia CTCs nemusí byť metódami, ktoré sú závislé od expresie EpCAM a cytokeratínov, zachytená. Z tohto dôvodu sa na zachytenie CTCs neexprimujúcich EpCAM využíva koktejl protilátok proti rôznym iným epitelálnym povrchovým antigénom, napr. proti receptoru 2 ľudského epidermálneho rastového faktora (HER2), receptoru pre epidermálny rastový faktor (EGFR), mucín-1 (MUC1) a protilátkam proti mezenchymálnym a kmeňovým bunkovým antigénom (c-MET, N-kadherín, CD318 a antigén mezenchymálnych kmeňových buniek)<sup>(20)</sup>.

Bez ohľadu na výber izolačnej metódy ani jednou jednorokovou platformou nemožno dosiahnuť izoláciu čistých CTCs. CTC frakcia obvyčajne stále obsahuje aj značný počet leukocytov. Z tohto dôvodu je potrebná následná identifikácia CTCs na úrovni buniek použitím metód umožňujúcich odlišiť nádorové bunky od normálnych krvných buniek. Tieto metódy sú založené buď na detekcii proteínov, alebo expresii antigénov asociovaných tumor pomocou kvantitatívnej RT-PCR.

V súčasnosti na detekciu viabilných CTCs získaných od onkologických pacientov existujú dva rozdielne *in vitro* testy. Prvým je EPISPOT, ktorý deteguje špecifické proteíny vylučované CTCs do prostredia<sup>(21)</sup>, druhým je invazívny test, ktorý skúma schopnosť CTCs tráviť fluorescenčne značenú bunkovú matrix<sup>(7)</sup>.

Na detekciu viabilných CTCs možno tiež použiť metódu kvantitatívnej RT-PCR, keď sa vyhodnocuje expresia špecifických mRNA molekúl. V prípade rakoviny prsníka sa najčastejšie využíva mRNA kódujúca CK19. Nevýhodou však je, že táto metóda neumožňuje stanovenie početnosti buniek a navyše mnoho transkriptov (napr. kódujúce CK18, CK19, CK20, MUC1, karcinoembryonálny antigén, prostatický špecifický antigén) je v malom množstve exprimovaných aj v normálnych krvných bunkách a bunkách kostnej drene<sup>(22)</sup>, preto pre správne vyhodnotenie a detekciu viabilných CTCs je potrebná validácia *cut-off* hodnoty.

## Klinické využitie cirkulujúcich nádorových buniek

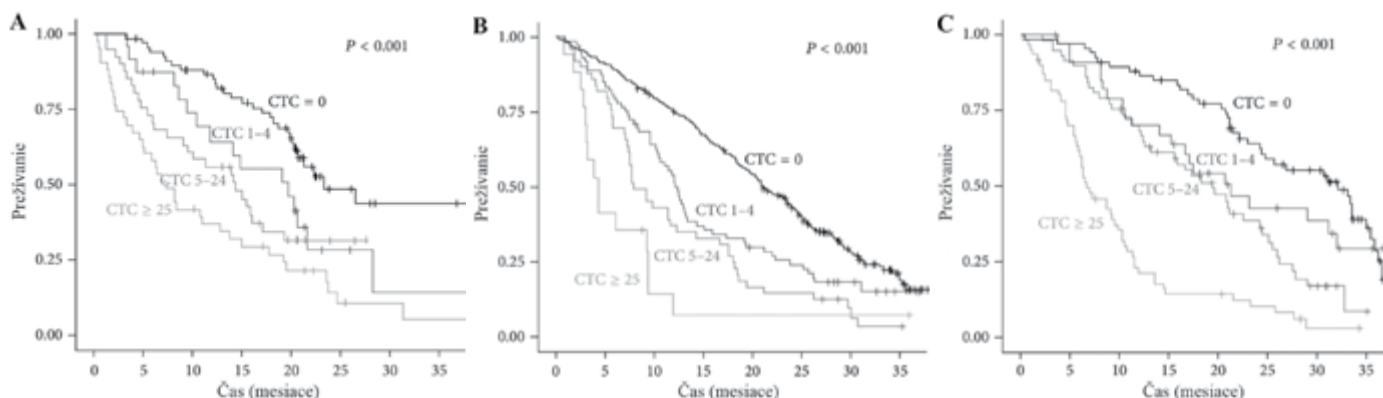
Potenciálne využitie CTCs v klinickej praxi je rozsiahle, od prognostického a prediktívneho využitia až po detekciu minimálnej reziduálnej choroby a monitorovania ochorenia (**obrázok 2**).

### CTCs ako prognostický a farmakodynamický biomarker.

FDA schválila stanovenie početnosti CTCs s presnými *cut-off* hodnotami a s využitím CellSearch® systému ako prognostický marker vybraných nádorových ochorení. V prípade rakoviny prsníka a prostaty je prítomnosť piatich CTCs na 7,5 ml krvi spojená s kratším prežívaním pacientov, pri kolorektálnom karcinóme (CRC) sú to 3 bunky na 7,5 ml krvi<sup>(17-19)</sup>. Prognostická využiteľnosť enumerácie CTCs s využitím CellSearch® systému bola preukázaná aj v prípade nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC) (*cut-off* hodnota 5 CTCs na 7,5 ml krvi)<sup>(24)</sup> a malobunkového karcinómu pľúc (SCLC), pri ktorom sú CTCs prítomné vo vyššom množstve než v ostatných typoch nádorových ochorení (0 – 44 896 buniek na 7,5 ml krvi s *cut-off* hodnotou 50 CTCs na 7,5 ml krvi)<sup>(13)</sup>.



**Obrázok 2.** Kaplanove-Meierove krivky získané pri sledovaní početnosti CTCs u pacientov s metastatickým nádorom prsníka (A), kolorekta (B) a prostaty (C). Súbory pacientov reprezentujú skupiny s identifikáciou 0, 1 – 4, 5 – 24 a > 24 CTC na 7,5 ml krvi pred začiatkom terapie. Upravené podľa Wit, Dalum a Terstappen, 2014<sup>(23)</sup>.



Okrem použitia CTCs ako markerov prognózy nádorového ochorenia môžu byť CTCs využité ako **farmakodynamické biomarkery**. V reakcii na liečbu bol zaznamenaný pokles buď celkového počtu CTCs<sup>(13,17,18,24)</sup> alebo ich subpopulácie<sup>(25-27)</sup>. V prípade väčšiny pacientov s SCLC, bolo podstatne znížené množstvo CTCs po jedinom cykle chemoterapie<sup>(13,28)</sup> v súlade s vysokou mierou odpovede na liečbu na báze platiny<sup>(29)</sup>. Bolo preukázané, že tieto zmeny sú nezávisle asociované s dobrou prognózou<sup>(13)</sup>. Naopak, nárast počtu CTCs po chemoterapii z priaznivej na nepriaznivú úroveň je spojený s celkovým kratším prežívaním pacientov s rakovinou prsníka, prostaty a CRC<sup>(17,18,30)</sup>. Ďalšie očakávané využitie CTC enumerácie je v ranom štádiu vzniku rakoviny, keď prítomnosť CTCs môže pomôcť vybrať pacientov, u ktorých je pravdepodobnosť, že budú mať prospech z adjuvantnej liečby.

**CTCs ako prediktívny biomarker.** V ideálnom prípade by CTCs bunky mohli byť využité ako tekuté biopsie, keď by bol výber špecifickej personalizovanej terapie uskutočnený na základe molekulárnych vlastností nádoru pacienta, zistených analýzou CTCs. Táto schéma bola vysvetlená v štúdiu analy-

zujúcich vzorky od pacientov s NSCLC pozitívnych na *EGFR* mutáciu, v ktorej bola u 19 z 20 pacientov identifikovaná očakávaná (na základe tkanivovej biopsie) aktivujúca *EGFR* mutácia<sup>(31)</sup>. Ďalším príkladom je analýza prešmyku EML4-ALK, ktorá sa vyskytuje u 3 – 5 % pacientov s NSCLC. Približne 60 % pacientov má dobrú odpoveď na inhibíciu ALK<sup>(32,33)</sup>. V ďalších štúdiách bola hodnotená expresia HER2 v CTCs v prípade rakoviny prsníka<sup>(34)</sup> a expresia androgénového receptora v prípade rakoviny prostaty<sup>(35,36)</sup>, ktoré by tiež mohli byť potenciálne využité ako prediktívne biomarkery. Niektoré ženy vykazovali rozdielny HER2 status v CTCs (pozitívny) a v primárnom nádore (negatívny), pričom prosperovali z terapie trastuzumabom<sup>(37)</sup>. Toto zistenie potvrdzuje názor, že vlastnosti CTC buniek sú relevantnejším terapeutickým cieľom, keďže tieto bunky sú zodpovedné za vznik metastáz.

### Grantová podpora

Táto publikácia vznikla s podporou grantov Agentúry na podporu výskumu a vývoja – APVV-14-0273 a APVV-14-0327.

### LITERATÚRA

- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 453-458.
- Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(30): 12396-12400.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009; 139(7): 1315-1326.
- Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4): 239-252.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24): 8152-8162.
- Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45(4): 773-782.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(9): 623-631.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1420-1428.
- Edelman GM, Gallin WJ, Delouvee A, et al. Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(14): 4384-4388.
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(35): 13180-13185.
- Shih JY, Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2011; 32(9): 1299-1304.
- Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, et al. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11(3): 129-144.
- Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(5): 525-532.
- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014; 158(5): 1110-1122.
- Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012; 63: 199-215.
- Riethdorf S, Fritsche H, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 920-928.
- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19): 6302-6309.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(19): 3213-3221.

19. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(8): 781-791.
20. Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA, et al. A novel platform for detection of CK+ and CK-CTCs. *Cancer Discov* 2011; 1(7): 580-586.
21. Ramirez JM, Fehm T, Orsini M, et al. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin Chem* 2014; 60(1): 214-221.
22. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5): 329-340.
23. de Wit S, van Dalum G, Terstappen LW. Detection of circulating tumor cells. *Scientifica (Cairo)* 2014; 2014: 819362.
24. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(12): 1556-1563.
25. de Bono JS, Attard G, Adjei A, et al. Potential applications for circulating tumor cells expressing the insulin-like growth factor-I receptor. *Clin Cancer Res* 2007; 13(12): 3611-3616.
26. Liu Z, Fusi A, Schmittl A, et al. Eradication of EGFR-positive circulating tumor cells and objective tumor response with lapatinib and capecitabine. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(9): 860-864.
27. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010; 16(9): 2634-2645.
28. Hiltermann TJ, Pore MM, van den Berg A, et al. Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol* 2012; 23(11): 2937-2942.
29. Evans WK, Osoba D, Feld R, Shepherd FA, Bazos MJ, DeBoer G. Etoposide (VP-16) and cisplatin: an effective treatment for relapse in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1985; 3(1): 65-71.
30. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14 Pt 1): 4218-4224.
31. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359(4): 366-377.
32. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(25): 2385-2394.
33. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012; 13(10): 1011-1019.
34. Hayes DF, Walker TM, Singh B, et al. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2002; 21(5): 1111-1117.
35. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009; 69(7): 2912-2918.
36. Jiang Y, Palma JF, Agus DB, et al. Detection of androgen receptor mutations in circulating tumor cells in castration-resistant prostate cancer. *Clin Chem* 2010; 56(9): 1492-1495.
37. Liu Y, Liu Q, Wang T, et al. Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: a valuable prognostic and predictive biomarker. *BMC Cancer* 2013; 13:202.



**RNDr. Gabriel Minárik, PhD.**

Lekárska genetika, Medirex, a. s.  
Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava  
e-mail: gabriel.minarik@medirex.sk



## ALL YOU NEED FOR PROTEOMICS

- Protein expression
- Protein extraction
- Protein purification
- Protein analysis & detection



Request your copy from your local VWR sales office or [sk.vwr.com](http://sk.vwr.com)