

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta

Význam minimální reziduální choroby u solidních nádorů

Doktorská dizertační práce

MUDr. Josef Srovnal

Olomouc 2009

Doktorand:

MUDr. Josef Srovnal

Doktorský studijní program:

Pediatric

Školící pracoviště:

Laboratoř experimentální medicíny
při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity
Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc

Školitel:

Doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Prohlašuji, že práci na tomto projektu jsem vykonal samostatně a uvedl jsem veškerou použitou literaturu. Projekt byl realizován v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci pod odborným dozorem vedoucího Laboratoře experimentální medicíny doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D.

Poděkování

Chtěl bych vyjádřit své upřímné poděkování všem, kteří mi pomohli s realizací mého výzkumného projektu. Zejména svému školiteli doc. MUDr. Mariánovi Hajdúchovi, Ph.D. za cenné rady a vloženou důvěru. Dále prof. MUDr. Vladimíru Mihálovi, CSc. za dlouhodobou podporu a povzbuzení.

Mé díky patří samozřejmě všem kolegům z laboratoře a z klinických pracovišť, se kterými jsem měl možnost na předkládaném projektu spolupracovat, zejména doc. MUDr. Kamilu Vysloužilovi, Ph.D.

Práce na tomto projektu byla podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NR/7804-5, MPO 1H-PK/45 a FRVŠ 1086/2005/G3.

Děkuji své rodině a blízkým za dlouhodobou podporu a důvěru.

V Olomouci 17. 8. 2009

MUDr. Josef Srovnal

Obsah

Zkratky

1. Teoretická část.....	11
1.1 Úvod.....	11
1.2 Metody detekce minimální reziduální choroby u solidních nádorů.....	13
1.2.1 Imunohistochemie	13
1.2.2 Průtoková cytometrie	14
1.2.3 Polymerázová řetězová reakce	14
1.2.4 Real-time RT-PCR	15
1.3 Markery nádorových buněk pro detekci minimální reziduální choroby	16
1.3.1 Mamaglobin 1	16
1.3.2 Cytokeratiny.....	16
1.3.3 Karcinoembryonální antigen	17
1.3.4 Receptor pro epidermální růstový faktor 1.....	18
1.3.5 Transkripční faktor štítné žlázy 1	18
1.3.6 Adhezní molekula epiteliálních buněk	18
1.4 Minimální reziduální choroba v klinické onkologii.....	19
1.4.1 Minimální reziduální choroba u pacientů s kolorektálním karcinomem ..	20
1.4.2 Minimální reziduální choroba u pacientek s karcinomem prsu.....	22
2. Experimentální část.....	25
2.1 Cíle práce.....	25
2.2 Materiál a metody.....	26
2.2.1 Materiál.....	26
2.2.2 Izolace jaderných buněk osmotickou lýzou	26
2.2.3 Izolace RNA.....	27
2.2.4 Reverzní transkripce.....	28
2.2.5 Real-time RT-PCR	28
2.2.6 Statistika.....	29
2.3 Výsledky.....	31
2.3.1 Optimalizace detekce minimální reziduální choroby metodou kvantitativní RT-PCR.....	31
2.3.2 Identifikace nových markerů pro detekci minimální reziduální choroby. 41	
2.3.3 Použití markerů minimální reziduální choroby k diferenciální diagnostice metastáz neznámého původu	63
2.3.4 Minimální reziduální choroba u solidních nádorů.....	71
2.3.5 Použití markerů minimální reziduální choroby k objasnění mechanismu účinku protinádorových léčiv	105
3. Souhrnné výsledky a diskuse.....	117
4. Souhrn.....	123
5. Summary.....	125
6. Seznam použité literatury.....	127
7. Přehled publikací autora.....	135
7.1 Původní a přehledové práce.....	135
7.2 Publikovaná abstrakta.....	137
7.3 Seznam přednášek přednesených autorem na veřejných odborných fórech	144

Zkratky

A 549	nádorová linie lidského adenokarcinomu plic
AC	terapie antracykliny
AE	ablace, exenterace axily
AMV	virus ptačí myeloblastózy (avian myeloblastosis virus)
BM	kostní dřev (bone marrow)
BSC	nejlepší podpůrná péče (best support care)
BT 549	nádorová linie lidského karcinomu prsu
C18-20	kód diagnózy karcinomu tlustého střeva a konečníku (MKN)
C34	kód diagnózy karcinomu plic (MKN)
C50	kód diagnózy karcinomu prsu (MKN)
C56	kód diagnózy karcinomu vaječnicků (MKN)
C71	kód diagnózy tumoru mozku (MKN)
CALU3	nádorová linie lidského karcinomu vaječnicků
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CEA (CEACAM5)	karcinoembryonální antigen
CEM	nádorová linie lidské T-lymfoblastické leukémie
CDK	cyklin-dependentní kináza
CI	interval spolehlivosti (confidential interval)
CK19	cytokeratin 19
CK20	cytokeratin 20
CMF	terapie režimem „cyklofosfamid, methotrexát, 5-fluorouracil“
Ct	práh cyklů (cycle treshold)
CTC	cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells)
DCIS	duktální karcinom prsu in situ
DEPC	diethylpyrokarbonát
DFS	přežití bez známek onemocnění (disease-free survival)
DMFS	období do vzniku vzdálených metastáz (distant metastasis free survival)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DOXO	terapie doxorubicinem
DTC	diseminované nádorové buňky (disseminated tumor cells)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR1	receptor pro epidermální růstový faktor 1
EGFRvIII	variantní forma receptoru pro epidermální růstový faktor
EpCAM (EGP, KSA, GA733-2)	adhezní molekula epiteliálních buněk
FAC/FEC	terapie režimem „5-fluorouracil, doxorubicin/epirubicin, cyklofosfamid“
FC	průtoková cytometrie (flow cytometry)
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
G-CSF	granulocyty stimulující faktor (granulocytes colony stimulating factor)
gDNA	genomická deoxyribonukleová kyselina
HCT 116	nádorová linie lidského karcinomu tlustého střeva
HPAC	nádorová linie lidského karcinomu slinivky břišní
HR	poměr rizika (hazard ratio)
HT 29	nádorová linie lidského karcinomu tlustého střeva
hTERT	lidská telomeráza (human telomerase reverse transcriptase)

CHT	chemoterapie
IHC	imunohistochemie (imunohistochemistry)
K562	nádorová linie lidské myeloidní leukémie
KE	kvadrantektomie, exenterace axily
KrK	kolorektální karcinom
MACS	magnetické třídění buněk (magnetic affinity cell sorting)
MCF 7	nádorová linie lidského karcinomu prsu
MDA MB 231	nádorová linie lidského karcinomu prsu
MGB1 (SCGB2A2, MAM)	mamaglobin 1 (secretoglobulin 2A2)
MKN	mezinárodní klasifikace nemocí
M-MuLV	Moloneyho virus myší leukémie (Moloney-murine leukemia virus)
MRD	minimální reziduální choroba (minimal residual disease)
mRNA	informační ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
N	status postižení lymfatických uzlin
ND	nestanoveno (not determined)
NVB	terapie navelbinem
OS	celkové přežití (overall survival)
PBS	fosfátový fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PIP	prolaktin indukující protein
PSG	těhotensky specifický glykoprotein (pregnancy specific glycoprotein)
pTNM	patologická TNM klasifikace (tumor, nodus, metastasis)
QRT-PCR	kvantitativní reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce
R0	kompletní resekce tumoru
RFS	přežití bez návratu onemocnění (relaps-free survival)
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce
S_CA 19-9	sérová hladina onkomarkeru CA 19-9
S_CEA	sérová hladina onkomarkeru CEA
SB	periferní krev (systemic blood)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SLN	sentinelová lymfatická uzlina (sentinel lymph node)
SW 620	nádorová linie lidského karcinomu tlustého střeva
T	tumor
TACSTD1	s nádorem asociovaný vápníkový signálový přenašeč (tumor-associated calcium signal transducer)
TTF1	transkripční faktor štítné žlázy 1 (thyroid transcription factor 1)

1. Teoretická část

1.1 Úvod

Maligní nádory vycházející z epiteliálních tkání jsou nejčastější formou nádorového onemocnění v západních zemích. I přes obrovský pokrok v léčbě onkologických onemocnění zůstává mortalita stále vysoká. Pokrok v léčbě je v současnosti obecně nejlépe vidět na poměru stále rostoucí incidence nádorových nemocí, avšak stagnující mortalitě. Mortalita je stále více spojená se vznikem vzdálených metastáz, které se objeví až během protinádorové léčby nebo po jejím ukončení, nejsou však diagnostikovatelné v čase primární diagnózy. Riziko vzniku metastáz se dá odhadnout pomocí statistických dat, která vycházejí z údajů jako je velikost primárního tumoru, postižení lymfatických uzlin, gradingu, angioinvasze apod. Nediagnostikovatelné okultní nádorové buňky či mikrometastázy mohou přispět k neúspěchu primární léčby tím, že léčba je podhodnocena, což vede ke zhoršení prognózy pacienta. V současnosti neexistuje standardní metoda s dostatečnou citlivostí pro detekci mikrometastáz nebo okultních nádorových buněk. Pokud by existovala, bylo by možné identifikovat pacienty s vyšším rizikem vzniku metastáz, na které by se mohla zaměřit adjuvantní chemoterapie, určená primárně k eliminaci zbylých, okultních nádorových buněk. A naopak by bylo možné identifikovat pacienty s nízkým rizikem, u kterých by bylo možné se vyhnout podání nákladné a často velmi zatěžující chemoterapie ^(Pantel et al., 1999; Wang et al., 2006).

Dnes běžně používané zobrazovací, biochemické, cytogenetické ani imunologické metody neumožňují detekci cirkulujících nádorových buněk a mikrometastáz s požadovanou citlivostí. Teprve rozvoj molekulárně-biologických metod založených na principu polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) umožnil zvýšit senzitivitu a detekovat až 1 nádorovou buňku mezi 1-10 miliony buněk nenádorovými ^(Bustin et al., 2000; Pantel et al., 1999). Tyto metody se dnes s úspěchem používají u hematologických malignit, kde jsou pro jednotlivé diagnózy díky dobře popsaným genetickým změnám dostupné vysoce specifické markery (např. fúzní gen bcr-abl u chronické myeloidní leukemie) nádorových buněk. U solidních tumorů se z důvodu vysoké míry genetické instability a nádorové heterogenity dostatečně senzitivní a specifické markery teprve hledají.

Přítomnost okultních nádorových buněk u solidních nádorů lze vyšetřovat ve vzorcích periferní krve, kostní dřeně, v lymfatickém systému nebo např. v peritoneální laváži, kde může přítomnost těchto nádorových buněk předpovědět recidivu nemoci, ovlivnit volbu léčebné modality a předpovědět prognózu pacienta ^(Pantel et al., 1999; Wang et al., 2006).

Základním principem v detekci minimální reziduální choroby (MRD) metodami založenými na principu polymerázové řetězové reakce (PCR) u solidních nádorů je detekce znaků epiteliálních nádorových buněk v kompartmentech mesenchymálního původu, tj. v kostní dřeni, krvi a lymfatickém systému. Kostní dřeň představuje kompartment, přes který nádorové buňky během procesu hematogenního metastazování cestují a jsou v něm s ohledem na vlastnosti kapilárního řečiště přednostně vycytávány a retinovány. Při konvenčním stagingu solidních tumorů se kostní dřeň běžně nevyšetřuje. Nové molekulární metody však nabízí relativně jednoduše proveditelné vyšetření aspirátu kostní dřene na přítomnost MRD. Přítomnost nádorových buněk v krvi je již léta předmětem sporů a její klinický význam není stále úplně jasný. Přítomnost nádorových buněk v krvi nemusí nutně vést ke vzniku vzdálených metastáz. Úspěšné metastazování závisí na mnoha proměnných, genotypickými a fenotypickými vlastnostmi nádorových buněk počínaje, mikroprostředím a imunologickou odpovědí organismu konče. Dle odhadu Liotty a Stetler-Stevensona, jen jedna z 10 000 disseminovaných nádorových buněk je schopna vytvořit metastatickou lézi ^(Liotta et al., 1991).

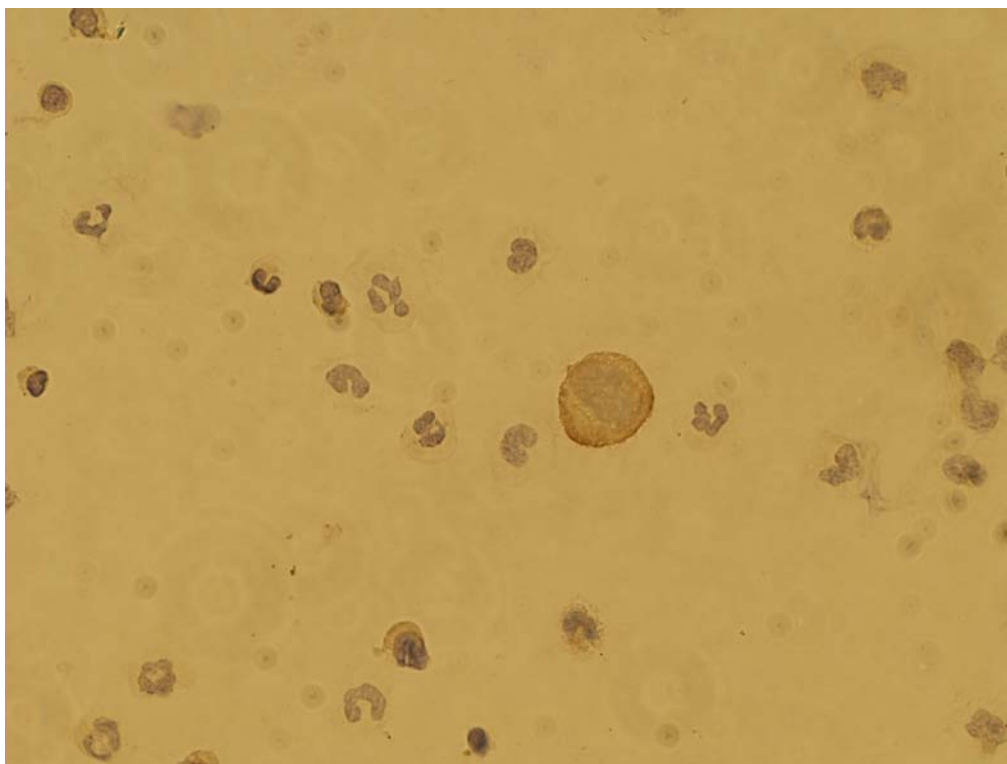
Standardně prováděné histopatologické vyšetření spádových lymfatických uzlin je nutným předpokladem pro určení pokročilosti nádorového onemocnění a důležitým kritériem pro stanovení prognózy a hlavně léčby pacienta. Detekce metastatického postižení v lymfatických uzlinách je signifikantním prognostickým faktorem a často svědčí pro přítomnost systémového onemocnění. Avšak u nemalé části pacientů s primárně histopatologicky negativními lymfatickými uzlinami se po letech rozvine systémové onemocnění. Například u 30% pacientek s karcinomem prsu a s histologicky negativními axilárními uzlinami se do pěti let objeví vzdálené metastázy. Klasické histopatologické vyšetření nemá tedy požadovanou citlivost pro záchyt časných stádií metastazování. Zde se otevírá prostor pro molekulární analýzy založené na principu PCR.

1.2 Metody detekce minimální reziduální choroby u solidních nádorů

K detekci minimální reziduální choroby u solidních tumorů lze použít několika metodických přístupů, které se liší především svojí senzitivitou, specificitou, nákladností i pracností.

1.2.1 Imunohistochemie

Imunohistochemie (immunohistochemistry, IHC) umožňuje detekci 1 nádorové buňky mezi 10 000 až 100 000 buňkami nenádorovými ^(Hagenbeek, 1992). Principem je reakce monoklonálních protilátek se specifickými antigeny nádorových buněk a jejich následná vizualizace (Obr. 1). Výsledný obraz je mikroskopicky vyhodnocován patologem nebo automatizovanými systémy. Nevýhodami této metody je omezený počet hodnocených buněk, riziko zkřížené reakce s jinými epitopy a mnohem nižší citlivost než mají jiné, v současnosti používané metodiky.



Obr. 1 Ilustrační obrázek k imunohistochemickému vyšetření kostní dřeně na minimální reziduální chorobu. Směs jaderných buněk kostní dřeně a buněk nádorové linie CaLU3 obarvená membránovou protilátkou proti c-erb-B2 antigenu. Podbarveno hematoxylin-eosinem (se souhlasem Mgr. M. Dziechciarkové, Ph.D., LEM Olomouc).

1.2.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (Flow Cytometry, FC) umožňuje stanovit množství povrchových i intracelulárních antigenů pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorescenčním barvivem. Nejčastějšími cílovými antigeny pro detekci MRD jsou cytoskeletální proteiny a cytokeratiny (Fehm et al., 2002). V onkologické diagnostice je často využívanou aplikací stanovení ploidity nádorů a proliferačního indexu. Principem průtokové cytometrie je měření proudu buněk procházejících měřicí komorou, kde dochází k excitaci navázaných fluorochromů (fluorescenční barvivo) po ozáření laserem. Emitované záření je poté detekováno fotonásobiči a výsledný signál je zpracován počítačově. Výhodou je schopnost kvantitativně vyšetřit velké množství buněk (řádově v milionech) v relativně krátkém čase s možností víceparametrového měření. Ke zvýšení citlivosti metody lze provést obohacení vzorku, nejčastěji za použití imunomagnetických metod (magnetic affinity cell sorting – MACS, magnetické kuličky, feromagnetické koloidy aj.), ve kterých je na paramagnetickou látku navázána monoklonální protilátka např. proti leukocytům (anti CD 45) nebo proti znakům epiteliálních buněk (cytokeratin 7/8, HEA 125) (Martin et al., 1998; Naume et al., 1997). I přes obohacení řádově o 10^4 však není průtoková cytometrie tak citlivá jako metody využívající PCR reakce. Průtokovou cytometrií lze detekovat 1 nádorovou buňku mezi řádově 10-100 tisíci nenádorovými buňkami (Fehm et al., 2002; Tsavellas et al., 2002), její hlavní uplatnění pro detekci MRD je v hematonekologii (Ward et al., 1999).

1.2.3 Polymerázová řetězová reakce

(Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda umožňující detekci vybrané sekvence DNA pomocí její amplifikace za použití sekvenčně specifických oligonukleotidů (primerů) a DNA polymerázy. Princip PCR je založen na opakujících se cyklech, kdy každý cyklus je složen ze dvou až tří po sobě následujících kroků: dvouřetězcová DNA je tepelně denaturována za vzniku jednořetězcové DNA, poté primery hybridizují (nasedají) na hledanou sekvenci DNA a v posledním kroku se syntetizují komplementární vlákna (Dieffenbach, 1995). Vzniklé produkty-amplikony jsou standardně detekovány elektroforeticky. Pro detekci MRD PCR metodou na úrovni nádorové DNA je třeba najít vhodný marker. Mezi nejčastěji detekované změny DNA patří mutace protoonkogenů či nádorových supresorových genů, specifické fúzní geny vzniklé chromozomálním přeskupením, nestabilita mikrosatelitů a specifické sekvence onkogenních virů (Maguire et al., 2000). Problémem zůstává nádorová heterogenita, omezený počet genových kopií ve vzorku a genetická nestabilita solidních nádorů a z ní vyplývající nízká senzitivita metody. Naopak výhodami jsou možnosti detekce uvedených genetických změn již u dysplastických

lézí, v archivních materiálech a možnost záchytu cirkulující DNA v plasmě a nikoliv v živých nádorových buňkách (Ring et al., 2004).

1.2.4 Real-time RT-PCR

Detekce minimální reziduální choroby s využitím RT - PCR metody je v podstatě studiem genové exprese. Cílem je detekovat hledaný znak nádorových epiteliálních buněk na úrovni RNA sekvence (informační RNA – mRNA). K tomu účelu je nejprve pomocí reverzní transkriptázy izolovaná RNA přepsána do komplementární DNA (cDNA), která je pak použita jako templát pro PCR reakci (Bustin et al., 2000). Nejčastěji používanými cílovými sekvencemi pro detekci MRD metodou real-time RT-PCR u solidních tumorů jsou cytokeratiny, karcinoembryonální antigen, mamaglobin, mucin aj. (viz níže). Výhodou tohoto přístupu je nízká stabilita RNA po uvolnění z buňky a většinou tedy detekce živých buněk. Kvantitativní RT - PCR v reálném čase (real-time RT-PCR) je metoda umožňující přesnou a absolutní kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku. Využívá se zde několika možností detekce narůstajícího množství amplikonů během reakce. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence. Principiálně nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv, která se interkalují mezi báze DNA (např. Sybr Green), narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství amplikonů ve vzorku (Amutan et al.). V současnosti je asi nejvíce rozšířená metoda využívající 5-exonukleázové aktivity DNA polymerázy. Klíčovým je zde použití oligonukleotidu – próby (nejčastěji TaqMan sonda), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášečem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken provede DNA polymeráza hydrolytické štěpení TaqMan sondy, čímž dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase (Bustin, 2002). Tato metoda nabízí možnost detekovat jednu nádorovou buňku až mezi 10 miliony nenádorových buněk (Smith et al., 2000; Lambrechts et al., 1999; Slade et al., 1999). Sestrojením standardizačních křivek lze přesně a absolutně kvantifikovat množství hledané cDNA sekvence vybraného markeru ve vzorku.

1.3 Markery nádorových buněk pro detekci minimální reziduální choroby

Pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s nádory epiteliálního původu metodou RT-PCR lze použít několika epiteliálních markerů, které se mezi sebou liší zejména svou senzitivitou a specificitou.

1.3.1 Mamaglobin 1

je vysoce glykosylovaný protein o nízké molekulární hmotnosti (10,5kDa). Gen byl poprvé identifikován v roce 1996 a kóduje protein o 93 aminokyselinách (Watson et al., 1996). Mamaglobin 1 (MGB1, SCGB2A2) patří spolu s proteinem Klara buněk do rodiny sekretoglobulinů, avšak jeho biologická funkce zůstává zatím neznáma. Gen je lokalizován na chromozómu 11q13 (Zehentner et al., 2004). Z důvodu vysoké heterogenity genové exprese nádorů prsu není exprese mamaglobinu u všech nádorů prsu stejná. Exprese mamaglobinu byla detekována asi u 80% všech nádorů prsu. U 23% nádorů prsu je jeho exprese mnohonásobně vyšší, nebyla u nich však nalezena žádná genová amplifikace ani přeskupení, jedná se tedy o overexpresi na transkripční úrovni (Watson et al., 1999). Dále bylo zjištěno, že zvýšená exprese mamaglobinu u nádoru prsu je spojena s nižší agresivitou tumoru (Núñez-Villar et al., 2003). Mamaglobin je exprimován téměř výhradně v epitelu prsní tkáně, byly ale publikovány práce, ve kterých byla popsána detekce exprese mamaglobinu v benigních i maligních tkáních ovaria a endometria, avšak v mnohonásobně nižších hladinách než ve tkáni prsu (Grünewald et al., 2000). Byla popsána exprese mamaglobinu také v potních žlázách (Sjodin et al., 2003). Mamaglobin není exprimován v buňkách mezenchymálního původu, což znamená, že v kostní dřeni, krvi a lymfatickém systému není exprese mamaglobinu u zdravého jedince detekovatelná. Díky téměř výlučné expresi u nádorů prsu, je mamaglobin jako antigen zajímavý i z pohledu specifické imunoterapie (Tanaka et al., 2003). Mamaglobin je nejvíce specifický a senzitivní marker pro detekci MRD u pacientek s karcinómem prsu, který byl k dnešnímu datu popsán. Od roku 2000 byl mamaglobin použit ve více než 30 studiích zabývajících se karcinómem prsu a detekcí MRD (Corradini et al., 2001; Grünewald et al., 2000; Marchetti et al., 2001; Silva et al., 2001; Lin et al., 2003; Han et al., 2003; Bossolasco et al., 2002; Ignatiadis et al., 2008; Iakovlev et al., 2008).

1.3.2 Cytokeratiny

tvoří největší podskupinu proteinů intermediálních filament cytoskeletu epiteliálních buněk. Tyto proteiny jsou kódovány velkou multigenní rodinou čítající přes 50 členů, která se dělí do dvou velkých skupin – typ I a typ II. Geny typu I jsou lokalizovány na chromozómu 17q12 – 21 a geny typu II na chromozómu 12q13. Primární funkcí cytokeratinů je chránit epiteliální buňky před mechanickým poškozením. Dále cytokeratiny hrají roli v oblasti buněčné signalizace a

apoptózy (Coulombe et al., 2002). Cytokeratiny jsou exprimovány v epiteliálních buňkách v různých kombinacích a to v závislosti na typu a stupni diferenciaci epitelu, např. cytokeratiny 8, 18, 19 a 20 jsou exprimovány v jednovrstevném dlaždicovém epitelu (Moll et al., 1982). Předpokládalo se, že cytokeratiny tvořící skelet epiteliálních buněk, nejsou za normálních okolností exprimovány v lymfatickém ani v hematopoetickém systému (Schoenfeld et al., 1997) a byly proto použity jako markery MRD v mnoha studiích. Například cytokeratin 19 byl použit jako marker MRD u karcinomu prsu (Schoenfeld et al., 1997; Smith et al., 2000; Manzotti et al., 2001; Berois et al., 2000; Fehm et al., 2009; Daskalaki et al., 2009) a u kolorektálního karcinomu (Wong et al., 2001), cytokeratin 20 u karcinomu kolorekta (Lassmann et al., 2002; Vlems et al., 2002; Kruger et al., 2001; Miyake et al., 2001; Wong et al., 2009; Shen et al., 2008), prsu (Silva et al., 2001) a uroteliálního karcinomu (Inoue et al., 2001). V posledních letech se díky rozvoji citlivosti používaných metod objevují studie, v nichž je prokazována exprese cytokeratinů nejenom v buňkách epiteliálního původu, ale i v mononukleárech periferní krve a v kostní dřeni zdravých jedinců, což může být způsobeno ilegální transkripcí nebo přítomností pseudogenů (Vlems et al., 2002; Champelovier et al., 1999; Kao et al., 2002; Takano et al., 2000). Řešením těchto problémů může být zavedení absolutní kvantifikace genové exprese pomocí real-time RT-PCR metody a stanovení fyziologické hodnoty exprese konkrétního genu v konkrétním kompartmentu.

1.3.3 Karcinoembryonální antigen

je glykoprotein o molekulární hmotnosti 180 – 200 kDa. Tento protein patří do velké CEA rodiny, blízké imunoglobulinům, čítající 29 genů a pseudogenů. Všechny geny z této rodiny jsou lokalizovány na dlouhém raménku chromozómu 19. CEA rodinu lze rozdělit do tří podskupin; vlastní podskupina CEA, podskupina těhotensky-specifických glykoproteinů (pregnancy specific glycoprotein, PSG) a podskupina pseudogenů (Zimmermann et al., 1988). Karcinoembryonální antigen je vazebný protein buněčného povrchu a jako nádorový antigen je zvýšeně exprimován u více než 95% nádorů gastrointestinálního traktu, přibližně u 70% nemalobuněčných karcinomů plic a u 50% nádorů prsu (Aquino et al., 2004). Exprese CEA je přítomna také v některých fetálních tkáních a u dospělého člověka se vyskytuje v normální tkáni tlustého střeva, v epiteliálních buňkách prostaty a nízkou expresi lze detekovat i v leukocytech. Častým vyšetřením v onkologii je stanovení plazmatické hladiny CEA. Hladina CEA v séru dobře koreluje s léčebnou odpovědí a dokáže odhalit časnou rekurenci onemocnění, avšak není považována za vhodný marker pro screening nádorů kolorekta (MacDonald et al., 1999). Mnoho studií založených na metodách PCR použilo CEA jako marker při detekci minimální reziduální choroby u karcinomu prsu (Marchetti et al., 2001; Mitas et al., 2001; Lin et al., 2003; Manzotti et al., 2001; Berois et al., 2000) a kolorekta (Taniguchi et al., 2000; Wong et al., 2001; Ito et al., 2002; Sadahiro et al., 2001), dále u nádorů biliárního

traktu (Okami et al., 2000) a žaludku (Kubota et al., 2003). Nicméně některé studie dále prokázaly možnost indukce exprese CEA v hematopoetické tkáni stimulačními faktory (G-CSF) (Goemine et al., 1999), cytokiny, steroidy nebo léky (Aquino et al., 2004).

1.3.4 Receptor pro epidermální růstový faktor 1

Je transmembránový protein s tyrozinkinázovou doménou patřící do HER rodiny, o jejíž členy je v posledních letech v souvislosti s biologickou léčbou projevován mohutný zájem vědeckovýzkumých, farmaceutických a klinických týmů. Tento receptor lze mimo jiné použít i jako marker nádorových buněk při vyšetřování MRD. EGFR1 je zvýšeně exprimován až u 70% nádorů prsu, plic, střeva, gliomů, orofaciálních nádorů a obvykle není exprimován v buňkách hematopoetických (DeLuca et al., 2000). Vysoce specifickým, avšak méně senzitivním markerem, se zdá být mutovaná, zkrácená verze EGFRvIII.

1.3.5 Transkripční faktor štítné žlázy 1

Gen byl poprvé identifikován v roce 1995, nachází se na dlouhém raménku chromozómu 14q13, skládá se ze dvou exonů a má délku 3,3kb. Je členem rodiny NKx2 transkripčních faktorů a je specificky exprimován ve štítné žláze, plicích, mezimozku. TTF1 aktivuje transkripci thyreoglobulinu a thyreoperoxidázy u karcinomu štítné žlázy a transkripci surfaktant proteinu B v plicích, dále ovlivňuje vývoj bazálních ganglií. Vrozená delece genu TTF1 se může projevit u novorozenců hypothyreoidismem, respiračním selháním a dyskinezi. V onkologické diagnostice lze použít TTF1 při detekci minimální reziduální choroby, při diferenciální diagnostice tumorů plic a jako prognostický faktor u pacientů s karcinomem plic.

1.3.6 Adhezní molekula epiteliálních buněk

Ekvivalentními názvy pro EpCAM jsou epiteliální glykoprotein EGP, KSA, GA733-2. V současnosti používaný název je tumor-associated calcium signal transducer TACSTD1, což odráží jednu z mnoha funkcí tohoto membránového proteinu kodovaného genem o devíti exonech. Tento protein je exprimován na povrchu většiny epiteliálních buněk, z čehož vyplývá možnost použít tento gen jako obecný marker nádorových buněk pro detekci MRD u většiny karcinomů. Protein také slouží jako antigen při imunomagnetickém obohacování vzorků (viz výše).

O výše zmíněných nádorových markerech byla v souvislosti s detekcí MRD napsána řada prací s ne vždy jednotnými výsledky. Hlavním problémem zůstává otázka kvantifikace a specifity jednotlivých markerů. Některé z nich se exprimují nejen v nádorových buňkách, ale například i

v leukocytech (např. CEA, mucin). Dochází k tzv. ilegitimní transkripci. Tento problém může vyřešit kvantitativní real-time RT-PCR, kdy lze na základě vyšetření souboru zdravých jedinců stanovit limit mezi normou a patologií.

1.4 Minimální reziduální choroba v klinické onkologii

Termínem minimální reziduální choroba u nemocných se solidními tumory se označuje přítomnost nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byla provedena radikální léčba primárního tumoru a v současnosti je bez klinických známek onemocnění. Identifikace minimální reziduální choroby je jednou z možných klinických aplikací metody real-time RT-PCR, jakožto metody nejvíce senzitivní a specifické. Touto metodou lze kvantitativně stanovovat genovou expresi markerů epiteliálních tumorů v krvi, kostní dřeni a v lymfatickém systému. Lze tak nepřímo prokázat přítomnost nádorových buněk s citlivostí až 10^{-7} .

Současnými vyšetřovacími metodami nejsme schopni odlišit onkologicky nemocné pacienty vyléčené chirurgickým zákrokem nebo radioterapií, kteří již nepotřebují adjuvantní léčbu, od pacientů s vyšším rizikem recurence onemocnění. Nové molekulárně-biologické metody, real-time RT-PCR obzvláště, nám v rozhodování o podání adjuvantní léčby mohou výrazně pomoci. Vyšetřením vzorků kostní dřeně, krve a lymfatického systému na přítomnost minimální reziduální choroby lze rozdělit pacienty na dvě skupiny. Na skupinu pacientů s vyšším rizikem recidivy (pozitivní záchyt MRD), na které by se mohla specificky a individuálně zaměřit adjuvantní terapie a na druhou skupinu pacientů s nízkým rizikem (negativní detekce MRD), u kterých bychom se mohli vyhnout podání zbytečné a pro pacienta zatěžující adjuvantní léčby (Ring et al., 2004).

Adjuvantní terapie slouží primárně k eliminaci okultních diseminovaných nádorových buněk, avšak její účinnost nelze současnými metodami přímo zjistit a hodnotíme ji nepřímo prostřednictvím parametrů přežití. Metoda real-time RT-PCR umožňuje díky absolutní kvantifikaci genové exprese vybraných markerů u onkologicky nemocného pacienta rozlišit změny v počtu nádorových buněk v periferní krvi a kostní dřeni. Je-li provedena série odběrů v různých časových intervalech, lze z poklesu či vzestupu exprese sledovaného markeru, přeneseně i z počtu nádorových buněk, odhadovat a monitorovat léčebnou odpověď a individuálně rozhodovat o dalším způsobu nebo změně léčby. Vystává zde také možnost časného záchytu recidivy nádorového onemocnění a to dříve, než se rozvine makroskopické, klinicky zjevné onemocnění se zásadním dopadem na prognózu a léčbu pacienta. Vysokou senzitivitu metody lze také úspěšně využít při detekci kontaminace štetu nádorovými buňkami

při transplantaci autologní kostní dřeně či periferních kmenových buněk po vysokodávkované chemoterapii, např. u karcinomu prsu ^(Corradini et al., 2001).

Přes pokroky v možnostech detekce MRD není klinický význam přítomnosti malého množství nádorových buněk v krvi, kostní dřeni a v lymfatickém systému zcela objasněn. Výsledky mnoha provedených studií úplně neobjasňují prognostický význam minimální reziduální choroby jako nezávislého faktoru. Důvodů je několik, podílí se na tom hlavně nejednotnost použitých metodik a absence velkých studií porovnávajících přítomnost MRD s klinickým stavem pacienta.

1.4.1 Minimální reziduální choroba u pacientů s kolorektálním karcinomem

Kolorektální karcinom (KRK) je nejčastějším maligním nádorem zažívacího traktu a celosvětově patří mezi nejčastější malignity vůbec. Výskyt tohoto onemocnění se v naší populaci od roku 1960 trvale zvyšuje, přičemž v současnosti se ČR zařadila na první místo ve světových statistikách. Z toho vyplývá vysoký zdravotní, společenský i ekonomický význam tohoto onemocnění. Nádory tlustého střeva představují zhruba 8% a nádory konečníku více jak 7% nádorových úmrtí ^(www.svod.cz).

Vznik kolorektálního karcinomu je mnohaetapový proces s vrozenými i získanými změnami genetické výbavy. V důsledku těchto změn dochází k poruchám buněčného cyklu, nekontrolovatelné buněčné proliferaci, poruchám přirozeného zániku buněk (apoptózy) a vzniku nádoru. V případě, že nádor začne prorůstat do stěny tlustého střeva a krevních a lymfatických cév, je otevřená cesta ke vzniku vzdálených metastáz. Onemocnění se vzdálenými metastázami, které postihují nejčastěji játra, je pak léčitelné jen velmi obtížně.

Chirurgické metody jsou suverénním postupem v léčbě časných stadií a základem onkologické terapie u pokročilých onemocnění. Současně jsou základem pro určení kvalitativní histologické diagnózy, což je spolu s dalšími metodami podkladem pro stanovení pTNM klasifikace. Výsledná pTNM klasifikace je v současnosti zásadní pro určení rozsahu léčby a stanovení prognózy. Velký význam má u kolorektálního karcinomu zejména vyšetření dostatečného počtu lymfatických uzlin. Pacienti v I. a II. klinickém stádiu kolorektálního karcinomu jsou považováni za vyléčené již chirurgickým výkonem a chemoterapie není u nich většinou indikována. Naopak pacienti III. klinického stádia mají prospěch z podání adjuvantní chemoterapie, která zlepšuje jejich parametry přežití. Ukazuje se ale, že až u 30-50% procent pacientů nízkých klinických stadií dojde po radikální chirurgické léčbě k rozvoji vzdálených metastáz ^(Kune et al., 1990; Bohm et al., 1993). Jedním z důvodů vzniku recidivy onemocnění je počáteční „understaging“ (podhodnocení stádia onemocnění) a následný „undertreatment“ (nedostatečná

léčba) pacienta. Understaging je často způsoben malým počtem vyšetřených lymfatických uzlin (Mitchell et al., 2009) anebo přítomností mikrometastáz a cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells, CTC), které jsou klasickými stážovacími postupy nepostihnutelné. Ty jsou považovány za prekursory metastáz a zodpovídají za rozvoj recidivy onemocnění (Tsavellas et al., 2001). V poslední době se objevují práce, které se vedle tradičního "stagingu" (rutinní zobrazovací a mikroskopické metody) zabývají tzv. "ultrastagingem". Je tím míněna detekce MRD a mikrometastáz, které nejsou běžnými metodami zjištěitelné. Metodicky se jedná ponejvíce o práce založené na RT-PCR detekci exprese specifických markerů jako jsou CEA, CK20, EGFR, hTERT aj. (viz výše). O prognostickém významu přítomnosti MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem toho však nebylo publikováno mnoho. Uen a spol. publikoval v posledních letech práce, prokazující prognostický význam CTC v periferní krvi (Uen et al., 2007; Uen et al., 2008). Za použití membránových arrays s markery CK19, CK20, CEA a hTERT prokázal přítomnost CTC v pooperační periferní krvi u 27,3% pacientů ze souboru 194 pacientů II. klinického stádia kolorektálního karcinomu a při mediánu sledování 40 měsíců prokázal statisticky významně kratší přežití u pacientů s přítomností exprese všech čtyř použitých markerů ($p < 0,001$). Další jeho studie již čítala 438 pacientů klinického stádia I.-III. kolorektálního karcinomu a zabývala se přítomností CTC ve vzorku periferní krve jeden den před a jeden týden po radikální operaci. Autoři prokázali silnou korelaci mezi přítomností CTC v pooperačním vzorku krve a horším obdobím bez známek onemocnění (disease free survival, DFS).

V práci Allen-Mershe a spol. (2007) byla metodou RT-PCR za použití CEA a CK20 sledována přítomnost CTC u 196 pacientů s kolorektálním karcinomem a její vliv na predikci recidivy nádorového onemocnění. Přítomnost CTC byla stanovována v periferní krvi jeden den před a jeden den a jeden týden po operačním výkonu a byla nalezena statisticky významná korelace mezi přítomností CTC v krvi 24 hodin po operaci a kratším DFS ($p < 0,001$).

Sadahiro a spol. (2007) prokázal na své studii s 200 kurativně operovanými pacienty s kolorektálním karcinomem za použití metody RT-PCR pro CEA významně horší DFS a celkovým přežitím (overall survival, OS) u pacientů s přítomností CTC v periferní krvi jeden týden po operaci ($p < 0,007$, $p < 0,04$).

Nutno podotknout, že přes dlouhou dobu, co se vědecké týmy po celém světě snaží objasnit prognostický význam přítomnosti CTC/DTC u pacientů nejenom s kolorektálním karcinomem, je důkazů o jejím významu stále poskrovnu.

1.4.2 Minimální reziduální choroba u pacientek s karcinomem prsu

Podobně jako u kolorektálního karcinomu, se až u poloviny případů primárně operabilního karcinomu prsu objeví do 5 let od diagnózy vzdálené metastázy. I když nejsou infiltrovány axilární lymfatické uzliny, recidiva se objeví až ve 25% případů. V této skupině pacientek relativně nízkého rizika diseminace je tedy zcela nezbytné identifikovat nové prognostické markery s cílem odlišit pacientky vyléčené již chirurgickým zákrokem od nemocných, kde je nutná intenzivnější pooperační léčba. Právě vhodně zvolenou pooperační léčbou by mělo dojít k eliminaci okultních nádorových buněk, a tím ke snížení rizika recidivy s prodloužením celkového přežití ^(Peto et al., 2000). Vyšetření minimální reziduální choroby by bylo možné využít pro monitorování léčebné odpovědi na adjuvantní léčbu, což dosud není možné žádnou vyšetřovací metodou ^(Zehentner et al., 2006). MRD lze v klinické praxi detekovat v kostní dřeni, periferní krvi a spádových lymfatických uzlinách. V poslední době je věnována značná pozornost vyšetření sentinelové mamární/axilární lymfatické uzliny ^(Kurosumi et al., 2007; Gimbegues et al., 2007). Jako nejspolehlivější se z hlediska prognostického významu pro vznik vzdálených metastáz jeví vyšetření kostní dřene ^(Benoy et al., 2006).

Mezi nejčastěji používané markery pro detekci MRD metodou RT-PCR u pacientek s karcinomem prsu patří cytokeratiny (CK), zejména CK19, dále karcinoembryonální antigen a mamaglobin (viz výše).

Co se týče prognostického významu MRD u karcinomu prsu, bylo doposud v hlavních mezinárodních odborných časopisech publikováno 15 velkých studií s celkem 3240 pacientkami vyšetřeny na přítomnost minimální reziduální choroby (stanovené převážně pomocí CK) v kostní dřeni metodikami založenými na imunohistochemickém principu ^(Braun et al., 2001; Gebauer et al., 2001). Výsledky jsou navzájem obtížně srovnatelné vzhledem k variabilitě použitých protilátek, metodik zpracování vzorku apod. Proto ani nepřekvapuje, že v doposud jediné metaanalýze ^(Funke et al., 1998), kde bylo hodnoceno 2494 pacientek z celkem 20 klinických studií, nebyl prognostický význam minimální reziduální choroby jako nezávislého prognostického faktoru prokázán. Nicméně v 7 analyzovaných studiích byl potvrzen významně kratší čas do vzniku vzdálených metastáz a v 6 z nich (1906 pacientek) kratší celkové přežití u pacientek s reziduální chorobou. Navíc ve 4 publikacích (1507 pacientek) byly tyto výsledky podpořeny multivariační analýzou. Tyto studie patřily velikostí souboru a metodikou mezi nejlépe provedené.

Metodika real-time RT-PCR je v této indikaci některými odborníky zpochybňována z hlediska specificity, která závisí na počtu amplifikačních cyklů a designu primerů. Na rozdíl od imunocytochemických studií existuje jen několik málo prací hodnotících reziduální chorobu v

kostní dřeni (Janků et al., 2004). Prognostická hodnota byla potvrzena pouze v některých z nich (Jung et al., 2003). Otázkou zůstává, zda okultní nádorové buňky jsou opravdovou známkou hematogenní diseminace nebo zda se jedná spíše o buňky s nízkou proliferační aktivitou bez schopnosti dalšího dělení a šíření. Dle některých autorů tyto buňky jen zřídka proliferují v době primární diagnózy, což potvrzuje negativita proliferačního markeru Ki-67 (Pantel et al., 1994). To může vysvětlovat, proč v současnosti používané cytostatické adjuvantní režimy jsou někdy neúčinné v eliminaci okultních nádorových buněk.

2. Experimentální část

2.1 Cíle práce

Použití kvantitativní RT-PCR pro detekci MRD není rutinní ani standardizovanou metodou. Z důvodu vysoké senzitivity metody na veškeré okolní vlivy je nutno tuto metodiku optimalizovat na konkrétní projekt, včetně návrhu specifických primerů a volby izolačních technik. Metodickým cílem této práce bylo navrhnout, zoptimalizovat a provést validaci metody kvantitativní RT-PCR pro detekci MRD u nejčastějších solidních nádorů, za použití panelu nádorově specifických markerů (kapitola 2.3.1). Cílem bylo identifikovat dostatečně senzitivní a specifické markery nádorových buněk pro detekci MRD u solidních tumorů. A to jak validací již publikovaných markerů, tak identifikací nových markerů např. metodami DNA microarray (kapitola 2.3.2). Ověření specificity vybraných markerů na retrospektivním souboru tumorů různého histogenetického původu, sestavení nádorově specifických panelů markerů a prospektivní diagnostika metastáz a výpotků neznámého původu bylo dalším cílem předkládané práce (kapitola 2.3.3).

Hlavním cílem předkládané práce bylo zhodnotit klinický význam vyšetření MRD, a to zejména na prospektivních skupinách pacientů s karcinomem prsu a s kolorektálním karcinomem (kapitola 2.3.4). Cílem bylo posoudit u skupiny pacientů s časnými stádii nádorového onemocnění vliv minimální reziduální choroby na dobu do recidivy onemocnění, dobu do vzniku vzdálených metastáz a celkové přežití, dále porovnat korelace s ostatními prognostickými faktory (velikost nádoru, postižení uzlin, grading, histologie atd.).

Posledním cílem práce bylo využít metodiku kvantitativní RT-PCR pro objasnění mechanismů účinku nových látek s potencionálním protinádorovým účinkem, zejména látek ze skupiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz (kapitola 2.3.5).

2.2 Materiál a metody

2.2.1 Materiál

Vzorky periferní krve a kostní dřeně byly odebírány v množství 10ml, resp. 3ml, do standardních zkumavek s EDTA. Z důvodu možné kontaminace vzorku kožními epitelii byla odebírána až druhá porce vzorku nebo byl prováděn odběr, např. u kostní dřeně, z drobné kožní incize. Odběry byly prováděny s informovaným souhlasem pacientů, po schválení projektu etickou komisí. Peroperační odběry byly prováděny v celkové anestezii, kontrolní odběry kostní dřeně v anestezii lokální. Vzorek kostní dřeně byl odebírán ve většině případů ze sternální punkce. Po odběru a dokonalém promíchání vzorku s EDTA byly vzorky krve a dřeně neprodleně transportovány do laboratoře k dalšímu zpracování.

Vzorky tkání se okamžitě po odběru vkládaly do zkumavek obsahujících 700 μ l roztoku RNA Later. V tomto roztoku jsou obsaženy ribonukleázové inhibitory, tkáň se v roztoku stabilizuje a je při připravena pro další analýzy RNA, DNA nebo proteinů. Takto uložený vzorek je stabilní při pokojové teplotě; po odběru vzorku následoval transport do laboratoře k dalšímu zpracování.

2.2.2 Izolace jaderných buněk osmotickou lýzou

Pro izolaci RNA a následné molekulárně biologické aplikace je nutné provést odstranění erytrocytů ze vzorků krve a kostní dřeně. A to zejména kvůli přítomnosti hemu, který je inhibítorem mnoha v molekulární biologii používaných enzymů. Jedním ze způsobů odstranění je osmotická lýza, kdy méně odolné erytrocyty jsou lyzovány a následně odmyty, zatímco jaderné buňky včetně buněk nádorových jsou uchovány.

Lyzační roztok (10x koncentrovaný) - složení: 1,55M NH_4Cl , 0,1M NH_4HCO_3 , 1mM EDTA

Promývací roztok (Phosphate Buffer Saline, PBS) (10x koncentrovaný) - složení: 1,4M NaCl, 0,03M KCl, 0,1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,015M KH_2PO_4

Vzorek krve nebo kostní dřeně byl bezprostředně po doručení do laboratoře lyzován na ledu vychlazeným 1x koncentrovaným lyzačním roztokem v poměru ke vzorku 4:1 po dobu 15-30 minut do vyčechení lyzátu. Zlyzované vzorky centrifugujeme při 2200rpm, 20 minut, 4°C, po odstranění supernatantu vzorek ještě jednou promyjeme lyzačním roztokem a zcentrifugujeme. Následuje promytí v promývacím roztoku, po centrifugaci 2200rpm, 10 minut, 4°C a odstranění supernatantu změření koncentrace jaderných buněk na Coulter Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) a rozplnění alikvotů po 11×10^6 buněk do připravených zkumavek.

K těmto alikvotům byl pomalu za současného propipetování přidán 1ml TRI reagentu a vzorek byl zamražen.

2.2.3 Izolace RNA

Pro izolaci celkové RNA jsme se rozhodli používat fenol-chloroformovou metodu, komerční chemikálii TRI reagent (MRC, Cincinnati, Ohio, USA), což je směs guanidinu thiokyanátu a fenolu. Ke směsi TRI reagentu a vzorku se přidá chloroform, během centrifugace se směs rozdělí do tří fází. Horní vodná fáze obsahuje RNA, interfáze DNA a spodní organická fáze obsahuje proteiny, je tedy možné současně izolovat z jednoho vzorku RNA, DNA i proteiny. RNA rozpuštěná ve vodné fázi se precipituje izopropanolem, promyje ethanolem a rozpustí ve vodě. Metoda je vhodná pro izolaci RNA všech typů o délce 0,1-15kb. Kvalita vyizolované RNA byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy, následně pak bioanalyzárem Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), koncentrace a čistota byla ověřena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA). Při použití 1ml TRI reagentu lze izolovat RNA z 50-100mg tkáně a z 5-11 miliónů buněk. Typické výtěžky jsou u tkání v rozsahu 1-10 μ g RNA/mg tkáně, u epiteliálních kultivovaných buněk 8-15 μ g RNA/10⁶ buněk, u krve 3 μ g/1ml krve.

Lze použít čerstvé nebo zamražené buněčné TRI lyzáty (koncentrace 5-11 miliónů buněk/1ml TRI reagentu). Izolace RNA začíná přidáním 200 μ l chloroformu ke vzorku, následně necháme vzorek stát 10 minut při pokojové teplotě, poté centrifugujeme 15 minut při 12 000g, 4°C. Při centrifugaci dojde k oddělení vrstev - spodní růžová vrstva obsahuje detrit, lipidy a proteiny, prostřední mezivrstva je prstenec DNA a horní, vodná čirá vrstva obsahuje RNA. Vrchní vodnou fázi obsahující RNA přepitujeme do čisté zkumavky a provedeme precipitaci RNA přidáním 400-500 μ l isopropanolu. Následně centrifugujeme 10 minut při 12 000g, 4°C, na dně zkumavky by měla zůstat bílá popř. průhledná RNA peleta, odstraníme opatrně supernatant a RNA peletu promyjeme 1,5ml 75% ethanolu. Po centrifugaci a odstranění supernatantu přidáme k RNA peletě cca 25 μ l DEPC vody (21-60 μ l podle velikosti peletky) a obsah několikrát propipetujeme. Rozpuštěnou RNA dlouhodobě uchováваме při -70°C až -80°C. Pro izolaci RNA z tkání (fixovaných např. v RNA Lateru) je nadmíru důležitá rychlá a dokonalá homogenizace vzorku. Po vyzkoušení několika metodických přístupů jsme našli postup vhodný pro naprostou většinu aplikací. Do zkumavky s 1ml TRI reagentu jsou přidány 2 sterilní skleněné kuličky o průměru 5mm a vzorek vyšetřované tkáně o velikosti cca 3x3x3mm. Přístrojem Mixer Mill 300 (Retsch, Haan, Německo) provedeme homogenizaci při maximální rychlosti 30Hz po dobu 3-4 minut. Díky homogenizaci v TRI reagentu nedochází

k enzymatické degradaci izolované RNA, zároveň nedochází ani k mechanické degradaci při zachovalém vysokém výtěžku RNA. Po homogenizaci se ke vzorku přidá chloroform a postupuje se dle výše popsaného postupu.

2.2.4 Reverzní transkripce

Stanovení genové exprese metodou reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) je založeno na reverzní transkripci a na následné PCR analýze. Při reverzní transkripci dochází pomocí enzymu reverzní transkriptázy k přepisu RNA do komplementární jednovláknové DNA (cDNA). Reverzní transkriptáza je přítomna v retrovirech; nejčastěji používané transkriptázy pochází z Moloneyho viru myší leukemie (M-MuLV), nebo z viru ptačí myeloblastózy (AMV). Pro reverzní transkripci je vhodné používat enzymy bez H RNázové aktivity. Při reverzní transkripci je dále nutno použít primery. Lze používat buď specifické mRNA primery, oligo-dT primery nebo náhodné hexamery. Nejvyšší výtěžnost mají náhodné hexamery, nejvyšší specificitu mají specifické mRNA primery. K ochraně mRNA při reverzní transkripci je vhodné používat inhibitory ribonukleáz, např. RNAsin (Promega, Madison, WI, USA).

V předkládané práci bylo použito RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Vilnius, Litva) a náhodných primerů (Promega, Madison, WI, USA).

V celém procesu reverzní transkripce se vyskytuje několik kritických bodů, ovlivňujících konečný výsledek – denaturace sekundárních struktur RNA, navázání primerů, optimální funkce reverzní transkriptázy. Důležitým předpokladem pro úspěšnou reverzní transkripci je dodržování předepsaných teplotních kroků a přesné pipetování.

Reverzní transkripci provádíme ze 3 μ g vyzolované celkové RNA v reakčním objemu 30 μ l. Směs 3 μ g RNA, 0,3 μ g hexamerů a doplněnou vodou do objemu 19,5 μ l inkubujeme v termocykléru s vyhříváním víčkem při 70°C po dobu 5 minut. Poté vzorek rychle zchladíme na ledu po dobu cca 1 minuty. MasterMix připravený z 6 μ l 5x RT pufru, 3 μ l 10mM dNTP a 30U RNAsinu přidáme ke schlazenému vzorku RNA s hexamery a vodou a ponecháme 5 minut při pokojové teplotě. Po přidání 150U reverzní transkriptázy inkubujeme vzorek v termocykléru s vyhříváním víčkem při 42°C po dobu 60min, poté 10min 70°C. Po inkubaci vzorek zchladíme a uložíme do -20°C do dalšího zpracování.

2.2.5 Real-time RT-PCR

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time PCR) je enzymatická reakce, která je umožněna primery, specifickou fluorescenčně značenou sondou (Tab. 1) a termostabilní DNA-

polymerázou. Průběh reakce je snímán termocyklérem v reálném čase jako změny fluorescence, v našem projektu se jednalo o real-time cyclery Rotor Gene 2000, resp. 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Po přidání standardů k reakci a vytvoření standardizační křivky lze hodnotit množství specifické vyšetřované sekvence ve vzorku. Ke každé polymeráze je dodáván reakční pufr o vhodném složení. Optimální koncentrace hořčičných iontů je optimalizována pro každou sadu primerů, standardem je dnes již použití tzv. hot-start DNA-polymerázy, v našem případě jsme použili Thermo-Start DNA Polymerase (Abgene, Epsom, Velká Británie). Primery, očka, jsou krátké oligonukleotidy (o délce cca 20-25bp), které vymezují amplifikovaný úsek DNA, specifická hydrolyzační TaqMan sonda je krátký oligonukleotid značený fluorescenční barvou a zhášečem. Syntéza primerů a sond byla provedena firmou Generi Biotech, s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika). Všechny primery a próby jsou vlastního návrhu. Teplota nasedání primerů byla orientačně vypočítána z nukleotidového složení a následně experimentálně ověřena při optimalizaci amplifikačních cyklů.

Samotná PCR je prováděna ze 100ng cDNA, resp. celkové RNA vstupující do reverzní transkripce, v reakčním objemu 25 μ l. Připravíme si MasterMix ze 2,5 μ l 10x PCR pufru, 0,5 μ l 10mM dNTP, zoptimalizovaného množství primerů, próby a MgCl₂, DEPC vody a 1U Taq polymerázy (Tab. 2). Do připravených 0,1ml zkumavek rozpipetujeme 24 μ l MasterMixu, 1 μ l cDNA vzorků, 1 μ l DEPC vody jako „no template“ kontrolu, 1 μ l cDNA pozitivní kontroly a 1 μ l specifických standardů. Zkumavky vložíme do karuselu přístroje, vyvážíme, provedeme automatickou kalibraci snímání fluorescence přístroje a spustíme příslušný amplifikační program (Tab. 2). Po proběhnutí real-time PCR je provedena samotná analýza.

Získané výsledky exprese jednotlivých markerů jsme se rozhodli normalizovat na množství vyzolované RNA vstupující do reverzní transkripce a nikoliv k expresi housekeepingových genů, např. GAPDH, a to hlavně z důvodu jejich inter- a intraindividuální variability^(Bustin, 2002).

Pro provedení absolutní kvantifikace exprese jednotlivých markerů metodou real-time RT-PCR bylo nutno sestavit standardizační křivku. Jako standardy byly použity desetinasobně ředěné PCR amplikony obsahující v sobě sekvenci testovaného markeru. Výpočet množství kopií byl proveden na základě známé molekulové hmotnosti (délka amplikonu), spektrofotometricky určené koncentrace a Avogadrovy konstanty.

2.2.6 Statistika

Statistické vyhodnocení naměřených údajů bylo provedeno pomocí programu Statistica 8 od firmy StatSoft. Ve všech testech byla nastavena mezní hladina významnosti $\alpha=0,05$.

Shapiro-Wilkovým testem jsme u výsledků exprese jednotlivých markerů identifikovali porušení normality, proto jsme následné statistické analýzy provedli neparametricky (Kruskal-Wallisovou Anovou, Mann-Whitneyovým testem). Závislosti mezi expresí markerů byly ověřovány testem nulovosti Spearmanova korelačního koeficientu.

V analýzách přežití jsme použili Kaplan-Meierovu metodu a Gehanův-Wilcoxonův test, kde počátkem sledování u každého pacienta je vždy datum operačního výkonu s odběrem vzorků.

Při analýzách kontingenčních tabulek byl použit Pearsonův χ^2 -test. I

2.3 Výsledky

2.3.1 Optimalizace detekce minimální reziduální choroby metodou kvantitativní RT-PCR

2.3.1.1 Design primerů

K návrhu, designu a ověření vhodnosti primerů a prób pro detekci MRD u solidních tumorů byly použity volně přístupné internetové databáze a servery (PubMed, Primer 3, IDTDNA).

Server PubMed (www.pubmed.com) je nejvýznamnějším zdrojem dat a literárních údajů a zároveň komplexním pracovním nástrojem pro molekulární biologii, biotechnologii, biochemii a medicínu. Jeho součástí je několik databází, které slouží nejen k vyhledávání sekvencí a struktur genů, genomů, proteinů, ale také k vyhledávání literatury a analýze molekulárně biologických dat (OMIM, PubMed, BLAST).

Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) je volně přístupný software určený k designu primerů a prób, nejenom pro real-time PCR reakce. Software umožňuje libovolné nastavení požadovaných parametrů (velikost primerů nebo próby, obsah GC bazí v %, T_m , velikost produktu atd.) a automaticky dle zadaných požadavků navrhuje nejvhodnější sekvence oligonukleotidů.

IDTDNA (www.idtdna.com) je server, jehož součástí jsou programy - nástroje používané k analýze vlastností navržených primerů a prób, např. schopnost tvořit dimery nebo vlásenky. Lze jej použít také k designu primerů.

Na serveru PubMed byla vyhledána mRNA sekvence vybraných markerů pro detekci MRD u solidních tumorů (Tab. 1) a bylo určeno intron-exonové rozhraní. Konkrétní geny, markery byly zvoleny na základě publikovaných údajů, primery a próby jsou vlastního designu.

Pro design primerů a prób softwarem Primer3 jsme zvolili následující standardní podmínky: délka ampliconu 100-200bp, délka primerů 18-25bp, délka prób 25-30bp, annealingová teplota primerů 60°C, annealingová teplota prób 70°C, poměr GC 30-70%. Navržené sekvence oligonukleotidů byly poté podrobeny „blastování“ programem BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) a ověřeny, zda jsou komplementární pouze k vybraným genům. Dále byla provedena analýza tvorby self- a heterodimerů a vlásenek mezi primery a próbami na serveru www.idtdna.com. Na základě všech analýz byly vybrány vhodné sekvence, dostatečně specifické a netvořící dimery ani vlásenky (Tab. 1).

Tab. 1. Sekvence použitých primerů a sond

Název	Sekvence	Kód
Mamaglobin 1, secretoglobin (SCGB2A2)		NM_002411
MAMs	5' - catgaagtgctgatggcct - 3'	
MAMas	5' - cttgtattcagcttagacactgtgg - 3'	
MAMp	5' - agcactgctacgcaggctctggct - 3' BHQ1 - HEX	
Cytokeratin 19 (CK19)		NM_002276
CK 19s	5' - ccgcgactacagccactact - 3'	
CK 19as	5' - agagcctgttccgtctcaaa - 3'	
CK 19p	5' - ccatccaggacctgcgggac - 3' BHQ1 - HEX	
Cytokeratin 20 (CK20)		NM_019010
CK 20s	5' - cgacttgaacaggaaattgcta - 3'	
CK 20as	5' - tgccatccactacttcttgc - 3'	
CK 20p	5' - accgccgccttctggaagga - 3' BHQ1 - HEX	
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 (CEACAM5)		NM_004363
CEAs	5' - taagtgttgaccacagcgacc - 3'	
CEAas	5' - gttccatcaatcagccaagaa - 3'	
CEAp	5' - atgtcctctatggcccagacgacc - 3' BHQ1 - HEX	
Epidermal growth factor receptor 1 (EGFR1)		NM_005228
EGFRs	5' - acttcaaaaactgcacctccat - 3'	
EGFRas	5' - aatcagcaaaaaccctgtgatt - 3'	
EGFRp	5' - acatcctgccggtggcatttagg - 3' BHQ1 - HEX	
Thyroid transcription factor 1 (TTF1)		NM_003317
TTF1s	5' - aggacaccatgaggaacagc - 3'	
TTF1as	5' - ccatgccgctcatgttc - 3'	
TTF1p	5' - cccgccatctcccgttcat - 3' BHQ1 - HEX	
Tumor-associated calcium signal transducer 1 (TACSTD1)		NM_002354
EpCAMs	5' - aaacacaagcaagagaaaaacct - 3'	
EpCAMas	5' - aattttggatccagttgataacg - 3'	
EpCAMP	5' - ttgaggactgcacttcagaagga - 3' BHQ1 - HEX	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)		NM_002046
GAPDHs	5' - gaagatggtgatgggatttc - 3'	
GAPDHas	5' - gaaggtgaaggctcggagt - 3'	
GAPDHp	5' - caagcttcccgttctcagcc - 3' BHQ1 - FAM	

2.3.1.2 Optimalizace kvantitativní RT-PCR

Pro každý primerový pár a próbu byl optimalizován teplotní profil s důrazem na annealingovou teplotu, dále koncentrace hořčíku a koncentrace primerů. Cílem optimalizace byla amplifikace pouze specifického produktu v co nejnižší Ct hodnotě (cycle treshold) a vyhnout se amplifikaci nespecifických produktů a primer-dimerů. Při použití optimalizovaných koncentrací a teplotních profilů (Tab. 2) dochází k amplifikaci pouze specifických produktů (Obr. 2).

Tab. 2 Optimalizované koncentrace oligonukleotidů, sond, hořečnatých kationtů a PCR teplotní schémata

Marker	Finální koncentrace				Teplotní profil	Produkt (bp)
	Primer sense (nM)	Primer antisense (nM)	Próba (nM)	MgCl ₂ (mM)		
CEA	300	600	200	3	95°C/15sec - 65°C/15sec	179
EGFR	400	400	200	3	95°C/15sec - 62°C/15sec	149
MAM	800	400	200	3	95°C/15sec - 63°C/20sec	131
GAPDH	300	300	200	3	95°C/15sec - 60°C/30sec	226
CK 19	400	400	200	3	95°C/15sec - 61°C/15sec	153
CK 20	400	400	200	3	95°C/15sec - 60°C/15sec	148
EpCAM	400	400	200	6	95°C/15sec - 59°C/15sec	95
TTF1	400	200	200	3	95°C/15sec - 63°C/15sec	120

2.3.1.3 Specificita

2.3.1.3.1 Negativní kontroly

Pro stanovení specifčnosti vyšetření minimální reziduální choroby na základě stanovení exprese specifických nádorových markerů-genů byly vyšetřeny vzorky krve 58 zdravých dobrovolných dárců krve a dále vzorky kostní dřeně od 12 pacientů a lymfatické uzliny od 3 pacientů operovaných pro nezhoubná nezánetlivá onemocnění (hernioplastika, polypektomie, cholecystektomie apod.). Byla provedena real-time RT-PCR reakce dle uvedených optimalizovaných podmínek (Tab. 2) a výsledky byly statisticky zpracovány. Jako cut-off hodnota pro hodnocení pozitivity versus negativity MRD při reálném vyšetření patientských vzorků byl použit trojnásobek průměrné hodnoty exprese markeru v kontrolním souboru (Tab. 3). U některých markerů byla tato hodnota následně upravena při statistických analýzách parametrů přežití, které umožnily upřesnit původní limitní hodnoty. Při hodnocení diagnostické specifčnosti byla jako falešně pozitivní výsledek hodnocena exprese vyšší než cut-off hodnota. Výpočet diagnostické specifčnosti proveden dle vzorce: správná negativita / (správná negativita + falešná pozitivita).

Diagnostická specifita je u všech testovaných markerů nad úrovní 95% (krom CEA 94,4%) viz. Tab. 4.

Tab. 3 Kvantitativní exprese epiteliálních markerů v krvi, kostní dřeni a lymfatických uzlinách zdravých jedinců

Expresa v negativních kontrolách (počet kopií/μg RNA)				
Marker		Krev	Kostní dřeň	Lymf. uzlina
CEA	Mean	88.3	155.6	5.0
	SD	111.5	124.8	7.1
	Cut-off	200.0	350.0	250.0
MAM	Mean	20.0	108.3	0.0
	SD	84.1	128.9	0.0
	Cut-off	200.0	250.0	10.0
EGFR	Mean	49.2	15 528.3	216 098.3
	SD	127.1	21 960.4	63 025.4
	Cut-off	250.0	30 000.0	ND
TTF1	Mean	0.0	ND	ND
	SD	0.0	ND	ND
	Cut-off	0.0	ND	ND
CK19	Mean	1 117.1	241.7	646.7
	SD	1 029.9	194.0	500.2
	Cut-off	3 000.0	500.0	5 000.0
CK20	Mean	5 140.1	0.0	0.0
	SD	7 342.1	0.0	0.0
	Cut-off	5 000.0	2 000.0	10.0
EpCAM	Mean	88 407.2	1 735 362.5	16 416.7
	SD	63 900.7	900 700.9	4 213.9
	Cut-off	250 000.0	ND	1 000 000.0

Tab. 4 Diagnostická specifita jednotlivých markerů pro detekci MRD v systémové krvi

Marker	Specifita %
CEA	94,4
MAM	100,0
EGFR1	98,3
TTF1	100,0
EpCAM	97,7
CK 19	98,3
CK 20	96,5

2.3.1.3.2 Genomická DNA

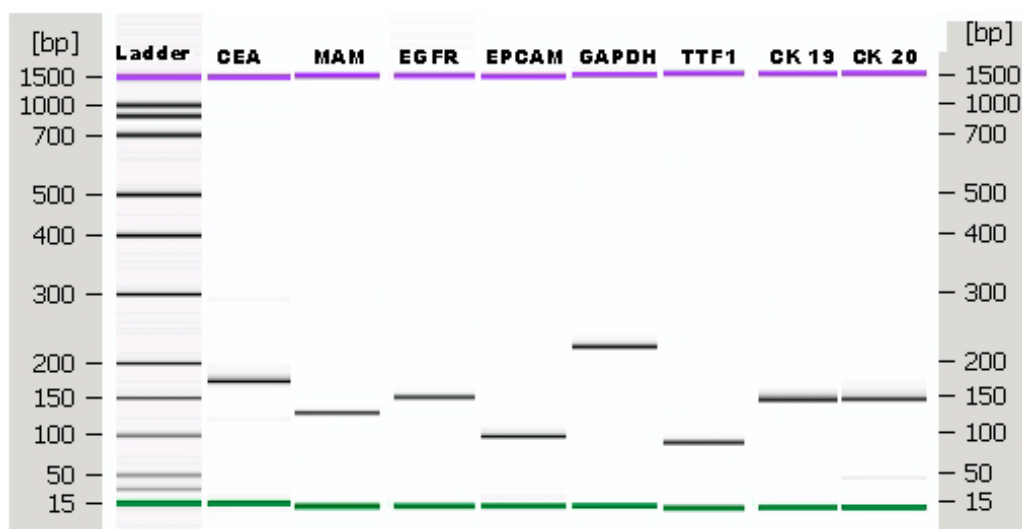
Všechny primery byly navrženy tak, aby se zabránilo amplifikaci genomické DNA při eventuální kontaminaci vzorku RNA genomickou DNA (design s exonovým přesahem). Specifičnost sekvencí navržených primerů byla ověřena prvotně při designu oligonukleotidů veřejně dostupnými databázemi (Blast). Pro ověření specifity amplifikace pouze cDNA (RNA) a nikoliv gDNA bylo provedeno vyšetření 29 vzorků gDNA od pacientů se zhoubným tumorem. Byla provedena real-time PCR dle uvedených schémat (Tab. 2).

Všechny fluorescenční křivky za použití CEA, TTF1, CK 19, CK 20 a MAM zůstaly zcela vodorovné, bez detekce jakéhokoliv signálu přítomnosti vznikajícího specifického produktu. V případě EGFR se po 40. cyklu jedenkrát objevil zanedbatelný nespecifický signál řádově v jednotkách kopií genů. V případě EpCAM byl zachycen ojedinělý slabý signál u jednoho z 58 vyšetření. U GAPDH je však přítomna ve vysoké míře amplifikace specifického produktu, avšak stále o 3-4 řády nižší než v případě RNA, což nebrání použití GAPDH jako orientačního housekeepingového genu.

2.3.1.3.3 Amplifikace specifických produktů

Pro ověření amplifikace specifického produktu byla provedena po proběhlé real-time RT-PCR (50 cyklů s markery a sondami dle uvedených schémat, viz. Tab. 2) gelová elektroforéza přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) s detekcí specifického produktu o definované velikosti. Dále byla analyzována event. produkce nežádoucích primer-dimerů. Dle Primer 3 softwaru užitého při navrhování primerů a prób by měly mít specifické amplikony následující délku: CEA 179bp, MAM 131bp, EGFR 149bp, EpCAM 95bp, GAPDH 226bp, TTF1 100bp, CK19 153bp a CK20 148bp.

Všechny používané primerové páry s próbou amplifikují produkt o předem definované délce a krom CK 20 netvoří žádné primer-dimery. U CK 20 dochází v závislosti na míře exprese CK 20 v daném vzorku k občasně tvorbě malého, prakticky zanedbatelného, množství primer-dimerů (Obr. 2).



Obr. 2 Virtuální polyakrylamidová elektroforéza (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

2.3.1.4 Senzitivita – diluční řady

Z povahy vyšetření MRD a z biologické povahy a proměnlivosti vzorků nelze stanovit správnou či falešnou pozitivitu. Pro projekt detekce disseminovaných nádorových buněk v těle pacientů se zhoubným tumorem na základě exprese tumor-specifických markerů v krvi bylo provedeno testování senzitivity metodiky na základě dilučních řad. Nádorové buňky získané z reálných vzorků nativních tumorů byly přidány do vzorků jaderných buněk krve získaných od zdravých dobrovolníků v poměru 1:1 až 1: 10 000 000. Následně byla provedena real-time RT-PCR o 50 cyklech s markery a sondami dle uvedených schémat (Tab. 2).

Citlivost detekce disseminovaných nádorových buněk dosahovala za použití CEA $3,3 \times 10^{-7}$, EGFR $2,5 \times 10^{-7}$, EpCAM, CK 19 a CK 20 1×10^{-6} . Za použití MAM bylo dosaženo citlivosti 2×10^{-6} . Expres TTF1 je nízká i v primárním tumoru, diluční experiment v dostatečném rozsahu nebylo možno provést (Tab. 5).

Tab. 5

Senzitivita jednotlivých markerů pro detekci MRD

Marker	Senzitivita (počet nád. bb./počet nenád. bb.)
CEA	$3,3 \times 10^{-7}$
MAM	2×10^{-6}
EGFR1	$2,5 \times 10^{-7}$
TTF1	nestanoveno
EpCAM	1×10^{-6}
CK 19	1×10^{-6}
CK 20	1×10^{-6}

2.3.1.5 Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Pro testování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti vyšetření byla provedena real-time RT-PCR reakce stanovující expresi CEA (Tab. 2). Pro ověření opakovatelnosti byly vzájemně porovnány výsledky exprese CEA v jedné sérii – v jednom dni, jedním pracovníkem, 5x1 vzorek ve třech koncentracích na okrajích a ve středu detekčního rozmezí, pro testování reprodukovatelnosti bylo provedeno totéž v různých dnech a různými pracovníky.

Výsledky testování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti byly statisticky zpracovány a nejistota měření byla vyjádřena směrodatnou odchylkou. Po statistickém zhodnocení výsledků nebyly mezi testovanými soubory nalezeny statisticky významné rozdíly (Tab. 6).

Tab. 6

Validace opakovatelnosti a reprodukovatelnosti vyšetření MRD pro CEA

Opakovatelnost, reprodukovatelnost (kopieCEA/ μ g RNA/ průměr \pm směrodatná odchylka)			
	1. analýza	2. analýza	3. analýza
Vzorek XY	3901540,2 \pm 282322,6	2302267,4 \pm 384178,5	3518325,4 \pm 462366,1
Vzorek XY 100x ředěný	30647,4 \pm 5372,9	28981,8 \pm 8582,1	24345,4 \pm 7738,9
Vzorek XY 10 tis.x ředěný	191,8 \pm 40,6	67 \pm 18,8	20,2 \pm 8,5

2.3.1.6 Expresse markerů v nádorových liniích a lidských karcinomech

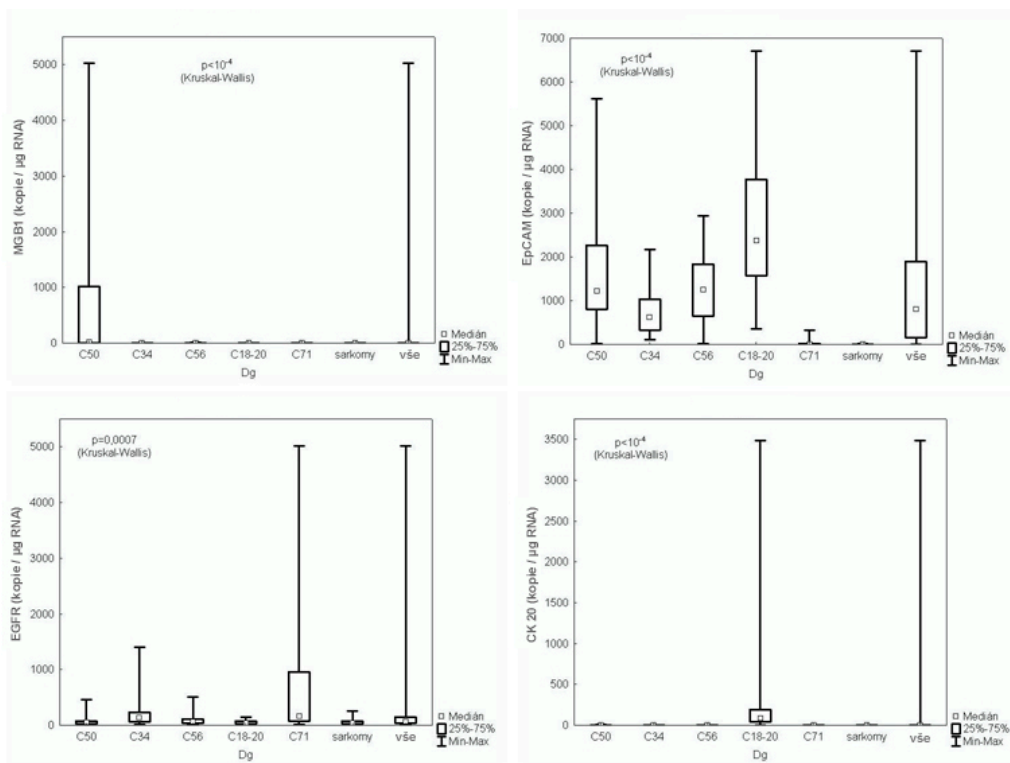
Pro ověření specifity vybraných markerů pro detekci MRD u jednotlivých nádorových diagnóz byla prvotně stanovena jejich exprese u nádorových linií odvozených od nejčastějších typů lidských karcinomů. Nádorové linie byly kultivovány za standardních podmínek, ze získané RNA poté byla provedena QRT-PCR viz výše (Tab. 2). Výsledky po normalizaci exprese specifických markerů k expresi GAPDH ukazují na možnost použití mamaglobinu, EGFR nebo EpCAM k detekci MRD u tumorů prsu (pozitivní u MCF 7, BT 549, MDA MB 231), u karcinomu kolorekta lze použít CK19, CK20, CEA, EGFR (pozitivní u HT 29, HCT 116 a SW 620), pro detekci MRD u karcinomu plic se jeví být vhodným markerem EGFR a TTF1 (pozitivní u A 549). V leukemických liniích je exprese těchto specifických znaků minimální (K562, CEM). Pro detekci MRD u karcinomu pankreatu není žádný z testovaných markerů dostatečně senzitivní ani specifický (HPaC) (Tab. 7).

Tab. 7 Expresse jednotlivých markerů v lidských nádorových liniích

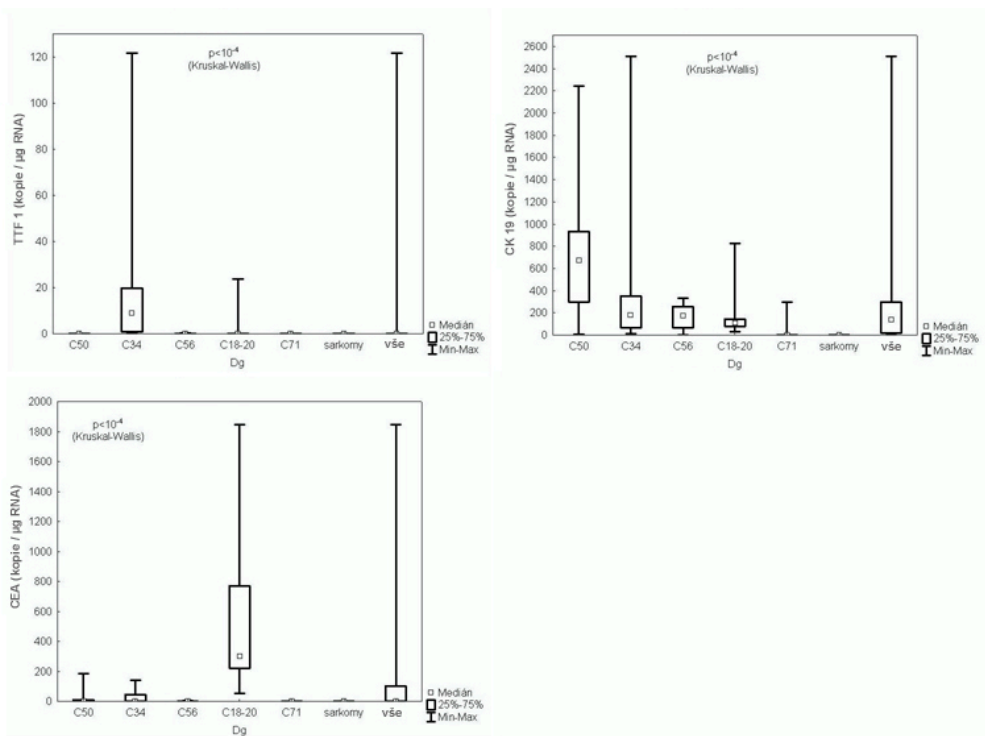
Expresse markerů v nádorových liniích (normalizace dle exprese GAPDH)							
	MAM	CK 19	CK 20	CEA	EGFR	TTF1	EpCAM
K 562	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34
CEM	0.00	ND	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HT 29	0.00	0.30	0.14	0.06	0.16	0.00	2.90
A 549	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.01	0.00
MCF 7	0.00	0.05	0.00	0.00	19.94	0.00	4.81
BT 549	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
MDA MB 231	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HPaC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
HCT 116	0.00	0.53	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00
SW 602	0.00	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Zjištěné skutečnosti byly následně ověřeny na souboru reálných vzorků tumorů. Na míru exprese jednotlivých markerů bylo vyšetřeno přes 110 vzorků primárních tumorů (23 vzorků karcinomu kolorekta (C18-20), 23 vzorků karcinomu prsu (C50), 23 vzorků nemalobuněčného karcinomu plic (C34), 20 vzorků ovariálního karcinomu (C56), 21 vzorků primárních gliálních nádorů mozku (C71) a 5 vzorků sarkomů měkkých tkání). Z vyzolované RNA byla provedena QRT-PCR dle standardních podmínek (Tab. 2). Výsledky ukazují na velmi vysokou a specifickou expresi karcinoembryonálního antigenu a cytokeratinu 20 v kolorektálních karcinomech a na vysoce specifickou expresi mamaglobinu 1 a cytokeratinu 19 v karcinomech mamárního původu. Karcinomy plic se vyznačují vysoce specifickou expresí TTF 1 a vyšší expresí cytokeratinu 19 a EGFR1, u karcinomu vaječníků je pouze nespecificky zvýšená

exprese EpCAM a EGFR1. U primárních tumorů mozku je exprese všech sledovaných markerů kromě EGFR1 velmi nízká, u sarkomů měkkých tkání je exprese všech sledovaných epiteliálních markerů nulová.



Obr. 3 Expresse jednotlivých markerů v primárních lidských tumorech



Obr. 4 Expresse jednotlivých markerů v primárních lidských tumorech

2.3.2 Identifikace nových markerů pro detekci minimální reziduální choroby

Nové markery pro rozlišení duktálního a lobulárního invazivního karcinomu prsu metodami laserové mikrodisekce a DNA microarray analýzou

Research article

Open Access

Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysisGulisa Turashvili¹, Jan Bouchal*¹, Karl Baumforth², Wenbin Wei², Marta Dziechciarkova³, Jiri Ehrmann¹, Jiri Klein⁴, Eduard Fridman⁵, Jozef Skarda¹, Josef Srovnal³, Marian Hajduch³, Paul Murray² and Zdenek Kolar¹

Address: ¹Laboratory of Molecular Pathology, Institute of Pathology, Palacky University, Olomouc, Czech Republic, ²Cancer Research U.K. Institute of Cancer Studies, University of Birmingham, UK, ³Laboratory of Experimental Medicine, Department of Pediatrics, Palacky University, Olomouc, Czech Republic, ⁴Department of Surgery, Palacky University, Olomouc, Czech Republic and ⁵Department of Pathology, Tel Aviv University, Chaim Sheba Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv, Israel

Email: Gulisa Turashvili - guliat@gmail.com; Jan Bouchal* - jan.bouchal@gmail.com; Karl Baumforth - k.r.baumforth@bham.ac.uk; Wenbin Wei - w.wei@bham.ac.uk; Marta Dziechciarkova - mdziechciarkova@seznam.cz; Jiri Ehrmann - jiri.ehrmann@tiscali.cz; Jiri Klein - kleinj@fnol.cz; Eduard Fridman - ef@sheba.health.gov.il; Jozef Skarda - jojso@email.cz; Josef Srovnal - josef.srovnal@seznam.cz; Marian Hajduch - hajduchm@atlas.cz; Paul Murray - p.g.murray@bham.ac.uk; Zdenek Kolar - kolarz@tunw.upol.cz

* Corresponding author

Published: 27 March 2007

Received: 27 November 2006

BMC Cancer 2007, 7:55 doi:10.1186/1471-2407-7-55

Accepted: 27 March 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/55>

© 2007 Turashvili et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.**Abstract**

Background: Invasive ductal and lobular carcinomas (IDC and ILC) are the most common histological types of breast cancer. Clinical follow-up data and metastatic patterns suggest that the development and progression of these tumors are different. The aim of our study was to identify gene expression profiles of IDC and ILC in relation to normal breast epithelial cells.

Methods: We examined 30 samples (normal ductal and lobular cells from 10 patients, IDC cells from 5 patients, ILC cells from 5 patients) microdissected from cryosections of ten mastectomy specimens from postmenopausal patients. Fifty nanograms of total RNA were amplified and labeled by PCR and *in vitro* transcription. Samples were analysed upon Affymetrix U133 Plus 2.0 Arrays. The expression of seven differentially expressed genes (*CDH1*, *EMPI*, *DDR1*, *DVLI*, *KRT5*, *KRT6*, *KRT17*) was verified by immunohistochemistry on tissue microarrays. Expression of *ASPN* mRNA was validated by *in situ* hybridization on frozen sections, and *CTHRC1*, *ASPN* and *COL3A1* were tested by PCR.

Results: Using GCOS pairwise comparison algorithm and rank products we have identified 84 named genes common to ILC versus normal cell types, 74 named genes common to IDC versus normal cell types, 78 named genes differentially expressed between normal ductal and lobular cells, and 28 named genes between IDC and ILC. Genes distinguishing between IDC and ILC are involved in epithelial-mesenchymal transition, TGF-beta and Wnt signaling. These changes were present in both tumor types but appeared to be more prominent in ILC. Immunohistochemistry for several novel markers (*EMPI*, *DVLI*, *DDR1*) distinguished large sets of IDC from ILC.

Conclusion: IDC and ILC can be differentiated both at the gene and protein levels. In this study we report two candidate genes, asporin (*ASPN*) and collagen triple helix repeat containing 1 (*CTHRC1*) which might be significant in breast carcinogenesis. Besides E-cadherin, the proteins validated on tissue microarrays (*EMPI*, *DVLI*, *DDR1*) may represent novel immunohistochemical markers helpful in distinguishing between IDC and ILC. Further studies with larger sets of patients are needed to verify the gene expression profiles of various histological types of breast cancer in order to determine molecular subclassifications, prognosis and the optimum treatment strategies.

Background

Invasive ductal (IDC) and lobular carcinomas (ILC) are the most common histological types of breast cancer [1,2]. The terminology of ductal and lobular carcinomas is considered to be controversial as on purely anatomical grounds there is no justification for this nomenclature. Both carcinomas are derived from the terminal duct lobular unit (TDLU), and the differences in their morphology are likely to reflect the differences in mechanisms of carcinogenesis rather than the anatomical origin of the lesions. At presentation the clinical pathological parameters such as tumor site, size, grade and stage are similar for both tumor types [3], however, clinical follow-up data and the patterns of metastasis suggest that their development and progression are different [4,5]. Treatment for stage-matched tumors is similar [6], but ILCs are often resistant to neoadjuvant therapy [7]. Although patients with ILCs are older, have low grade tumor and less lymphatic invasion, they have no survival advantage compared with IDCs [8,9].

Expression profiling using microarrays is a powerful technology which enables the simultaneous study of the expression of thousands of genes and, in conjunction with laser capture microdissection, the high-throughput genetic analysis of morphologically distinct cell subpopulations within tumor tissue [10,11]. Microarray analysis has a number of applications, including tumor classification, molecular pathway modeling, functional genomics, and comparison of gene expression profiles between groups [12]. The study of gene expression in primary breast tumor tissues is complicated for two major reasons. First, breast cancer consists of many different cell types, including normal epithelial, stromal, adipose and endothelial cells. Second, tumor cells are morphologically and genetically diverse [13]. The recent development of laser capture microdissection has provided an opportunity to generate gene expression signatures from individual cell types [14-20].

Microarrays were used for analysis of breast tumor subclasses with clinical implication [21,22], for analysis of gene expression changes in single breast cancer cells from within the same tumor [14], for expression analysis of different gene families in breast cancer [23,24], and for analysis of gene expression in different cellular and tumor types [25-28]. ER status of the tumor was the most important discriminator of expression subtypes. Unsupervised hierarchical clustering segregated these tumors into two main clusters based on their basal (predominantly ER negative) and luminal (predominantly ER positive) characteristics [29]. Ductal breast cancer classes have been identified with aggressive phenotype and poor prognosis versus those with good prognosis [30-32]. Another study

reported distinct expression patterns based on BRCA1 and BRCA2 status [33].

To date, few papers have been published on gene expression profiles of normal cell populations in the mammary gland [34]. Several studies suggest differences in expression profiles of IDC and ILC. Inactivating mutations of E-cadherin gene are very frequent in ILC [35]. However, the loss of E-cadherin expression was shown to be an independent prognostic marker for recurrence, especially in node-negative breast cancer patients, irrespective of the histological type [36]. Abnormal cytoplasmic and nuclear localization of p120, a member of the E-cadherin/catenin adhesion complex, is mediated by E-cadherin loss and occurs in the early stages of ILC [37]. Non-microdissected IDC and ILC tissues have also been used to study specific gene expression profiles of lobular and ductal tumors [38,39]. We aimed to identify genes differentially expressed between normal cell types (ductal and lobular), between tumor cells and normal cells as well as between tumor types (ductal no special type and lobular). Despite examining limited number of patients, our study is the first full genome analysis of microdissected ductal and lobular tumor and normal cells which allowed us to detect normal mammary epithelium- and cancer-specific genes.

Methods

Laser capture microdissection and RNA isolation

Altogether ten surgical specimens with either invasive ductal carcinoma NST (no special type) (n = 5) or invasive lobular carcinoma (n = 5) were investigated. This research protocol was approved by the ethics committee at Palacky University. Tumor and normal tissues from the same mammary gland were identified by an experienced pathologist, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. For microdissection, frozen tissues were embedded in TissueTek medium and cut on standard cryostat (Leica CM1850, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Frozen sections (7 µm) were immediately fixed in acetone, stained by hematoxylin and dehydrated in alcohol and xylene. All solutions were prepared using diethyl pyrocarbonate-treated water. RNase free instruments and RnaseZap (Sigma, St Louis, MO, USA) were used throughout.

At least 1000 infiltrating ductal or lobular tumor cells together with normal lobular and ductal cells were microdissected from cryosections using the Veritas™ Laser Capture Microdissection System (Arcturus Bioscience, Inc., Mountain View, CA, USA) according to standard protocols. When microdissecting normal cells, no attempt has been made to exclude basal or myoepithelial cells for two reasons. First, both ducts and lobules are atrophic in menopause, and no clearly defined layers of luminal and

myoepithelial cells are preserved. Second, it is impossible to exclude contamination with or entrapment of myoepithelial cells during the microdissection procedure. Caps with captured cells were directly placed in 100 µl lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany). Total cellular RNA was isolated (RNeasy® Micro Kit, Qiagen) according to manufacturer's recommendations and subsequently quantified on a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

RNA amplification, microarray target synthesis and hybridization

Fifty nanograms of total RNA were reverse transcribed and amplified by Microarray Target Amplification Kit (Roche diagnostics, Basel, Switzerland). In brief, total RNA (50 ng) was converted into cDNA using a modified oligo (dT) primer (TAS-T7 Oligo (dT)₂₄). A unique Target Amplification Sequence (TAS) with no homology to any known sequences in public databases generated the 3' anchor on the cDNA for subsequent PCR amplification. In order to include a 5' anchor sequence on the cDNA, the TAS-(dN)₁₀ primer was used for the initiation of the second strand cDNA synthesis. After purification using the Microarray Target Purification Kit (Roche), PCR was performed using the TAS primer and Expand PCR Enzyme Mix which is optimized for long (>1 kb) and unbiased PCR products. In order to ensure that messages were not amplified to saturation, the optimal number of PCR cycles was estimated by preliminary PCR and agarose electrophoresis of PCR products from cycles 21, 24, 27, 30 and 33. The optimal number of PCR cycles was set either to 27 cycles for patients 3, 4, 8, 9, and 10 or 29 cycles for patients 1, 2, 5, 6, and 7. All three populations from each patient were amplified by the same number of PCR cycles. If higher PCR cycling was needed for any cell population, new microdissection, RNA isolation, cDNA synthesis and PCR amplification were performed until the same PCR cycling was possible. After purification with the Microarray Target Purification Kit (Roche), the PCR products were labeled with biotin-14-CTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and biotin-16-UTP (Roche) by *in vitro* transcription using Microarray RNA Target Synthesis Kit T7 (Roche). The labeled cRNA was purified using the Microarray Target Purification Kit (Roche), quantified by spectrophotometer and checked by agarose electrophoresis. The entire amplification and labeling process was monitored by GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) with exogenous positive controls which were spiked into the total RNA before cDNA synthesis. In all cases, 25 µg of each biotinylated cRNA preparation was fragmented, assessed by gel electrophoresis, and placed in hybridization cocktail containing biotinylated hybridization controls (GeneChip™ Eukaryotic Hybridization Control Kit, Affymetrix). Samples were first hybridized to Test3 Arrays for 16 hours, washed, stained

using antibody-mediated signal amplification and scanned. After passing this quality control stage, the samples were hybridized onto the large Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix).

Microarray data analysis

Scanned images of microarray chips were analysed by the GCOS (GeneChip Operating Software) from Affymetrix with the default settings except that the target signal was set to 100. Differentially expressed genes between cell types were identified using the GCOS change algorithm and Rank Products (RP) [40] following RMA (Robust Multiarray Analysis) [41]. GCOS pairwise analysis was performed to compare gene expression levels among the normal lobular, normal ductal and tumor cells within individual patients and between lobular and ductal carcinoma cells of different patients. For each comparison between two cell types, the number of increase and decrease calls of each probe set was calculated using MS Excel and probe sets with the highest number of consistent changes among all patients were identified. Probe level quantile normalization [40] and robust multiarray analysis [41] on the raw. CEL files were performed using the Affymetrix package of the Bioconductor [42]. The cut-off value of percentage of false-positives for RP analysis was set to 10%. Gene lists were uploaded to DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) [43], and functional annotation was performed. Further informations on genes were obtained from public databases, such as Gene Cards [44] and NETAFFX Analysis Center [45]. Hierarchical clustering was performed using dChip software [46]. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) [47], and are accessible through GEO Series accession number GSE5764.

Validation by immunohistochemistry

Seven differentially expressed genes were verified by immunohistochemical staining on tissue microarrays (TMA), which were constructed from 119 breast cancer cases and contained 278 cores of 2.0 mm diameter. They consisted of 80 ductal carcinomas, 29 lobular carcinomas, one tubular carcinoma, 3 medullary carcinomas, 2 tubular-lobular carcinomas, 2 mixed ductal-lobular carcinomas, one mucinous and one papillary carcinoma. The construction of the tissue microarrays was done using a tissue arrayer (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA) [48]. The paraffin sections from 22 additional breast cancer samples containing normal mammary gland structures were used for comparison.

TMA sections were stained using standard immunohistochemical methods. Monoclonal mouse antibodies against cytokeratin 17 (dilution 1:100, clone 2D4-1G9, Abnova, Taipei, Taiwan), cytokeratin 5/6 (dilution 1:100, clone

D5/16 B4, Dako, Denmark) and E-cadherin (dilution 1:50, clone NCH-38, Dako), polyclonal mouse antibodies against EMP1 (epithelial membrane antigen 1; dilution 1:100, clone 2D4-1G9, Abnova), DDR1 (discoidin domain receptor 1; dilution 1:100, Abnova) and DVL1 (human homolog of the *Drosophila* dishevelled gene; dilution 1:100, Abnova) were used. Microwave antigen retrieval was performed in citrate buffer (pH 6.0). For antigen visualization, the EnVision/HRP system and DAB+ (Dako) were used, slides were subsequently counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted in Canadian balsam. Immunohistochemical procedure was optimized by testing different antigen retrieval methods and negative controls. We regarded cells as immunoreactive when an obvious membranous or submembranous (E-cadherin, DDR1, EMP1) and cytoplasmic (cytokeratins, DVL1) staining was seen. Immunoreactivity was scored as follows: retained (++) when more than 50% of membrane/cytoplasm were strongly positive, reduced (+) when 10–50% of the membrane/cytoplasm were positive, and absent (-) when 0–10% of the membrane/cytoplasm were positive. Frequencies of positive and negative staining in tumor and normal tissues were compared by Fisher's exact test (Statistica 6.0, StatSoft, Prague, Czech Republic).

Validation by in situ hybridization

Asporin mRNA expression was verified by chromogenic *in situ* hybridization (CISH) on frozen sections. Fluorescein labeled oligonucleotide (5'AAG TTG GTG GTA AGC CTT TAG GAA CTG AGG-FAM) was designed to the junction of exons five and six of the asporin mRNA (Generi Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic). Sections were mounted on Superfrost Plus slides and stored at -80°C until further staining. Before CISH, the sections were heated at 50°C for 2 min, and then dried at room temperature for 30 min. Tissues were delipidized in chloroform at room temperature for 5 min and dried to evaporate the chloroform. Block of endogenous peroxidase activity was followed by incubation of tissue sections in 10% paraformaldehyde for 7 min, then washed in PBS for 3 min and in 2× SSC (1× SSC contains 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate; pH 7.2) twice for 5 min. The sections were covered with 100 µl hybridization buffer (60% formamide, 5× SSC) containing 150 ng/ml of probe and incubated in moist chamber at 37°C for 22 hours. After the hybridization, unbound probe was washed from the sections at 37°C by 2× SSC for 5 min, then three times with 60% formamide in 0.2× SSC at 37°C for 5 min, and twice with 2× SSC at room temperature for 5 min. Then polyclonal rabbit anti-FITC/HRP (dilution 1:40, Dako) was applied at room temperature for 45 min, followed by washing in 2× SSC twice for 10 min. For visualization, DAB+ (Dako) was used, slides were subsequently counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted in Canadian balsam.

Validation by PCR

Products after PCR amplification (see RNA amplification, microarray target synthesis and hybridization) were used for verification of *CTHRC1*, *ASPN* and *COL3A1* gene expression using gene specific PCR. The primers were as follows: *CTHRC1* forward 5'ACA AGT GCC AAC CCA GAT AGC AAC, reverse 5'ATC GCA CTT CTT CTG TGG AAG GAC (20 cycles of 95°C, 59°C and 72°C 1 min each, product length 79 bp, kindly provided by Dr. Danuta Radzioch, McGill University, Montreal, Canada), *ASPN* forward 5'GTT CAG CTT GGG AAC TTT GGA ATG TAA, reverse 5'ACT GCA ATA GAT GCT TGT TTC TCT CAA CCC (20 cycles of 95°C, 58.5°C and 72°C 1 min each, product length 243 bp [modified from [49]], and *COL3A1* forward 5'TTG TCA ACC AGT GCA AGT GAC CGA C, reverse 5'TGG TGA GCA CAG TCA TTG CTC TGC A (20 cycles of 95°C, 59°C and 72°C 1 min each, product length 276 bp) [50]. PCR products were separated on 10% polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide and captured using a gel documentation system (DIANA II with cooled CCD camera, Raytest, Germany). Band intensities, expressed as "OD (optical density) × cm", were assessed by Multi-Analyst densitometric software (Bio-Rad, USA). The results were correlated with fluorescence signals from the relevant Affymetrix probe sets by Spearman coefficient using Statistica 6.0 software (StatSoft, Czech Republic).

Results

Unsupervised clustering

The clinical and histopathological characteristics including lymph node status, tumor grade, expression of estrogen/progesterone receptors (ER/PgR), c-erbB-2/HER2/neu and accompanying lesions of ten breast cancer patients are shown in Table 1. We microdissected normal and tumor cells from these cases which resulted in a total of 30 samples for gene expression profiling (10 normal ductal, 10 normal lobular, 5 tumor ductal and 5 tumor lobular). Unsupervised clustering of all samples was performed using all probe sets without filtering. No tumor types were grouped together but two large clusters were evident: one mainly consisted of tumor cells and the other cluster mainly of normal cells. This clearly suggests differences in global gene expression profiles of tumor and normal cells (Figure 1).

Genes differentially expressed between normal ductal and lobular cells

In this comparison 367 probe sets were identified by pairwise comparison, and 501 probe sets by Rank Products (RP). There were 82 probe sets (78 named genes) identified by both methods. In pairwise comparisons, the differentially expressed genes were found by selecting those with count of changes more than 6 (out of 10, either increase or decrease). Multiple cytokeratins (5, 7, 14, 15, 17) were expressed in both cells, but none of them was

Table 1: Clinical and histopathological characteristics of breast cancer patients involved in microarray analysis

No	Diagnosis	Grade ¹	AC	LN	ER ²	PgR ³	HER-2	Bcl-2	E-CD
1	IDC	G3	IDH	N ₁	0	0	0	80%	>90%
2	IDC	G2	none	N ₁	40%	0	0	80%	>90%
3	IDC	G2	none	N ₀	10%	2%	0	70%	>90%
4	IDC	G3	none	N ₀	90%	50%	2+ ²	100%	>90%
5	IDC	G2	DCIS	N ₀	90%	1%	0	95%	>90%
6	ILC	G2	LCIS	N ₀	0	0	0	30%	0
7	ILC	G1	none	N ₀	80%	80%	0	100%	0
8	ILC	G1	none	N ₁	50%	0	0	80%	0
9	ILC	G2	LCIS	N ₁	0	0	0	<5%	0
10	ILC	G1	none	N ₀	50%	70%	0	80%	0

¹Tumors were graded using the Nottingham combined histologic grading system.

²No gene amplification was detected by fluorescent *in situ* hybridization.

³A complete H-score was calculated by summing the products of the percentage cells stained at a given staining intensity (0–100) and the staining intensity (0–3).

AC, accompanying changes; DCIS, ductal carcinoma *in situ*; E-CD, E-cadherin; ER, estrogen receptor; IDC, invasive ductal carcinoma, IDH, intraductal hyperplasia; ILC, invasive lobular carcinoma; LCIS, lobular carcinoma *in situ*; LN, lymph node; PgR, progesterone receptor.

useful to separate two cell types. Genes encoding proteins involved in proteolysis and metabolism (*USP25*, *TMPRSS3*, *ACACB*), protein biosynthesis and modification (*PDE4DIP*, *LOXL1*), ion transport (*CLCN3*, *GABRP*) and protein kinase cascade (*MAP4K5*) as well as genes regulating transcription (*RFXAP*, *HSZFP36*) were upregulated in ductal cells. However, genes regulating cell growth, activation and motility (*TSPAN5*), genes encoding actin-binding proteins (*EHBP1*), small leucine-rich proteoglycan (*DCN*), and proteins with GTPase activity (*RHOBTB3*, *ARHGEF9*) were overexpressed in lobular cells (Table 2). Hierarchical clustering of normal cell types based on the 82 probe sets found by both RP and pairwise comparison showed that gene expression profiles of normal ductal and lobular cells from the same patients were similar, and they could not be well separated from each other (Figure 2).

Genes differentially expressed between tumor cell types and normal cells

A comparison of ductal carcinoma cells with normal ductal cells identified 1055 probe sets by pairwise analysis, 604 probe sets by RP and 326 probe sets by both methods. A comparison of ductal carcinoma cells with normal lobular cells identified 792 probe sets by pairwise analysis, 347 probe sets by RP and 171 probe sets by both methods. A comparison of lobular carcinoma cells with normal ductal cells identified 1022 probe sets by pairwise analysis, 350 probe sets by RP and 201 probe sets by both methods. A comparison of lobular carcinoma cells with normal lobular cells identified 983 probe sets by pairwise analysis, 344 probe sets by RP and 208 probe sets by both methods (see Additional file 1). In pairwise comparisons, the differentially expressed genes were identified by selecting those with count of changes more than 4 (out of 5, either increase or decrease).

Comparison between lobular carcinoma and normal cells

Combined pairwise analysis and RP have identified 106 differentially expressed probe sets (84 named genes) common to lobular carcinoma versus normal ductal and lobular cells. Of these probe sets, several genes encoding proteins involved in extracellular matrix (ECM)-tumor interaction and focal adhesion (*COL6A3*, *COL8A1*, *CTHRC1*, *THBS2*, *COMP*) were upregulated, whereas *ITGA2* gene with the same function was downregulated in tumor cells. *ASP* (asporin) was one of the upregulated genes with the highest fold change. It encodes a protein with porin activity which belongs to a family of leucine-rich repeat (LRR) proteins associated with the cartilage matrix.

Of the differentially expressed genes involved in Wnt signaling, *SFRP2* (secreted frizzled-related protein 2) and *WISP1* (WNT1 inducible signaling pathway protein 1) were upregulated in lobular carcinomas. Several genes encoding proteins involved in actin, calcium and metal ion binding were downregulated (*MYBPC1*, *DST*, *PIP*, *CA2*), and some genes with the same function (*BGN*, *ADAM12*) were upregulated in lobular carcinomas. *CDH1* (E-cadherin) was downregulated in lobular tumors accompanied by downregulation of *ITGA2* (integrin, alpha 2) which it is a ligand of. Several other genes were differentially expressed between lobular carcinomas and normal cells. *LYZ/LILRB1* was upregulated in lobular cancer cells. Other downregulated genes were as follows: *CGNL1* is a cellular myosin that appears to play a role in cytokinesis, cell shape, and specialized functions such as secretion and capping; *EHF* encodes a protein that belongs to an ETS transcription factor subfamily characterized by epithelial-specific expression (ESEs). This protein may be involved in epithelial differentiation and carcinogenesis; *CLIC6* encodes a member of the chloride

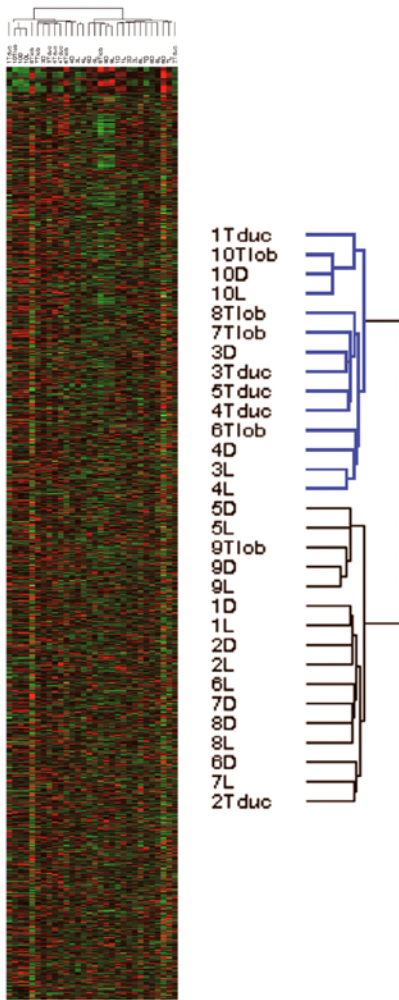


Figure 1
Unsupervised hierarchical clustering of all samples using all probe sets. No tumor types are grouped together, however, two large clusters are evident: one (blue) mainly consists of tumor cells and the other (black) mainly consists of normal cells. This suggests differences in global gene expression profiles of tumor and normal cells. 1–10, case numbers; D, ductal normal cells; L, lobular normal cells; Tduc, ductal tumor; Tlob, lobular tumor.

intracellular channel family of proteins and is involved in ion transport (Table 3).

Comparison between ductal carcinoma and normal cells

Combined pairwise analysis and RP have identified 90 differentially expressed probe sets (74 named genes) common to ductal carcinoma versus normal ductal and lobular cells. In particular, transcription regulators (ATF3, PIGR), genes encoding proteins with cytokine and growth factor activity (PTN, CX3CL1) and genes encoding proteins involved in ion transport and metabolism (ATP1A2, MMP7) were downregulated in ductal carcinomas when compared with normal cells (Table 3).

Comparison between both types of tumor cells and normal cells

Of 90 probe sets differentially expressed between ductal carcinoma and both normal cells, and 106 probe sets differentially expressed between lobular carcinoma and both normal cells, only 25 probe sets were common (Table 3). Hierarchical clustering based on those 25 probe sets showed that tumor samples were grouped together, however, gene expression profiles of normal cell types from cases 10 and 3 were different from other normal cells, and tumor cells from case 2 were different from other tumor cells (Figure 3).

Several upregulated genes (collagen type I, III, V, XI, fibronectin 1, versican) were related to tumor-ECM interactions and focal adhesion. However, another gene mediating focal adhesion, MYLK, was downregulated in tumor cells. This gene encodes a myosin light polypeptide kinase containing 1 fibronectin type-III domain. Genes encoding proteins involved in ion and electron transport (CYB5R2, GABRP), and genes encoding proteins with transcription factor and regulator activity (ELF5, ID4) were downregulated in both populations of tumor cells. They have also been implicated as regulators of cell proliferation, differentiation, and transformation. In addition, genes involved in cell differentiation and apoptosis (PDZK1) and genes encoding actin and actin-binding proteins (CNN1, ACTA2) were also downregulated in both types of tumor cells. Wnt signaling molecules were differentially expressed in our samples. Of these, SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1) was downregulated in tumor cells, and genes involved in calcium regulation pathway were not significantly changed. Structural constituents of cytoskeleton such as type I (14, 15, 17, 23) and type II (5) keratins were downregulated in tumor cells. Several other genes were also differentially expressed between tumor and normal cells. PI15 (peptidase inhibitor 15) was downregulated, whereas LRRCL15 (leucine rich repeat containing 15) was upregulated in both tumor cells.

Table 2: Genes differentially expressed between normal lobular versus normal ductal cells by both rank products and pairwise analysis

Probe Set ¹	Gene Symbol	Gene Title	Rank products	Pairwise comparison
			Fold-change	Incr/Decr
Regulation of transcription				
229431_at	RFXAP↓	Regulatory factor X-associated protein	-3.1	1/6
229732_at	HSZF36↓	ZFP-36 for a zinc finger protein	-3.0	0/6
207117_at	H-pk↑	Krüppel-related zinc finger protein	2.4	6/1
Protein biosynthesis and modification				
214130_s_at	PDE4DIP↓	Phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	-3.2	1/6
232752_at	—(LOXL1) ↓	CDNA FLJ10302 fis. clone NT2RM2000042 (lysyl oxidase-like 1)	-1.4	1/6
Proteolysis and metabolism				
49452_at	ACACB↓	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	-1.8	0/8
220419_s_at	USP25↓	Ubiquitin specific peptidase 25	-2.9	1/6
220177_s_at	TMPR53↓	Transmembrane protease, serine 3	-2.8	1/6
Ion transport				
201735_s_at	CLCN3↓	Chloride channel 3	-2.8	2/6
205044_at	GABRP↓	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	-1.8	1/6
Actin binding				
212650_at	EHBP1↑	EH domain binding protein 1	2.6	6/0
GTPase activity				
202975_s_at	RHOBTB3↑	Rho-related BTB domain containing 3	2.5	7/1
203264_s_at	ARHGEF9↑	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	2.6	6/0
Regulation of cell development, activation, growth and motility				
209890_at	TSPAN5↑	Tetraspanin 5	2.6	7/0
Small leucine-rich proteoglycan (slrp) family				
211896_s_at	DCN↑	Decorin	2.0	7/1
Protein kinase cascade				
211081_s_at	MAP4K5↓	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	-2.3	1/7
Other				
206157_at	PTX3↓	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	-2.8	2/7
218431_at	C14orf133↓	Chromosome 14 open reading frame 133	-2.7	0/7
218514_at	FLJ10587↓	Hypothetical protein FLJ10587	-2.6	1/7
226760_at	LOC203411↑	Hypothetical protein LOC203411	3.0	6/2

↑ – upregulated in normal lobular cells; ↓ – downregulated in normal lobular cells

¹Affymetrix probe set number; If there was more than one probe set for the particular gene found among top 20 changed genes (according to the fold change), the probe set with the highest fold change is used and number of other probe set is indicated.

Genes differentially expressed between ductal and lobular carcinomas

In this comparison 208 probe sets were identified by pairwise comparison, 122 probe sets by RP, and 32 probe sets (28 named genes) by both methods (Table 4). In pairwise comparisons, the differentially expressed genes were identified by selecting those with count of changes more than 19 (out of 25 inter-patient comparison, every ductal carcinoma against every lobular carcinoma, either increase or decrease). These tumors were well separated by hierarchical clustering based on all 325 probe sets identified by RP and/or pairwise analysis (Figure 4). The expression of genes encoding proteins involved in cell adhesion was changed. Although *CDH1* (E-cadherin), a classical member of the cadherin superfamily, was downregulated, *THBS4* encoding calcium-binding adhesive glycoprotein, thrombospondin-4, was upregulated in all lobular carcinomas. *DDR1* encoding receptor tyrosine kinase was overexpressed in ductal carcinomas.

The *DVLI* gene encoding protein involved in Wnt signaling and the leucine-rich repeat protein *ASPN* (asporin) were upregulated in lobular carcinomas. Ductal carcinoma

showed upregulated genes which are involved in cell proliferation, signaling and cell cycle regulation, including *RHOU*, member of the Rho family of GTPases stimulating quiescent cells to reenter the cell cycle; *PCSK6* encoding a calcium-dependent serine endoprotease; *PRKCI* encoding calcium-independent and phospholipid-dependent protein kinase C; *PPP3CB* encoding protein phosphatase 3; and *CKS2* encoding a component of the CDC28 protein kinase. Epithelial membrane protein 1 (*EMPI1*) was the only upregulated gene involved in cell growth and proliferation in lobular carcinomas. These changes were accompanied by the differential expression of transcription regulators. Majority of genes with this function were upregulated in ductal carcinomas such as *AHCTF1*, *IRAK1*, *NRI1*, *ADNP*. Overexpressed genes in lobular carcinomas were the tumor suppressor *FOXPI* and another transcription regulator *MIDI1*.

The genes encoding proteins involved in ubiquitin-mediated proteolysis, such as *USP3*, *RKHD2* and *TTC3*, and nuclear components, such as *DTL*, *GLCC11*, *TTC14*, *FAM54A*, *HIST1H3B*, were upregulated in ductal carcinomas. Majority of genes encoding proteins with enzyme

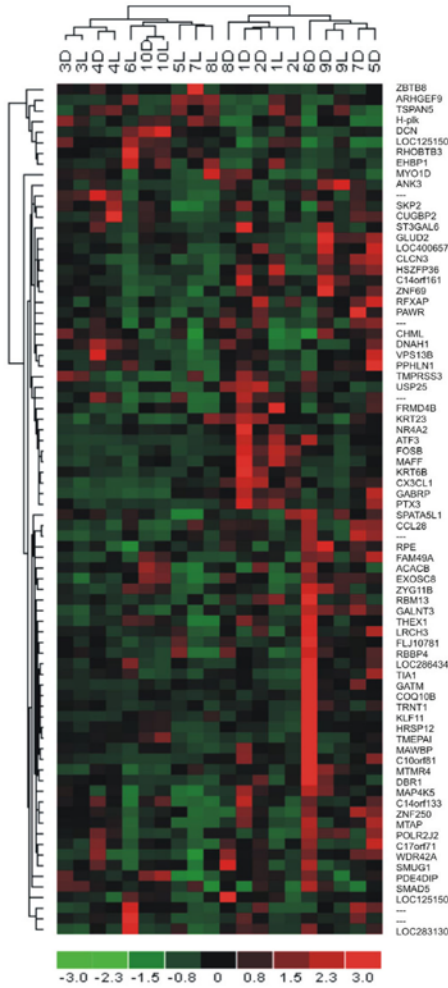


Figure 2
Hierarchical clustering of normal ductal and lobular cells based on 82 probe sets found by both rank products and pairwise analysis. Ductal and lobular cells from the same patients tend to cluster together, and they can not be well separated from each other. This suggests expected similarities of expression signatures in normal epithelial (ductal and lobular) cells of mammary gland tree. I–10, case numbers; D, ductal normal cells; L, lobular normal cells.

activity or implicated in metabolism were also upregulated in ductal carcinomas (*STK4, SLC1A2, B3GALT3, OSBPL10, CRBN, CHML, YWHAB*).

Two lobular and three ductal carcinomas were estrogen receptor-negative, whereas three lobular and two ductal carcinomas were estrogen receptor-positive. Hierarchical clustering using all probe sets was performed to determine whether receptor-positive and receptor-negative tumors could be separated. The tumors of the same histological type showed similar gene expression profiles without differences in relation to ER status as well as to other clinical parameters such as nodal status, stage and the expression of other immunohistochemical markers (data not shown).

Validation by immunohistochemistry on tissue microarrays

Seven differentially expressed genes (*KRT5, KRT6 and KRT17* between tumor and normal cells, *CDH1, EMP1, DDR1* and *DVL1* between lobular and ductal carcinomas) were verified by immunohistochemical detection of proteins on TMA slides comprising of cores from 119 cases. The clinical and histopathological characteristics of these patients are shown in Table 5. The reduced expression or absence of cytokeratins 5/6 and 17 (*KRT5, KRT6, KRT17*) was found in both tumor tissues in comparison to terminal duct lobular units in 22 normal mammary tissues ($p < 0.0001$) (Table 6 and Figure 5). In a majority of ducts and lobules including TDLU, these cytokeratins were expressed in both basal and luminal cells, verifying the previously described variability of the expression of basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin [51]. Cytokeratin 5 and 17 have also been found in a subset of breast cancer and identified patients with poor clinical outcome [31].

E-cadherin (*CDH1*) has successfully separated ductal and lobular invasive carcinomas. It was absent in 93.3% of lobular tumors compared with only 15% of ductal tumors ($p < 0.0001$). Epithelial membrane protein 1 (*EMP1*), discoidin domain receptor 1 (*DDR1*) and human homolog of the *Drosophila* dishevelled gene (*DVL1*) were found by pairwise comparison analysis to be differentially expressed between lobular and ductal carcinomas. Immunohistochemistry confirmed higher expression of *DVL1* and *EMP1* in lobular carcinomas and of *DDR1* in ductal carcinomas ($p < 0.0001$) (Table 7 and Figure 5). Of the special type carcinomas included on TMA slides, a papillary and two medullary carcinomas were positive for basal cytokeratins, one out of three medullary carcinomas was positive for *EMP1* and E-cadherin, a ductal-lobular carcinoma was positive for *DDR1*, all other special type carcinomas were negative for these markers, and finally none were positive for *DVL1* (data not shown).

Table 3: Genes differentially expressed between tumor versus normal cells by both rank products and pairwise analysis

Probe Set ¹	Gene Symbol	Gene Title	Fold-change			
			Tduc		Tlob	
Lobular carcinoma vs normal cells (↑ – upregulated in Tlob, ↓ – downregulated in Tlob)			L	D	L	D
Extracellular matrix-receptor interaction and focal adhesion (epithelial-mesenchymal transition)						
227314_at	ITGA2↓	Integrin, alpha 2	n	n	-4.7	-6.2
201438_at	COL6A3↑	Collagen, type VI, alpha 3	n	n	4.5	7.7
203083_at	THBS2↑	Thrombospondin 2	n	n	6.5	6.5
205713_s_at	COMP↑	Cartilage oligomeric matrix protein	n	n	6.7	8.1
226237_at	COL8A1↑	Collagen, type VIII, alpha 1	n	n	8.4	5.9
225681_at	CTHRC1↑	Collagen triple helix repeat containing 1	n	n	18.5	48.4
219087_at	ASPN↑	Asporin	n	n	23.3	22.1
WNT signalling						
223121_s_at 223122_s_at	SFRP2↑	Secreted frizzled-related protein 2	n	n	5.8 3.9	7.4 7.1
229802_at	WISP1↑	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	n	n	9.1	12.4
Actin, calcium and metal ion binding						
204455_at	DST↓	Dystonin	n	n	-22.2	-18.3
214087_s_at	MYBPC1↓	Myosin binding protein C, slow type	n	n	-10.1	-12.2
209301_at	CA2↓	Carbonic anhydrase II	n	n	-9.2	-8.7
206509_at	PIP↓	Prolactin-induced protein	n	n	-7.0	-6.3
201131_s_at	CDH1↓	Cadherin 1, type 1, E-cadherin	n	n	-6.2	-7.2
226777_at	ADAM12↑	ADAM metalloproteinase domain 12	n	n	5.7	5.3
213905_x_at	BGN/SDCCAG33↑	Biglycan/serologically defined colon cancer antigen 33	n	n	8.3	7.2
Other						
227742_at	CLIC6↓	Chloride intracellular channel 6	n	n	-9.3	-8.2
225817_at	CGNL1↓	Cingulin-like 1	n	n	-5.9	-7.8
219850_s_at	EHF↓	Ets homologous factor	n	n	-4.1	-6.3
213975_s_at	LYZ/ILRB1↑	Lysozyme	n	n	10.8	7.3
Ductal carcinoma vs normal cells (↑ – upregulated in Tduc, ↓ – downregulated in Tduc)						
Regulation of transcription						
202672_s_at	ATF3↓	Activating transcription factor 3	-4.5	-7.7	n	n
226147_s_at	PIGR↓	Polymeric immunoglobulin receptor	-4.8	-10	n	n
Cytokine and growth factor activity						
209466_x_at 211737_x_at	PTN↓	Pleiotrophin	-5.8 -7.1	-8.3 -12.5	n	n
823_at	CX3CL1↓	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-3.6	-8.3	n	n
Ion transport and metabolism						
203296_s_at	ATPIA2↓	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2	-8.2	-9.6	n	n
204259_at	MMP7↓	Matrix metalloproteinase 7	-4.5	-7.2	n	n

Table 3: Genes differentially expressed between tumor versus normal cells by both rank products and pairwise analysis (Continued)

212353_at	<i>SULF1</i> ↓	Sulfatase 1	4.6	4.0	n	n
Other						
1553602_at	<i>LOC118430</i> ↓	Small breast epithelial mucin	-7.1	-10.4	n	n
223623_at	<i>ECRG4</i> ↓	Esophageal cancer related gene 4 protein	-6.6	-5.6	n	n
206548_at	<i>FLJ23556</i> ↓	Hypothetical protein FLJ23556	-6.3	-11.2	n	n
218585_s_at	<i>DTL</i> ↑	Denticleless homolog (Drosophila)	3.6	4.8	n	n
Tumor vs normal cells (↑ – upregulated in tumor, ↓ – downregulated in tumor)						
Extracellular matrix-receptor interaction and focal adhesion (epithelial-mesenchymal transition)						
224823_at	<i>MYLK</i> ↓	Myosin, light polypeptide kinase	-3.5	-3.4	-5.9	-5.4
204620_s_at 221731_x_at	<i>CSPG2</i> ↑	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	3.0 3.5	4.9 5.3	4.5 4.0	5.8 6.1
221729_at	<i>COL5A2</i> ↑	Collagen, type V, alpha 2	3.5	4.4	9.3	11.3
211161_s_at	<i>COL3A1</i> ↑	Collagen, type III, alpha 1	4.1	3.3	9.8	14.9
212464_s_at	<i>FN1</i> ↑	Fibronectin 1	5.2	5.0	8.0	10.5
202311_s_at 202310_s_at	<i>COL1A1</i> ↑	Collagen, type I, alpha 1	5.6 5.1	6.0 5.1	12.7 10.4	13.0 10.8
37892_at	<i>COL11A1</i> ↑	Collagen, type XI, alpha 1	6.7	7.8	6.6	5.9
202404_s_at	<i>COL1A2</i> ↑	Collagen, type I, alpha 2	6.8	10.1	30.5	18.3
Ion and electron transport						
205044_at	<i>GABRP</i> ↓	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	-4.2	-8.7	-6.2	-8.6
220230_s_at	<i>CYB5R2</i> ↓	Cytochrome b5 reductase 2	-3.6	-3.8	-4.3	-4.2
Regulation of transcription						
220625_s_at	<i>ELF5</i> ↓	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	-4.0	-4.8	-5.9	-8.4
209292_at	<i>ID4</i> ↓	Inhibitor of DNA binding 4	-2.9	-5.1	-10.8	-4.5
Actin and actin-binding proteins						
203951_at	<i>CNN1</i> ↓	Calponin 1, basic, smooth muscle	-6.7	-6.6	-6.9	-7.3
243140_at	<i>ACTA2</i> ↓	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	-4.0	-4.1	-8.7	-4.0
WNT signaling						
202037_s_at	<i>SFRP1</i> ↓	Secreted frizzled-related protein 1	-7.1	-8.8	-8.5	-7.3
Intermediate filament proteins						
209351_at	<i>KRT14</i> ↓	Keratin 14	-22.9	-31.0	-21.9	-24.0
205157_s_at	<i>KRT17</i> ↓	Keratin 17	-17.7	-21.4	-9.9	-12.6
212730_at	<i>DMN</i> ↓	Desmuslin	-10.0	-10.4	-7.2	-7.5
201820_at	<i>KRT5</i> ↓	Keratin 5	-8.9	-12.7	-11.3	-12.1
Other						
229947_at	<i>PI15</i> ↓	Peptidase inhibitor 15	-6.5	-7.5	-18.5	-15.0
205380_at	<i>PDZK1</i> ↓	PDZ domain containing 1	-4.5	-5.8	-4.2	-6.4
213909_at	<i>LRRCS1</i> ↑	Leucine rich repeat containing 15	6.2	5.7	7.3	11.8

Tduc – ductal tumor; Tlob – lobular tumor; D – normal ductal cells; L – normal lobular cells; n – not differentially expressed among top 20 genes.
¹Affymetrix probe set number; If there was more than one probe set for the particular gene found among top 20 changed genes (according to the fold change), the probe set with the highest fold change is used and number of other probe set is indicated.

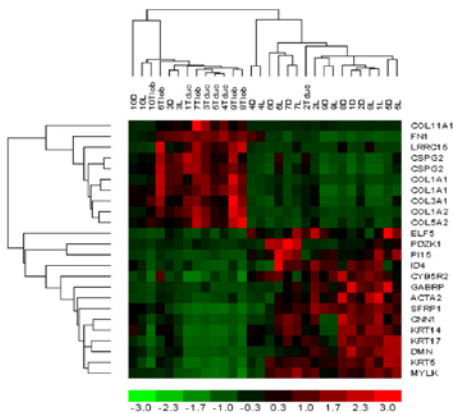


Figure 3
Hierarchical clustering of tumor and normal samples based on 25 probe sets common to ductal and lobular carcinoma versus normal cells identified by both rank products and pairwise analysis. Tumor samples are grouped together, however, gene expression profiles of normal cell types from cases 10 and 3 are different from those of other normal cells, and tumor cells from case 2 are different from those of other tumor cells. 1–10, case numbers; D, ductal normal cells; L, lobular normal cells; Tduc, ductal tumor; Tlob, lobular tumor.

Validation of asporin expression by *in situ* hybridization

Combined RP and pairwise comparison showed that *ASP*N was one of the most upregulated genes in lobular carcinomas, when compared with normal ductal (fold change 23.3) and lobular (fold change 22.1) cells as well as with ductal carcinomas (fold change 3.9). None of the available antibodies against asporin worked on paraffin sections, therefore we utilised chromogenic *in situ* hybridization to detect asporin mRNA in frozen sections. All five lobular carcinomas appeared positive, whereas five cases of ductal carcinomas were negative or weakly and focally positive which is in agreement with the microarray data (Figure 6).

Validation of *CTHRC1*, *ASP*N and *COL3A1* by PCR

Besides asporin, *CTHRC1* was also upregulated in lobular cancer cells, when compared with normal ductal cells (fold change 48.4) and lobular cells (fold change 18.5), and *COL3A1* was upregulated in both IDC and ILC cells, when compared with normal ductal cells (fold change 3.3 and 14.9, respectively) and lobular cells (fold change 4.1 and 9.8, respectively). As both RNA and cDNA were fully utilized for amplification, we used PCR amplification

products (see Methods) for validation by another PCR with specific primers. The results of semi-quantitative PCR correlated with the microarray data. Spearman coefficients were $r = 0.85$, $r = 0.73$ and $r = 0.70$ for *CTHRC1*, *ASP*N and *COL3A1*, respectively (all significant at $p < 0.0001$) (Figure 7).

Discussion

We examined 30 samples (microdissected tumor and normal ductal and lobular cells) from postmenopausal patients with lobular and ductal invasive breast carcinomas using Affymetrix arrays. Genes differentially expressed between the normal ductal and lobular cell types, which are less likely to be affected by fluctuating levels of female hormones as they were derived from postmenopausal women, are involved in ion transport and protein kinase cascade, protein biosynthesis and modification, proteolysis and metabolism, regulation of transcription and cell growth. However, hierarchical clustering of normal cell types based on the 82 probe sets identified by both RP and pairwise comparison showed that the gene expression profiles of normal ductal and lobular cells taken from the same patient are more similar to each other than ductal cells or lobular cells from different patients, and thus could not be well separated from each other. This may suggest expected similarities between expression signatures in normal epithelial (ductal and lobular) cells of the mammary gland. Since both IDC and ILC are believed to start in the terminal duct lobular unit (TDLU) of the breast [1,2], and these normal cell populations showed similar gene expression profiles, it is likely that the different morphological appearances of the two tumor types are mediated by differences in their mechanisms of carcinogenesis.

Combined pairwise comparison and RP analysis revealed that ductal and lobular carcinomas have a number of genes in common, however, they can be discriminated both at the gene and protein levels in our study. cDNA microarrays have previously been used to distinguish between IDC and ILC [38,39]. Unsupervised clustering of tumors failed to separate the two subtypes. There were 8 genes identified by MaxT permutation analysis using *t* tests, significance analysis for microarrays (SAM) and prediction analysis for microarrays (PAM) (E-cadherin, survivin, cathepsin B, TPI1, SPRY1, SCYA14, TFAP2B, and thrombospondin 4), and an additional 3 were identified by SAM and PAM (osteopontin, HLA-G, and CHC1) [38]. It has also been found that over half of ILCs differed from IDCs in global transcription programs, whereas the remaining ILCs closely resembled IDCs. Fifty two percent of the ILCs ("typical" ILCs) clustered together and displayed different gene expression profiles from the IDCs, whereas the other ILCs ("ductal-like" ILCs) were distributed between different IDC subtypes. Many of the differ-

Table 4: Genes differentially expressed in lobular versus ductal invasive carcinomas by rank products and/or pairwise analysis

Probe Set ¹	Gene Symbol	Gene Title	Rank products	Pairwise comparison
			Fold-change	Incr/Decr
Cell adhesion				
201131_s_at	CDH1↓	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	-6.0	3/19
207169_x_a	DDR1↓	Discoidin domain receptor family, member 1	n	5/19
204776_at	THBS4↑	Thrombospondin 4	n	19/2
219087_at	ASPN↑	Asporin (LRR class 1)	3.9	23/0
Wnt signalling				
223168_at	RHOU↓	RAS homolog gene family, member U	n	2/20
203230_at	DVLI↑	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	n	20/0
Protein ubiquitination				
215392_at	USP3↓	Ubiquitin specific peptidase 3	-5.0	1/21
218247_s_at	RKHD2↓	Ring finger and KH domain containing 2	-4.6	0/19
1569472_s_at	TTC3↓	Tetratricopeptide repeat domain 3	-4.5	0/23
Regulation of transcription				
226115_at	AHCTF1↓	AT hook containing transcription factor 1	-4.0	0/22
201587_s_at	IRAK1↓	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	n	2/19
202599_s_at	NRIP1↓	Nuclear receptor interacting protein 1	n	0/19
201773_at	ADNP↓	Activity-dependent neuroprotector	n	0/20
203637_s_at	MID1↑	Midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	4.0	20/0
235444_at	FOXP1↑	Forkhead box P1	n	19/4
Electron and protein transport				
204351_at	S100P↓	S100 calcium binding protein P	-5.3	0/19
225177_at	RAB11FIP1↓	RAB11 family interacting protein 1 (class 1)	-3.5	2/21
204041_at	MAOB↑	Monoamine oxidase B	3.5	20/4
212902_at	SEC24A↑	SEC24 related gene family, member A	3.5	19/2
Cell cycle regulation, cell proliferation and signaling				
204170_s_at	CKS2↓	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	-4.8	2/20
207414_s_at	PCSK6↓	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	n	4/19
209678_s_at	PRKCI↓	Protein kinase C, iota	n	0/22
209817_at	PPP3CB↓	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform (calcineurin A beta)	n	0/24
201324_at	EMPI↑	Epithelial membrane protein 1	n	21/0
Metabolism and enzyme activity				
205509_at	CPB1↓	Carboxypeptidase B1 (tissue)	-11.1	0/19
223746_at	STK4↓	Serine/threonine kinase 4	-4.5	2/20
225491_at	SLC1A2↓	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	-4.1	0/20
211379_x_at	B3GALT3↓	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3	-4.0	0/20
219073_s_at	OSBP10↓	Oxysterol binding protein-like 10	-4.0	1/21
229366_at	CRBN↓	Cereblon	-3.6	0/20
226350_at	CHML↓	Choroideremia-like (Rab escort protein 2)	n	0/24
217717_s_at	YWHAB↓	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-mono-oxygenase activation protein, beta polypeptide	n	1/20
49452_at	ACACB↑	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	n	19/0
220770_s_at	LOC63920↑	Transposon-derived Buster3 transposase-like	5.3	24/0
Actin and cytoskeletal protein binding				
211776_s_at	EPB41L3↓	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	-5.3	0/21
201341_at	ENCL↓	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	n	19/3
Nuclear components				
218585_s_at	DTL↓	Denticleless homolog (Drosophila)	-4.6	1/19
225706_at	GLCCI1↓	Glucocorticoid induced transcript 1	-4.5	0/25
241863_x_at	TTC14↓	Tetratricopeptide repeat domain 14	-4.4	1/20
228069_at	FAM54A↓	Family with sequence similarity 54, member A	-3.8	0/20
208576_s_at	HIST1H3B↓	Histone 1, H3b	-3.3	1/19
Other				
1568838_at	---	Full-length cDNA clone CS0DF033YE17 of Fetal brain of Homo sapiens (human)	-5.0	1/20
226067_at	C20orf114↓	Chromosome 20 open reading frame 114	-4.9	0/19
1553979_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:3906992, mRNA	-4.1	0/19
230534_at	MGC15634↓	Hypothetical protein MGC15634	-3.6	2/20
226671_at	---	CDNA clone IMAGE:4797120	-3.8	2/20
219768_at	VTCN1↑	V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	7.8	21/2
214657_s_at	TncRNA↑	Trophoblast-derived noncoding RNA	4.5	21/0
213004_at	ANGPTL2↑	Angiopoietin-like 2	n	19/4

↑ – upregulated in lobular carcinoma; ↓ – downregulated in lobular carcinoma; n – gene not found by rank products at the level of 10% of false positives, Incr/decr – increase or decrease in lobular versus ductal carcinoma by pairwise comparison.

¹All 32 probe sets identified by combined pairwise comparison and rank products are included, also a number of genes found by pairwise comparison were validated by immunohistochemistry (DVLI, DDR1, EMPI), therefore, functional categories also include named genes identified by pairwise analysis.

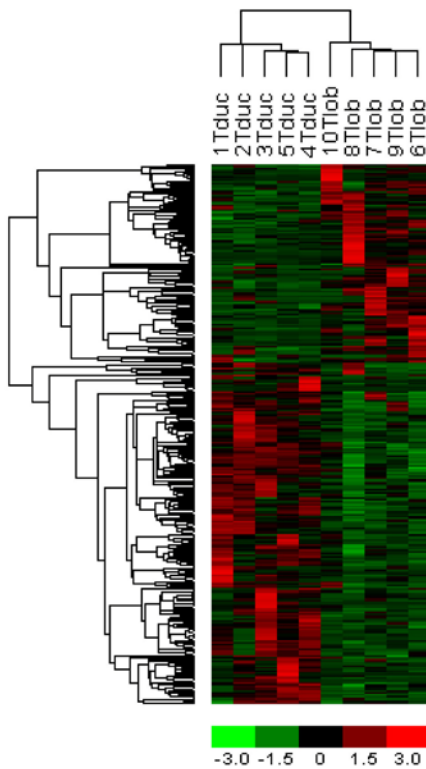


Figure 4
Hierarchical clustering of invasive ductal and lobular breast carcinomas based on 325 probe sets identified by rank products and/or pairwise analysis. Tumor types are well separated. 1–10, case numbers; Tduc, ductal tumor; Tlob, lobular tumor.

entially expressed genes encode for proteins involved in cell adhesion/motility, lipid/fatty acid transport and metabolism, immune/defense response, and electron transport. Many genes distinguishing between typical and ductal-like ILCs are involved in regulation of cell growth and immune response [39]. However, these two previous studies examined whole tumor tissues without microdissection, suggesting that expression of a number of genes could be related not only to tumor cells but also to other components of mammary tissue such as stromal, adipose, endothelial etc. Our study is the first full genome analysis

of microdissected ductal and lobular tumor and normal cells reporting both normal mammary epithelium- and cancer-specific genes expression profiles.

Importantly, *CDH1* (E-cadherin gene) was downregulated in our lobular carcinomas, and immunohistochemistry confirmed this loss at the protein level within tumors. E-cadherin is considered to be the most important cell adhesion molecule in the mammary gland. It acts as a tumor suppressor inhibiting invasion and metastasis. Mutations of this gene are correlated with gastric, breast, colorectal, thyroid and ovarian cancer. During tumor progression, E-cadherin can be functionally inactivated or silenced by different mechanisms such as post-translational control, somatic mutations, downregulation of gene expression through promoter hypermethylation, histone deacetylation, and transcriptional repression [52,53]. The latter induces cellular responses leading to the conversion of epithelial cells into invasive mesenchymal-like cells with increased motility and invasiveness, and this process is called an epithelial-mesenchymal transition (EMT) [52]. To date, it is believed that lost, non-polar or cytoplasmic expression of E-cadherin protein and/or transcriptional repression of its mRNA are hallmarks of EMT in cancer progression [53-55]. It has also been shown that several proteins such as fibronectin and integrin $\alpha\beta 6$ [54], Ets, TGF β , FGF-1,-2,-8, α -SMA, collagen type I, III and thrombospondins increase in abundance during EMT [56], conversely, amongst proteins that decrease in abundance are E-cadherin and cytokeratins [54]. According to our results, collagen type I and III, fibronectin and Ets domain transcription factor are upregulated and cytokeratins are downregulated in both tumor cell types. The expression of collagens and other mesenchyme-associated genes in microdissected breast cancer cells was also confirmed by Nishitate and co-workers [57]. In addition, pairwise comparisons revealed that thrombospondin 4 was upregulated only in lobular cancer cells, which agrees with the literature [38]. Thus we propose that the EMT plays a role in both tumor types but appears to be more important in lobular carcinomas. The EMT phenomenon seems to be promising because multiple molecules involved in EMT, such as receptor- and SRC-family tyrosine kinases, RAS and other small GTPases, can be envisioned as targets for anti-EMT therapy [58].

The tissue microenvironment, including the ECM-cell and cell-cell interactions, plays an important role in both normal mammary gland development and cancer. Neoplastic transformation of cells dramatically alters the synthesis of proteoglycans and other ECM proteins both in tumor and the surrounding matrix [59]. This can stimulate the growth and spread of tumor cells by decreasing the adhesive functions of the ECM [60]. Both tumor types examined show upregulated genes involved in tumor-ECM

Table 5: Clinical and histopathological characteristics of TMA cases

Features	IDC	ILC
G1	6 (7.5%)	15 (51.7%)
G2	57 (71.3%)	11 (37.9%)
G3	17 (21.2%)	3 (10.3%)
ER+	57 (71.3%)	19 (65.5%)
PgR+	50 (62.5%)	17 (58.6%)
HER-2+	12 (15%)	1 (3.4%)
Bcl-2+	13 (16.3%)	4 (13.8%)
N ₀	56 (70%)	21 (72.4%)
N ₁	16 (20%)	6 (20.7%)
N ₂	8 (10%)	2 (6.9%)
Total number of cases	80	29

ER, estrogen receptor; G1-3, grade 1-3; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; N₀₋₁, lymph node status; PgR, progesterone receptor; TMA, tissue microarray.

interactions, cell adhesion and migration processes including metastasis. Expression of majority of the proteins encoded by these genes is related to TGF β or Wnt signaling, and both the TGF β and Wnt pathways may affect ECM.

Asporin is a cartilage extracellular protein that has been reported to be associated with knee and hip osteoarthritis. This leucine-rich repeat protein was shown to interact with and inhibit TGF β signaling which is thought to lead to insufficient quantities of aggrecan and type II collagen in osteoarthritis [61,62]. Asporin was more upregulated in our lobular carcinomas when compared with ductal tumors as well as with normal cell types. Overexpression of asporin mRNA in lobular carcinomas was then confirmed by chromogenic *in situ* hybridization and PCR. In support of our findings, upregulation of this gene has also been described in microdissected androgen-independent prostate cancer cells using Affymetrix Human Genome U133A GeneChips [63]. The authors did not discuss it and importantly, asporin has not been related to carcinogenesis to date.

We have found another candidate gene, collagen triple helix repeat containing 1 (*CTHRC1*), which was upregulated in ILC in comparison with normal cells, and its expression was also validated by PCR. Aberrant expression of *CTHRC1* has recently been reported in human solid tumors, including cancers of the gastrointestinal tract,

lung, breast, thyroid, ovarian, cervix, liver, and the pancreas. It is associated with cancer tissue invasion and metastasis and potentially plays important functional roles in cancer progression, perhaps by increasing cancer cell migration [64]. TGF β upregulates *CTHRC1*, versican, *ADAM12*, and downregulates *SFRP1* and E-cadherin [65-67]. The loss of *SFRP1* is known to be associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stages [68], and a similar expression profile is seen in our study. *SFRP1* is downregulated and versican is upregulated in both tumor types. Furthermore, pairwise comparison identified other overexpressed genes in lobular carcinoma such as *SFRP2* and *ADAM12*. E-cadherin, which is downregulated in lobular cancer cells, can also be repressed by TGF β -induced expression of transcription factor complexes [69]. TGF β signaling inhibitors have been shown to prevent EMT, to inhibit mammary tumor viability and to block metastasis in various murine models [70]. According to these results, we propose that deregulated TGF β signaling is likely to be more important in lobular carcinogenesis.

Wnt signaling molecules are also expressed in our samples in several comparisons. The Wnt proteins are small secreted glycoproteins which are involved in the self-renewal of stem cells and may be responsible for the maintenance of mature tissues [71]. On binding to Frizzled receptors, Wnts can activate canonical (β -catenin-dependent) and/or non-canonical (β -catenin-independent)

Table 6: Immunohistochemical staining of cytokeratins in tumor and normal tissues

Antibodies	Tumors	Normal tissues (n = 22)	Fisher's p value	
Cytokeratin 5/6	Ductal carcinomas (n = 80)	9 (11.2%)	22 (100%)	<0.0001
	Lobular carcinomas (n = 29)	3 (10.3%)		<0.0001
Cytokeratin 17	Ductal carcinomas (n = 80)	8 (10%)	22 (100%)	<0.0001
	Lobular carcinomas (n = 29)	2 (6.9%)		<0.0001

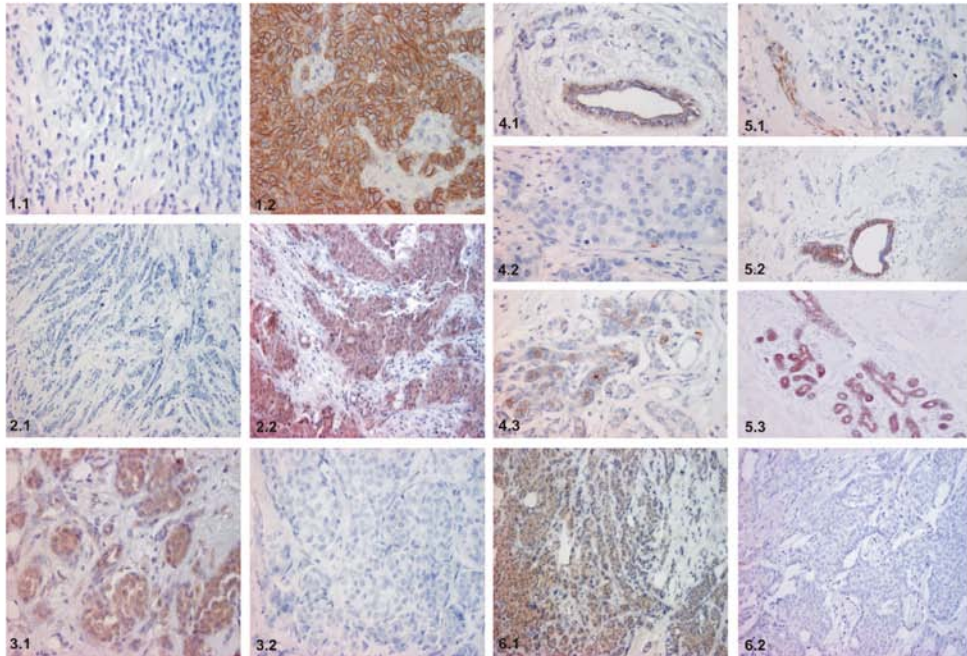


Figure 5
Representative immunohistochemical staining for the selected proteins: E-cadherin, DDR1, DVLI, cytokeratin 5/6, cytokeratin 17 and EMPI. 1.1. E-cadherin is negative in lobular carcinoma; 1.2. E-cadherin is positive in ductal carcinoma; 2.1. DDR1 is negative in lobular carcinoma; 2.2. DDR1 is positive in ductal carcinoma; 3.1. DVLI is positive in lobular carcinoma; 3.2. DVLI is negative in ductal carcinoma; 4.1. Cytokeratin 5/6 is negative in lobular carcinoma cells, but its expression is retained in normal ductal epithelial cells; 4.2. Cytokeratin 5/6 is negative in ductal carcinoma cells; 4.3. Duct lobular unit in normal mammary gland tissue is positive for cytokeratin 5/6; 5.1. Cytokeratin 17 is negative in lobular carcinoma cells, but its expression is retained in normal ductal epithelial cells; 5.2. Cytokeratin 17 is negative in ductal carcinoma cells, but its expression is retained in normal ductal epithelial cells; 5.3. Duct lobular unit in normal mammary gland tissue is positive for cytokeratin 17; 6.1. EMPI is positive in lobular carcinoma; 6.2. EMPI is negative in ductal carcinoma.

ent Wnt/planar cell polarity pathway and Wnt/Ca²⁺ pathway) Wnt signaling [72,73]. Downregulation of frizzled related proteins has been described in breast cancer [68]. Of these, *SFRP1* is downregulated in both types of our tumor cells, and genes involved in calcium regulation

pathway are not significantly changed. The promoter of fibronectin 1 contains LEF/TCF-binding sites, making it a direct target of canonical Wnt signaling [59,74]. Fibronectin 1 is also upregulated in both tumor types. However, there is a difference in Wnt signaling between ILC and

Table 7: Immunohistochemistry differentiates ductal and lobular carcinomas

Antibodies	Ductal carcinomas (n = 80)	Lobular carcinomas (n = 29)	Fisher's p value
E-cadherin	68 (85%)	2 (6.7%)	<0.0001
DVLI	20 (25%)	28 (96.5%)	<0.0001
EMPI	13 (16.3%)	27 (93.1%)	<0.0001
DDR1	77 (96.2%)	4 (13.8%)	<0.0001

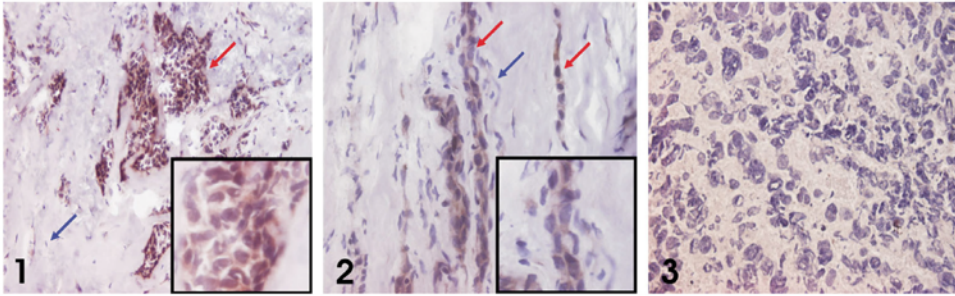


Figure 6

Asporin mRNA detection by chromogenic *in situ* hybridization. 1–2. Various magnifications ($\times 100$, $\times 400$, $\times 400$) of lobular carcinoma; red arrows, lobular tumor cells are positive; blue arrows, stromal cells are negative; 3. Ductal carcinoma is negative ($\times 200$).

IDC. *SULF1* (sulfatase 1) is upregulated and *MMP7* is downregulated only in IDCs. *MMP7* is a confirmed Wnt target [75] and it has been shown to be activated in both canonical [76,77] and non-canonical Wnt signaling [78]. Binding Wnt ligands to frizzled receptors is regulated by the 6-O sulfation-desulfation of cell surface heparan sulfates (HSs) by sulfatase 1. Sulfated HSs bind to Wnt ligand with high affinity and inhibit Wnt signaling. Sulfatase 1 removes 0–6 sulfates from HSs and reduces their binding to Wnt ligands which in turn allows the formation of functional Wnt-Frizzled complexes and thus promotes Wnt signaling [79,80]. Frizzled-related proteins also have heparin-binding domains that promote the formation of Wnt-Frizzled complexes [81]. Although *SULF1* is upregulated, *SFRP1* and *MMP7* are downregulated in ductal cancer cells, whereas *SFRP2* and other Wnt molecules, such as *DVL1* and *WISP1*, are upregulated in lobular cancer cells. This suggests that Wnt signaling is activated in ILC cells but not in IDC cells. Since mRNA level of β -catenin was not changed between normal and tumor cells, the expression of Wnt molecules appears to be β -catenin-independent, favoring the non-canonical Wnt signaling in ILC. There is evidence that Wnts acting through the non-canonical pathway can promote tumor progression [82,83] which may also be true in ILC.

In addition to Wnt molecules such as *DVL1*, pairwise comparison revealed that *EMP1*, gene encoding a tumor-associated membrane protein involved in cell-cell interactions and proliferation control [84], was upregulated, whereas *DDR1*, epithelial-specific receptor kinase capable of binding Wnt5 and regulating the adhesion of mammary cells [85,86], was downregulated in ILCs. Immunohistochemistry has also confirmed the same differential expression of these three proteins in IDC and ILC on tis-

sue microarrays. Thus all the evidence suggests that the two tumor types can be distinguished both at the gene and protein levels. Specific changes in gene and protein expression are likely to reflect the differences in mechanisms of carcinogenesis as well as the specific histological and clinical characteristics of these tumors derived from the same anatomical compartment, TDLU.

Conclusion

Microdissection of normal and tumor cell types from the breast and full genome expression analysis by Affymetrix arrays allowed us to provide novel data on breast cancer. Invasive lobular and ductal breast carcinomas can be differentiated both at the gene and protein levels. Despite analyzing only thirty samples from ten patients, the results are in good accordance with previous literature [14,38,39,57,64]. Our data provide evidence for deregulated TGF β and Wnt signaling accompanied by the over-expression of mesenchyme-associated genes like the collagens, asporin and others which might be occurring in conjunction with an altered EMT. We propose that deregulated TGF β signaling and EMT phenomenon are involved in both tumor types, but they seem to be more important in lobular carcinomas which is in concordance with the loss of E-cadherin expression and their distinct morphology from ductal tumors. In this study we report two candidate genes, asporin (*ASPN*) and collagen triple helix repeat containing 1 (*CTHRC1*), which might be significant in mammary gland carcinogenesis and may also be important either in cancer diagnosis or therapy. Besides E-cadherin, the proteins validated on tissue microarrays by immunohistochemistry (*EMP1*, *DVL1*, *DDR1*) may represent novel tissue markers helpful in the differentiation of ductal and lobular cancers. Further studies with larger sets of patients are needed to verify the gene

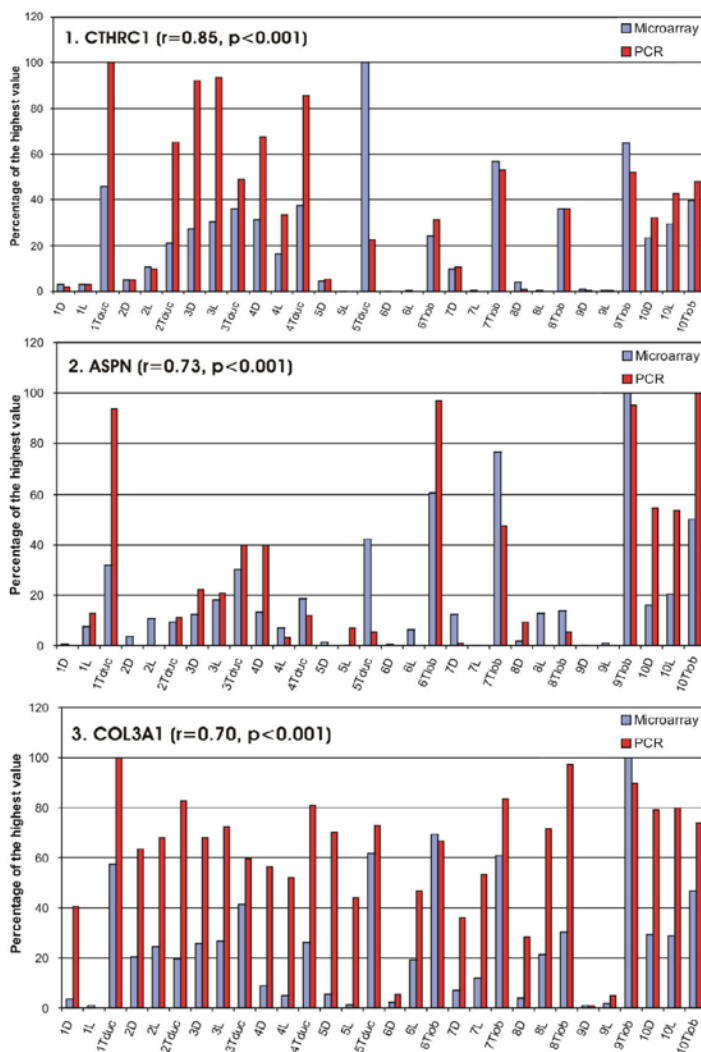


Figure 7
PCR validation of microarray results for CTHRC1 (1), ASPN (2), and COL3A1 (3). Fluorescence signals from Affymetrix probe sets (225681_at, 219087_at and 211161_s_at, respectively) and optical density of PCR bands (OD × cm) were transformed to a percentage of the highest value. 1–10, case numbers; Tduc, ductal tumor; Tlob, lobular tumor; D, normal ductal cells; L, normal lobular cells.

expression profiles of various histological types of breast cancer in order to determine molecular subclassifications, prognosis, and the optimum treatment strategies.

Abbreviations

ADAM12 = ADAM metallopeptidase domain 12; ASPN = Asporin; CK = Cytokeratin; CTHRC1 = Collagen triple helix repeat containing 1; DAVID = Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; DDR1 = Discoidin domain receptor 1; DVL1 = Human homolog of the *Drosophila* dishevelled gene; ECM = Extracellular matrix; EMP1 = Epithelial membrane antigen 1; EMT = Epithelial-mesenchymal transition; ER = Estrogen receptor; GCOS = GeneChip Operating Software; IDC = Invasive ductal carcinoma; ILC = Invasive lobular carcinoma; ISH = *In situ* hybridization; IVT = *In vitro* transcription; PCR = Polymerase chain reaction; PgR = Progesterone receptor; RMA = Robust multiarray analysis; RNA = Ribonucleic acid; RP = Rank products analysis; SFRP1 = Secreted frizzled-related protein 1; TDLU = Terminal duct lobular unit; TGF β = Transforming growth factor β ; TMA = Tissue microarray; WISP1 = WNT1 inducible signaling pathway protein 1.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GT and JB contributed equally to this work. GT participated in collecting surgical specimens, cutting and evaluation of frozen sections, laser microdissection, immunohistochemistry, ISH, analysis of microarray results and drafting the manuscript. JB participated in the design of the study, collecting surgical specimens, RNA isolation, amplification and labeling, analysis of microarray results, ISH and PCR validation, drafting the manuscript. KB carried out the hybridization and scanning of the arrays and proofreading of the manuscript. WW performed data analysis and participated in drafting the manuscript. MD and MH were involved in laser microdissection. JE participated in collection and evaluation of frozen sections. JK participated in obtaining surgical specimens. EF and JS participated in tissue microarray construction. JS was involved in RNA isolation and PCR validation. PM participated in analysis of microarray results. ZK conceived of the study, participated in its design and coordination, as well as in collecting surgical specimens, evaluation of frozen sections and drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional File 1

Supplementary tables. The data provided represent supplementary tables listing all differentially expressed probe sets found by both rank products and pairwise analysis between normal ductal and normal lobular cells, ductal carcinoma and normal ductal cells, ductal carcinoma and normal lobular cells, ductal carcinoma and lobular carcinoma cells, lobular carcinoma and normal ductal cells, and lobular carcinoma and normal lobular cells.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2407-7-55-S1.doc>]

Acknowledgements

The work was supported by grants NR 7844-3 and NR 8425-3 from the Czech Ministry of Health and MSM 6198959216 from the Czech Ministry of Education. The authors cordially thank to Jirina Zatloukalova, Jirina Prochazkova, Prof. George Burkadze, Dalimil Zurek, Veronika Krejci, Pravomila Abrahamova, Alena Lukasova, Renata Bilkova and Gabriela Korinkova for scientific discussions and kind technical assistance.

References

- Rosen PP: *Rosen's breast pathology* Lippincott-Raven Publishers; 1997.
- Weidner N, Cote R, Suster S, Weiss L: *Modern Surgical Pathology* Elsevier Science; 2003.
- Winchester DJ, Chang HR, Graves TA, Menck HR, Bland KI, Winchester DP: **A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes.** *J Am Coll Surg* 1998, **186**:416-422.
- Silverstein MJ, Lewinsky BS, Waisman JR, Gierson ED, Colburn WJ, Senofsky GM, Gamagami P: **Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma?** *Cancer* 1994, **73**:1673-1677.
- Toikkanen S, Pylkkanen L, Joensuu H: **Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma.** *Br J Cancer* 1997, **76**:1234-40.
- Molland JG, Donnellan M, Janu NC, Carmalt HL, Kennedy CW, Gillett DJ: **Infiltrating lobular carcinoma – a comparison of diagnosis, management and outcome with infiltrating duct carcinoma.** *Breast* 2004, **13**:389-396.
- Newman LA, Buzdar AU, Singletary SE, Kuerer HM, Buchholz T, Ames FC, Ross MI, Hunt KK: **A prospective trial of preoperative chemotherapy in resectable breast cancer: predictors of breast-conservation therapy feasibility.** *Ann Surg Oncol* 2002, **9**:228-234.
- Mersin H, Yildirim E, Gulben K, Berberoglu U: **Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma?** *Eur J Surg Oncol* 2003, **29**:390-395.
- Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM: **Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome.** *Breast Cancer Res* 2004, **6**:R149-156.
- Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D: **Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:9212-9217.
- Schena M, Shalon D, Davis RV, Brown PO: **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science* 1995, **270**:467-470.
- Bertucci F, Viens P, Hingamp P, Nasser V, Houlgatte R, Birnbaum D: **Breast cancer revisited using DNA array-based gene expression profiling.** *Int J Cancer* 2003, **103**:565-571.
- Tavassoli FA, Scnitt SJ: *Pathology of the breast* New York: Elsevier; 1992.
- Zhu G, Reynolds L, Crnogorac-Jurcovic T, Gillett CE, Dublin EA, Marshall JF, Barnes D, D'Arrigo C, Van Trappen PO, Lemoine NR, Hart

- IR: **Combination of microdissection and microarray analysis to identify gene expression changes between differentially located tumor cells in breast cancer.** *Oncogene* 2003, **22**:3742-3748.
15. Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, Fehm T, Solomayer E, Riess O, Wallwiener D, Kurek R, Neubauer HJ: **Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis.** *Cancer Res* 2006, **66**:5278-5286.
 16. Yang F, Foekens JA, Yu J, Sieuwerts AM, Timmermans M, Klijn JG, Atkins D, Wang Y, Jiang Y: **Laser microdissection and microarray analysis of breast tumors reveal ER-alpha related genes and pathways.** *Oncogene* 2006, **25**:1413-1419.
 17. Aoyagi K, Tatsuta T, Nishigaki M, Akimoto S, Tanabe C, Omoto Y, Hayashi S, Sakamoto H, Sakamoto M, Yoshida T, Terada M, Sasaki H: **A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **300**:915-920.
 18. Luzzi V, Mahadevappa M, Raja R, Warrington JA, Watson MA: **Accurate and reproducible gene expression profiles from laser capture microdissection, transcript amplification, and high density oligonucleotide microarray analysis.** *J Mol Diagn* 2003, **5**:9-14.
 19. Klur S, Toy K, Williams MP, Certa U: **Evaluation of procedures for amplification of small-size samples for hybridization on microarrays.** *Genomics* 2004, **83**:508-517.
 20. Ji W, Zhou W, Gregg K, Lindpaintner K, Davis S, Davis S: **A method for gene expression analysis by oligonucleotide arrays from minute biological materials.** *Anal Biochem* 2004, **331**:329-339.
 21. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:8418-8423.
 22. Bertucci F, Houlgatte R, Granjeaud S, Nasser V, Loriod B, Beaudouin E, Hingamp P, Jacquemier J, Viens P, Birnbaum D, Nguyen C: **Prognosis of breast cancer and gene expression profiling using DNA arrays.** *Ann N Y Acad Sci* 2002, **975**:217-231.
 23. Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC: **Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR.** *Breast Cancer Res Treat* 2002, **74**:255-269.
 24. Mackay A, Jones C, Dexter T, Silva RL, Bulmer K, Jones A, Simpson P, Harris RA, Jat PS, Neville AM, Reis LF, Lakhani SR, O'Hare MJ: **cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells.** *Oncogene* 2003, **22**:2680-2688.
 25. Barsky SH: **Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype.** *Exp Mol Pathol* 2003, **74**:113-122.
 26. Pusztai L, Sotiriou C, Buchholz TA, Meric F, Symmans WF, Esteva FJ, Sahin A, Liu ET, Hortobagyi GN: **Molecular profiles of invasive mucinous and ductal carcinomas of the breast: a molecular case study.** *Cancer Genet Cytogenet* 2003, **141**:148-153.
 27. Dressman MA, Baras A, Malinowski R, Alvis LB, Kwon I, Walz TM, Polymeropoulos MH: **Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer.** *Cancer Res* 2003, **63**:2194-2199.
 28. Nyante SJ, Devries S, Chen YY, Hwang ES: **Array-based comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ and synchronous invasive lobular cancer.** *Hum Pathol* 2004, **35**:759-763.
 29. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET: **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:10393-10398.
 30. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Borresen-Dale AL: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:10869-10874.
 31. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, Torhorst J, Sauter G, Zuber G, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Seitz R, Ross D, Botstein D, Brown P: **Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome.** *Am J Pathol* 2002, **161**:1991-1996.
 32. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernards R, Friend SH: **Expression profiling predicts outcome in breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2003, **5**:57-58.
 33. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J, Raffeld M, Yakhini Z, Ben-Dor A, Dougherty E, Kononen J, Bubendorf L, Fehrlie W, Pittaluga S, Gruberger S, Loman N, Johannsson O, Olsson H, Sauter G: **Gene-expression profiles in hereditary breast cancer.** *N Engl J Med* 2001, **344**:539-548.
 34. Grigoriadis A, Mackay A, Reis-Filho JS, Steele D, Iseli C, Stevenson BJ, Jongeneel CV, Valgeirsson H, Fenwick K, Iravani M, Leao M, Simpson AJ, Strausberg RL, Jat PS, Ashworth A, Neville AM, O'Hare MJ: **Establishment of the epithelial-specific transcriptome of normal and malignant human breast cells based on MPSS and array expression data.** *Breast Cancer Res* 2006, **8**:R56.
 35. Huiping C, Sigurgeirsdottir JR, Jonasson JG, Eiriksdottir G, Johannsdottir JT, Egilsson V, Ingvarsson S: **Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer.** *Br J Cancer* 1999, **81**:1103-1110.
 36. Asgeirsson KS, Jonasson JG, Tryggvadottir L, Olafsdottir K, Sigurgeirsdottir JR, Ingvarsson S, Ogmundsdottir HM: **Altered expression of E-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance.** *Eur J Cancer* 2000, **36**:1098-1106.
 37. Sarrio D, Perez-Mies B, Hurdiss D, Moreno-Bueno G, Suarez A, Cano A, Martin-Perez J, Gamallo C, Palacios J: **Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions.** *Oncogene* 2004, **23**:3272-3283.
 38. Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep AL, Chen YY, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM, Waldman FM: **Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis.** *Cancer Res* 2003, **63**:7167-7175.
 39. Zhao H, Langerod A, Ji Y, Nowels KW, Nesland JM, Tibshirani R, Bukholm IK, Karesen R, Steinfeld D, Borresen-Dale AL, Jeffrey SS: **Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast.** *Mol Biol Cell* 2004, **15**:2523-2536.
 40. Breiting R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P: **Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments.** *FEBS Lett* 2004, **573**:83-92.
 41. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP: **Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:e15.
 42. **Affymetrix package of the Bioconductor** [<http://www.bioconductor.org>]
 43. **DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery** [<http://david.abcc.ncifcrf.gov>]
 44. **Gene Cards** [<http://www.genecards.org>]
 45. **NETAFFX Analysis Center** [<http://www.affymetrix.com/analysis>]
 46. **dChip software: Gene Expression Microarray and SNP Microarray Analysis** [<http://www.dchip.org>]
 47. **NCBI's Gene Expression Omnibus** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>]
 48. Simon R, Sauter G: **Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors.** *Exp Hematol* 2002, **30**:1365-1372.
 49. Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrugge B, Hook M, Mayne R: **Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family.** *J Biol Chem* 2001, **276**:12212-12221.
 50. Nakamura S, Terashima T, Yoshida T, Iseki S, Takano Y, Ishikawa I, Shinomura T: **Identification of genes preferentially expressed in periodontal ligament: specific expression of a novel secreted protein, FDC-SP.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **338**:1197-1203.
 51. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T: **Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**:143-8.
 52. Peinado H, Portillo F, Cano A: **Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis.** *Int J Dev Biol* 2004, **48**:365-375.

53. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschichl PN, Larue L: **The protein kinase Akt induces epithelial-mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines.** *Cancer Res* 2003, **63**:2172-2178.
54. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**:740-746.
55. Thiery JP: **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:442-454.
56. Kalluri R, Neilson EG: **Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.** *J Clin Invest* 2003, **112**:1776-1784.
57. Nishidate T, Katagiri T, Lin ML, Mano Y, Miki Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tsunoda T, Hirata K, Nakamura Y: **Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis.** *Int J Oncol* 2004, **25**:797-819.
58. Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, Yang H, Nicosia SV: **The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery.** *Oncogene* 2005, **24**:7482-7492.
59. Schambony A, Kunz M, Gradl D: **Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion.** *Differentiation* 2004, **72**:307-318.
60. Esko JD, Rostand KS, Weinkle JL: **Tumor formation dependent on proteoglycan biosynthesis.** *Science* 1988, **241**:1092-1096.
61. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, Uchida A, Nakamura K, Notoya K, Nakamura Y, Ikegawa S: **An aspartic acid repeat polymorphism in aspirin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis.** *Nat Genet* 2005, **37**:138-144.
62. Loughlin J: **Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting.** *Curr Opin Rheumatol* 2005, **17**:629-633.
63. Best CJ, Gillespie JW, Yi Y, Chandramouli GV, Perlmutter MA, Gathright Y, Erickson HS, Georgewich L, Tangrea MA, Duray PH, Gonzalez S, Velasco A, Linehan WM, Matusik RJ, Price DK, Figg WD, Emmert-Buck MR, Chuaqui RF: **Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:6823-6834.
64. Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y: **Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:3716-3722.
65. Pyagay P, Herault M, Wang Q, Lehner W, Belden J, Liaw L, Friesel RE, Lindner V: **Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration.** *Circ Res* 2005, **96**:261-268.
66. Zhao X, Ramsey KE, Stephan DA, Russell P: **Gene and protein expression changes in human trabecular meshwork cells treated with transforming growth factor-beta.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, **45**:4023-4034.
67. Durmus T, Leclair RJ, Park KS, Terzic A, Yoon JK, Lindner V: **Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 (Cthrc1).** *Gene Expr Patterns* 2006, **6**:935-940.
68. Klopocki E, Kristiansen G, Wild PJ, Klamann I, Castanos-Velez E, Singer G, Sohr R, Simon R, Sauter G, Leibiger H, Essers L, Weber B, Hermann K, Rosenthal A, Hartmann A, Dahl E: **Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors.** *Int J Oncol* 2004, **25**:641-649.
69. Eger A, Stockinger A, Park J, Langkopf E, Mikula M, Gotzmann J, Mikulits W, Beug H, Foisner R: **beta-Catenin and TGFbeta signalling cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FesER-induced epithelial to mesenchymal transition.** *Oncogene* 2004, **23**:2672-2680.
70. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T: **NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression.** *J Clin Invest* 2004, **114**:569-581.
71. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R: **Wnt proteins are lipidmodified and can act as stem cell growth factors.** *Nature* 2003, **423**:448-452.
72. Papkoff J, Rubinfeld B, Schryver B, Polakis P: **Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:2128-2134.
73. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT: **A second canon: functions and mechanisms of beta-catenin-independent wnt signaling.** *Dev Cell* 2003, **5**:367-377.
74. Gradl D, Kuhl M, Wedlich D: **The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:5576-5587.
75. Marchenko GN, Marchenko ND, Leng J, Strongin AY: **Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin.** *Biochem J* 2002, **363**:253-262.
76. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T: **Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer.** *Am J Pathol* 1999, **155**:1033-1038.
77. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM: **The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors.** *Oncogene* 1999, **18**:2883-2891.
78. Rivat C, Le Floch N, Sabbah M, Teyrol I, Redeuilh G, Bruyneel E, Mareel M, Matrisian LM, Crawford HC, Gespach C, Attoub S: **Synergistic cooperation between the AP-1 and LEF-1 transcription factors in activation of the matrilysin promoter by the src oncogene: implications in cellular invasion.** *FASEB J* 2003, **17**:1721-1723.
79. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M: **Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization.** *Mol Cell* 2000, **6**:743-750.
80. Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP Jr: **QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling.** *J Cell Biol* 2003, **162**:341-351.
81. Chong JM, Uren A, Rubin JS, Speicher DW: **Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules.** *J Biol Chem* 2002, **277**:5134-5144.
82. Weeraratna AT, Jiang YA, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bitner M, Trent JM: **Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma.** *Cancer Cell* 2002, **1**:279-288.
83. Jonsson M, Dejmek J, Bendahl PO, Andersson T: **Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas.** *Cancer Res* 2002, **62**:409-416.
84. Chen Y, Medvedev A, Ruzanov P, Marvin KV, Jetten AM: **cDNA cloning, genomic structure, and chromosome mapping of the human epithelial membrane protein CL-20 gene (EMPI), a member of the PMP22 family.** *Genomics* 1997, **41**:40-48.
85. Dejmek J, Dib K, Jonsson M, Andersson T: **Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion.** *Int J Cancer* 2003, **103**:344-351.
86. Jonsson M, Andersson T: **Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation and modifies adhesion and migration of mammary cells.** *J Cell Sci* 2001, **114**:2043-2053.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/55/prepub>

2.3.3 Použití markerů minimální reziduální choroby k diferencální diagnostice metastáz neznámého původu

Míšní metastáza adenokarcinomu – kazuistika

Míšní metastáza adenokarcinomu – kazuistika

Spinal Cord Metastasis of Adenocarcinoma – Case Report

Souhrn

Metastázy adenokarcinomu do míchy jsou vzácné a tvoří jen 1–3 % všech nádorů míchy. Autoři prezentují případ 74letého muže s náhle vzniklou kvadruparézou a následně diagnostikovaným tumorem krční míchy. Míšní expanze byla radikálně chirurgicky odstraněna a histologicky byla prokázána metastáza adenokarcinomu, pravděpodobně z colon sigmoideum. Časná diagnostika míšních metastáz pomocí magnetické rezonance a mikrochirurgická technika resekce mohou částečně zlepšit prognózu a neurologický deficit pacientů. V dostupné literatuře je prezentováno celkem 71 případů chirurgické léčby, ta je doporučena ve vybraných případech, a to zvláště u pacientů s potenciálně radiorezistentní metastázou. Cílem chirurgické léčby je dekomprese funkční nervové tkáně a histologické ověření původu nádoru. Doba přežití po operaci je přibližně dvojnásobná ve srovnání s neoperační terapií.

Abstract

Metastasis of adenocarcinoma to the spinal cord is a rare condition that accounts for 1–3 % of spinal tumours. The authors present the case of a 74-year-old man who suddenly developed quadriplegia and was subsequently diagnosed as a tumour of the cervical spinal cord. The spinal tumour was removed surgically and a metastasis of an adenocarcinoma was shown histologically, probably from the sigmoid colon. Early diagnosis of spinal metastases by means of magnetic resonance and microsurgical resection can improve prognosis and neurological deficit of patients to some extent. The available literature presents a total of 71 cases of surgery, which is recommended in selected cases, in particular for patients with a potentially radio-resistant metastasis. The aim of surgery is the decompression of functional nerve tissue and histological verification of the origin of the tumour. Survival time after such an operation is approximately twice that when therapy does not involve surgery.

L. Hrabálek¹, O. Kalita¹,
J. Ehrmann², J. Srovnal²,
M. Hajdúch³

¹ Neurochirurgická klinika LF UP
a FN Olomouc

² Katedra patologie, Centrum
molekulární biologie a medicíny
LF UP a FN Olomouc

³ Laboratoř experimentální medicíny,
Dětská klinika LF UP a FN
Olomouc



MUDr. Lumír Hrabálek, Ph.D.
Neurochirurgická klinika
LF UP a FN

I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc

e-mail: lumir.hrabalek@seznam.cz

Přijato k recenzi: 16. 6. 2008

Přijato do tisku: 27. 8. 2008

Klíčová slova

míšní metastázy – adenokarcinom –
mícha – operace

Key words

spinal cord metastasis – adenocarci-
noma – spinal cord – operation

Poděkování: Molekulární vyšetření nádoru bylo umožněno díky grantové podpoře Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (LC07017, MSM 6198959216) a Ministerstva průmyslu (MPO 1H-PK/45) České republiky.

Úvod

Metastázy adenokarcinomu do míchy jsou vzácné. Projeví se klinicky jen u 0,1 až 0,4 % pacientů s adenokarcinomem, tvoří jen 1–3 % všech nádorů míchy a asi 8,5 % metastáz celého centrálního nervového systému (CNS) [1–3]. Časná diagnostika míšních metastáz pomocí magnetické rezonance a mikrochirurgická technika resekce mohou částečně zlepšit prognózu a zmenšit neurologický deficit pacientů [3,4]. Cílem chirurgické resekce metastázy je dekomprese funkční tkáně míchy a histologické ověření nádoru. Autoři prezentují kazuiistiku pacienta s operovanou krční míšní metastázou adenokarcinomu a s využitím dostupné literatury diskutují přínos operace pro pacienta. Běžně se pro označení míšních metastáz používá zkratka ISCM (Intramedullary Spinal Cord Metastasis).

Kazuistika

Muž ve věku 74 let, nekuřák, bez historie nádorového maligního onemocnění, udával krev ve stolici a váhový úbytek za posledních několik měsíců. Byl proto chystán ke kolonoskopickému vyšetření. Mezitím ale došlo náhle k rozvoji spastické kvadruparézy s prevalencí na pravostranných končetinách, především na pravé horní končetině s postižením svalů ramenního pletence a projevující se neschopností elevace končetiny v rameni. Obě dolní končetiny udržel v Mingazzinim, nebyl schopen chůze a byl popsán jednorázový únik stolice. Následně bylo provedeno akutní vyšetření magnetickou rezonancí (MRI) krční páteře s nálezem intramedulární expanze ve výši C4 s navazující syringomyelickou dutinou zasahující v kranialním směru po medulla oblongata a v kaudálním směru po Th 4. Expanze byla v T2 a STIR sekvencích hyposignální a po aplikaci kontrastní látky se sytla nepravidelná periferní část formace. Velikost tumoru byla 24 × 12 mm se zřetelným ohraničením oproti zbytku míchy (obr. 1, 2). Pacient byl od začátku léčen kortikoidy (metylprednisolon) a neurologický stav se stabilizoval do té míry, že nedošlo k rozvoji plegie. Po dvou dnech od začátku příznaků bylo indikováno operační od-



Obr. 1. MRI krční páteře v sagitální rovině, v T1 módu s kontrastem, před operací, na úrovni C4 intramedulární metastáza velikosti 24 × 12 mm, sytící se postkontrastně.



Obr. 2. MRI krční páteře v sagitální rovině, ve STIR módu, před operací, na úrovni C4 intramedulární metastáza se syringomyelickou dutinou kranialně a kaudálně probíhající.



Obr. 3. MRI krční páteře v sagitální rovině, v T1 módu s kontrastem, dva dny po operaci, bez známek tumoru.

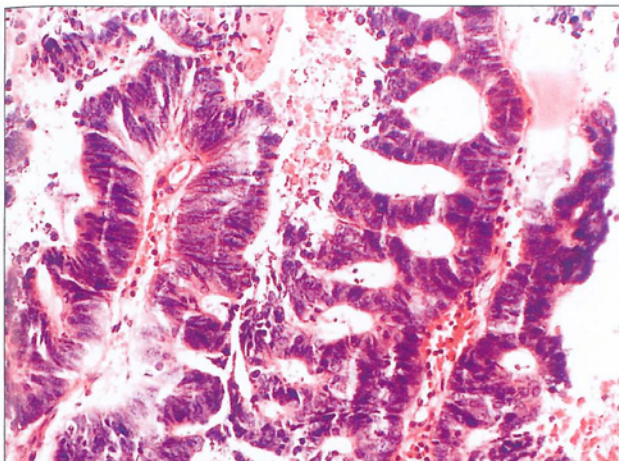


Obr. 4. MRI krční páteře v sagitální rovině, ve STIR módu, dva dny po operaci, bez známek tumoru, se syringomyelickou dutinou.

stranění míšní expanze. Z levostranné hemilaminektomie C4, parciální hemilaminektomie C3 a C5 a ze středočárové myelotomie autoři kompletně odstranili zčásti prokrváčený, jinak hnědoběžový, křehký a relativně ohraničený míšní tumor. Druhý den po operaci kontrolní MRI s kontrastem potvrdila radikální odstranění a dekompresi míchy (obr. 3, 4). Operační rána se zhojila bez komplikací a neurologický stav pacienta se mírně upravil, zejména se zvětšil rozsah elevace pravé horní končetiny. Hybnost dolních končetin zůstala zachována beze změny a pacient byl nadále upoután na lůžko.

Během hospitalizace byla provedena celotělová PET/CT (pozitronová emisní

tomografie/počítačová tomografie), která prokázala mnohočetná ložiska v plicích ve všech plicních polích, v paketu lymfatických uzlin paraesofageálně vpravo a v zesílené stěně colon sigmoideum v síle do 23 mm. Nález v sigmatu byl hodnocen jako pravděpodobný primární tumor a nálezy v lymfatických uzlinách a plicích jako metastázy. Následná kolonoskopie byla technicky obtížná pro nedostatečné vyprázdnění pacienta a tumor colon sigmoideum nemohla potvrdit. Vzhledem ke kachektizaci pacienta nebyla onkologem indikována žádná následná onkologická léčba ani další vyšetření. Pacient byl léčen pouze symptomaticky v zařízení následné péče



Obr. 5. Histologické vyšetření metastázy adenokarcinomu do míchy. Barvení hematoxylin-eosin, zvětšeno 200krát.

a zemřel 11 týdnů po operaci, pitva provedena nebyla.

Výsledky tumor markerů

CEA: 4,54 (hodnota zvýšená u nekuřáků). PSA: 0,75, PSA-volný: 0,19, fPSA/PSA poměr 25,30, CA 19–9: pod 2,5, AFP 2,13 (normální hodnoty).

Výsledek histologického a imunohistochemického vyšetření (obr. 5)

Adenokarcinom metastatický, vzhledem k negativitě CK7, CK20, TTF1 nelze blíže specifikovat orgánovou primaritú.

Výsledek cytogenetických a molekulárně genetických vyšetření

Ke všem vyšetřením byly využity nádorové buňky z parafinového preparátu. Vzhledem ke špatné kvalitě RNA z parafinového bloku nebyla analýza expresního profilu na úrovni mRNA na identifikaci nádorů neznámého primárního původu úspěšná. Z těchto důvodů, s ohledem na nekuřáctví pacienta a plicní ložiska, jsme se pokusili potvrdit/vyloučit plicní původ adenokarcinomu s použitím specifických znaků, aktivačních mutací EGFR1 genu

a nepřítomnosti mutace genu KRAS, které se v části nekuřáků s plicní rakovinou vyskytují. Metodou polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) byly testovány aktivující mutace v exonu 19 a 21 v genu EGFR a mutace exonu 1 v genu KRAS. Ve všech případech mutace nebyla nalezena a molekulární vyšetření v tomto případě rovněž nezpřesnilo klinickou diagnózu.

Diskuze

Zatímco metastázy do mozku nachází patolog asi v 20 % nádorových autopsií u pacientů s primární malignitou mimo nervový systém, ISCM jen ve 2 % [5,6]. Klinik diagnostikuje za života pacienta pouze 5 % těchto míšních metastáz [7].

Předpokládá se, že metastázy se do míchy dostanou arteriálním řečištěm a nikoliv venózní nebo lymfatickou cestou [8]. Diskrepance mezi frekvencí metastáz v mozku a v míše může být vysvětlena tak, že mozek přijme jednu třetinu srdečního výdeje přes velké cévy a pod velkým tlakem, zatímco mícha je cévně zásobena spíše z malých a klubkovitých cév pod malým tlakem [1,9]. Navíc medulární arterie odstupují z aorty v pravém úhlu, zatímco mozkové tepny jsou

víceméně přímým pokračováním oblouku aorty, a to umožňuje snazší metastazování do mozku [10].

Nejčastějším zdrojem metastáz míchy je bronchogenní karcinom (tvorí 47 %), zejména malobuněčná forma [3,8,11]. Méně častým primárním tumorem metastazujícím do míchy je karcinom prsu, melanom, lymfom a Grawitzův tumor [8,11]. Extrémně vzácné jsou metastázy kolonorektálního adenokarcinomu, které tvoří jen 3 % [12].

Stanovení přesné diagnózy může být obtížné i tehdy, kdy je znám primární nádor, neboť nelze klinicky zcela jasně odlišit míšní metastázu od ostatních příčin myelopatie jako epidurální metastázy nebo paraneoplastické nekrotizující myelopatie [13]. Možnost míšních metastáz bychom měli spíše zvažovat u pacientů s historií maligního nádoru a současně v případech rozvoje hemiparézy nebo hemihypestezie. Právě asymetrie neurologické dysfunkce je typická pro míšní metastázu a Brown-Sequardův syndrom se vyskytuje u 30–34 % těchto pacientů [3,14,15]. Rychlá progres symptomů zase odliší metastázu od pomaleji se rozvíjejícího primárního tumoru míchy. Ve všech těchto případech je tedy namísto urgentní vyšetření míchy magnetickou rezonancí.

Někteří autoři se domnívají, že radioterapie, chemoterapie ani chirurgická resekce nepřináší pacientovi žádný prospěch [5,16]. Tyto názory jsou ale ojedinelé. V léčbě míšních metastáz mnoho autorů preferuje jen radioterapii [1,8,17,18]. Je třeba ale zdůraznit, že pozitivní efekt radioterapie můžeme očekávat jen u radiosenzitivních metastáz, tedy u malobuněčného karcinomu plic, karcinomu prsu a lymfomu. Jak jsme se již zmínili, právě tyto tři typy nádorů metastazují do míchy nejčastěji. Chemoterapie nemá efekt na délku přežití pacientů ani na zmírnění neurologického deficitu [19], ačkoli některé studie uvádějí, že kombinace chemoterapie a radioterapie prodlužuje přežití pacientů [11,20]. Vzhledem k předpokládanému primárnímu zdroji ISCM v colon sigmoideum byly u našeho pacienta provedeny i testy na možnost

použití biologické léčby. Na úrovni DNA jsme neprokázali přítomnost aktivačních mutací EGFR1 genu, často nacházejících u plicního adenokarcinomu nekouřáků, což jej zcela nevylučuje, nicméně spíše podporuje kolorektální původ nádoru. S ohledem na nepřítomnost mutací genu KRAS měl pacient vysokou pravděpodobnost terapeutického benefitu z podání EGFR1 inhibitorů. Tato biologická léčba však již nebyla aplikována s ohledem na špatný výkonnostní stav pacienta a omezenou průchodnost monoklonálních protilátek do centrálního nervového systému.

Chirurgické odstranění metastázy míchy bývá indikováno stále častěji, a to zejména u pacientů s radiorezistentním primárním tumorem a při vyloučení leptomeningeální diseminace nádoru [12,21]. V dostupné literatuře je do začátku roku 2008 prezentováno celkem 71 případů chirurgické léčby [9,12,22–40]. Totální resekce byla preferována v 68 % (48 pacientů) a subtotální v 32 % (23 pacientů).

Zlepšení neurologického stavu po operaci nastalo v 56 % (40 pacientů), beze změny zůstal neurologický stav v 35 % (25 pacientů) a zhoršil se v 9 % (6 pacientů). Doba přežití je přibližně dvojnásobná ve srovnání s neoperační terapií. U pacientů konzervativně léčených je v průměru pět měsíců a chirurgicky řešených 9,4 měsíců [17,34].

Závěr

Ve vybraných případech ISCM je doporučeno radikální chirurgické odstranění, a to zvláště u pacientů s potenciálně radiorezistentní metastázou, jak tomu může být u metastázy adenokarcinomu tlustého střeva.

Cílem chirurgické léčby ISCM je dekomprese funkční nervové tkáně a histologické ověření původu nádoru.

Literatura

- Edelson RN, Deck MD, Posner JB. Intramedullary spinal cord metastases. Clinical and radiographic findings in nine cases. *Neurology* 1972; 22(12): 1222–1231.
- Jellinger K, Kothbauer P, Sunder-Plassmann E, Weiss R. Intramedullary spinal cord metastases. *J Neurol* 1979; 220(1): 31–41.
- Schiff D, O'Neill BP. Intramedullary spinal cord metastases: clinical features and treatment outcome. *Neurology* 1996; 47(4): 906–912.
- Schijns OE, Kurt E, Wessels P, Luijckx GJ, Beuls EA. Intramedullary spinal cord metastasis as a first manifestation of a renal cell carcinoma: report of a case and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg* 2000; 102(4): 249–254.
- Costigan DA, Winkelman MD. Intramedullary spinal cord metastasis. A clinicopathological study of 13 cases. *J Neurosurg* 1985; 62(2): 227–233.
- Chason JL, Walker FB, Landers JW. Metastatic carcinoma in the central nervous system and dorsal root ganglia. *Cancer* 1963; 16: 781–787.
- Okamoto H, Shinkai T, Matsuno Y, Saijo N. Intradural parenchymal involvement in the spinal subarachnoid space associated with primary lung cancer. *Cancer* 1993; 72(9): 2583–2588.
- Grem JL, Burgess J, Trump DL. Clinical features and natural history of intramedullary spinal cord metastasis. *Cancer* 1985; 56(9): 2305–2314.
- Silva YJ, McSwain B. Intramedullary spinal cord metastasis: the sole clinical manifestation of an adenocarcinoma of the colon. *Can J Surg* 1967; 10(3): 341–344.
- Tanghetti B, Fumagalli GL, Giunta F, Marini G, Zorzi F. Intramedullary spinal cord metastases. *J Neurosurg Sci* 1983; 27(2): 117–124.
- Connolly ES Jr, Winfree CJ, McCormick PC, Cruz M, Stein BM. Intramedullary spinal cord metastasis: report of three cases and review of the literature. *Surg Neurol* 1996; 46(4): 329–338.
- Ogino M, Ueda R, Nakatsukasa M, Murase I. Successful removal of solitary intramedullary spinal cord metastasis from colon cancer. *Clin Neurol Neurosurg* 2002; 104(2): 152–156.
- Chen YJ, Chang GCh, Chen HT, Yang TY, Kuo BIT, Hsu HCh et al. Surgical results of metastatic spinal cord compression secondary to non-small cell lung cancer. *Spine* 2007; 32(15): E413–E418.
- Dunne JW, Harper CG, Pamphlett R. Intramedullary spinal cord metastases: a clinical and pathological study of nine cases. *Q J Med* 1986; 61(235): 1003–1020.
- Guidetti B, Fortuna A. Differential diagnosis of intramedullary and extramedullary tumors. In: Vinken T, Braun G (eds). *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam: Elsevier 1975: 51–75.
- Hejazi N, Hassler W. Microsurgical treatment of intramedullary spinal cord tumors. *Neuro Med Chir (Tokyo)* 1998; 38(5): 266–271.
- Lee SS, Kim MK, Sym SJ, Kim SW, Kim WK, Kim SB et al. Intramedullary spinal cord metastases: a single-institution experience. *J Neurooncol* 2007; 84(1): 85–89.
- Winkelman MD, Adelstein DJ, Karlins NL. Intramedullary spinal cord metastasis. Diagnostic and therapeutic considerations. *Arch Neurol* 1987; 44(5): 526–531.
- Holoye P, Libnoch J, Cox J, Kun L, Byhardt R, Almago U et al. Spinal cord metastasis in small cell carcinoma of the lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10(3): 349–356.
- Potti A, Abdel-Raheem M, Levitt R, Schell DA, Mehdi SA. Intramedullary spinal cord metastases (ISCM) and non-small cell lung carcinoma (NSCLC): clinical patterns, diagnosis and therapeutic considerations. *Lung Cancer* 2001; 31(2–3): 319–323.
- Mut M, Schiff D, Shaffrey ME. Metastasis to nervous system: spinal epidural and intramedullary metastases. *J Neurooncol* 2005; 75(1): 43–56.
- Amin R. Intramedullary spinal metastasis from carcinoma of the cervix. *Br J Radiol* 1999; 72(853): 89–91.
- Bizzozzero L, Ferrara M, Villa F, Fontana R, Brusamolina R, Collice M. Intramedullary spinal cord metastasis. Case report. *J Neurosurg Sci* 1994; 38(3): 193–195.
- de Almeida Holanda MM, de Andrade EM, da Silva JA. Intramedullary spinal cord metastasis from thyroid carcinoma: case report. *Arg Neuropsiquiatr* 2006; 64(2A): 338–341.
- Donovan DJ, Freeman JH. Solitary intramedullary spinal cord tumor presenting as the initial manifestation of metastatic renal cell carcinoma: case report. *Spine* 2006; 31(14): E460–E463.
- Fakih M, Schiff D, Erlich R, Logan TF. Intramedullary spinal cord metastasis (ISCM) in renal cell carcinoma: a series of six cases. *Ann Oncol* 2001; 12(8): 1173–1177.

27. Fischer G, Brotchi J. Intramedullary spinal cord tumors. Report. French Society of Neurosurgery. 45th annual congress. Neurochirurgie 1994; 40 (Suppl 1): 1–108.
28. Foster OJ, Crockard HA. Cervical syrinx associated with an intramedullary metastasis: case report. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1987; 50(5): 637–639.
29. Gasser TG, Pospiech J, Stolke D, Schwechheimer K. Spinal intramedullary metastases. Report of two cases and review of the literature. Neurosurg Rev 2001; 24(2–3): 88–92.
30. Gasser T, Sandalcioglu IE, El Hamalawi B, van de Nes JA, Stolke D, Wiedemayer H. Surgical treatment of intramedullary spinal cord metastases of systemic cancer: functional outcome and prognosis. J Neurooncol 2005; 73(2): 163–168.
31. Gazzeri R, Galarza M, Faiola A, Gazzeri G. Pure intramedullary spinal cord metastasis secondary to gastric cancer. Neurosurg Rev 2006; 29(2): 173–177.
32. Grasso G, Meli F, Patti R, Giambardino F, Florena AM, Iacopino DG. Intramedullary spinal cord tumor presenting as the initial manifestation of metastatic colon cancer: case report and review of the literature. Spinal Cord 2007; 45(12): 793–796.
33. Honma Y, Kawakita K, Nagao S. Intramedullary spinal cord and brain metastases from thyroid carcinoma detected 11 years after initial diagnosis – case report. Neurol Med Chir (Tokyo) 1996; 36(8): 593–597.
34. Kalayci M, Cağavı F, Gül S, Yenidünya S, Açıkgöz B. Intramedullary spinal cord metastases: diagnosis and treatment – an illustrated review. Acta Neurochir (Wien) 2004; 146(12): 1347–1354.
35. Li Y, Takayasu M, Takagi T, Yoshimoto M, Mitsui Y, Yoshida J. Intramedullary spinal cord metastasis associated with hemorrhage: a case report. No Shinkei Geka 2000; 28(5): 453–457.
36. Marquart C, Weckesser M, Schueller P, Hasselblatt M, Wassmann H, Schröder J. Intramedullary spinal cord metastasis as initial presentation of a systemic cancer – report of a rare case. Zentralbl Neurochir 2007; 68(4): 214–216.
37. Mercier P, Vialle M, George B, Fardoun R, Guy G. Les métastases rachidiennes intradurales des cancers viscéraux. A propos de quatre cas. Neurochirurgie 1984; 30(3): 177–181.
38. Pelissou-Guyotat I, Guyotat J, Szapiro J, Ravon R, Moreau JJ, Vidal J. Métastases spinales intradurales de néoplasies viscérales. A propos de quatre cas. Revue de la littérature. Neurochirurgie 1989; 35(4): 236–241.
39. Raco A, Delfini R, Salvami M, Innocenzi G, Ciappetta P. Intramedullary metastasis of unknown origin: case report. Neurosurg Rev 1992; 15(2): 135–138.
40. Watanabe M, Nomura T, Toh E, Sato M, Mochida J. Intramedullary spinal cord metastasis: a clinical and imaging study of seven patients. J Spinal Disord Tech 2006; 19(1): 43–47.

www.urologickelisty.cz

2.3.4 Minimální reziduální choroba u solidních nádorů

Molekulární detekce diseminovaných nádorových buněk v kostní dřeni u pacientek s časným karcinomem prsu metodou kvantitativní RT-PCR pro karcinoembryonální antigen

Molecular detection of disseminated breast cancer cells in the bone marrow of early breast cancer patients using quantitative RT PCR for CEA

F. JANKU^{1,5,*}, J. SROVNAL², G. KORINKOVA², J. NOVOTNY³, L. PETRUZELKA¹, D. POWER³, B. MATOUS⁴, M. HAJDUCH^{1**}

¹Department of Oncology, First Faculty of Medicine, General Teaching Hospital, Charles University Prague, Czech Republic, email: fjanku@bonsecours.ie; ²Laboratory of Experimental Medicine, Departments of Pediatrics and Oncology, Faculty of Medicine, Palacky University and University Hospital in Olomouc, Olomouc Czech Republic, email: hajduchm@atlas.cz; ³St James's Hospital, University Teaching Hospital of Trinity College Dublin, Ireland; ⁴Institute of Biochemistry and Experimental Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University Prague, Czech Republic; ⁵Department of Oncology, Bon Secours Hospital, College Road, Cork, Ireland

Received September 9, 2007

Carcinoembryonic antigen (CEA) is widely used as a serum tumor marker in various types of cancer. Several systems for the CEA-RT-PCR approach have been reported to date. In this study, we have evaluated the quantitative CEA-RT-PCR as a diagnostic tool for detection of isolated tumor cells in bone marrow of early breast cancer patients prior to the administration of any adjuvant systemic therapy.

We obtained bone marrow aspirates of 70 patients with stage I (37%), II (60%), and III (3%) breast cancer who underwent either immediate complete resection of the tumor or neoadjuvant therapy with subsequent curative surgery. mRNA was isolated using QIAamp RNA blood mini kit (Qiagen ®). Subsequently quantitative RT-PCR for the expression of CEA has been performed.

CEA transcripts were detected in samples from 29 (41%) out of 70 patients. With a median follow-up of 22 months we observed 8 disease free survival (DFS) events including 4 systemic recurrences, 1 ductal in-situ carcinoma (DCIS), 1 local recurrence, and 2 deaths without tumour. Four DFS events (2 systemic recurrences, 2 deaths without tumor) occurred in patients with CEA transcripts in the bone marrow and 4 (2 systemic recurrences, 1 DCIS, 1 locoregional recurrence) in patients without CEA in the bone marrow. There was a trend to shorter DFS in the group with CEA in the bone marrow ($p=0.05548$). Overall survival was not assessed because only 2 deaths (both in patients without tumor) have been reported to date.

Quantitative RT-PCR assay for CEA may be a useful tool for detection of occult breast cancer cells in the bone marrow. Clinical and prognostic relevance of minimal residual disease using this technique remains unproven. Our results should be interpreted with caution with regard to 2 deaths in CEA positive group with no relationship to disease recurrence.

Key words: Breast cancer, Bone marrow, CEA, Occult tumor cells, Minimal residual disease

Early systemic spread of breast cancer cells is considered to originate metastatic foci in distant organs, yet usually missed by conventional tumor staging [1]. Detection of occult tumor cells in the bone marrow of patients with early breast cancer may have prognostic significance and may contribute to development of new therapeutic strategies [2]. Various methods have been applied including

immunocytochemical staining [3, 4] and the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) [5, 6, 7]. The RT-PCR method has been suggested as a procedure giving sensitivity 10- to 100- times higher than routine immunocytochemical methods [6]. However, RT-PCR in this context has proven controversial, because the specificity with which malignant cells can be detected depends on the number of amplification cycles and the design of the primers. Majority of genes encoding tumor-associated molecules is not limited to tumor cells, but is also found in certain normal tissues [8].

* both authors equally contributed to the work

** Corresponding authors

Table I. Patients' characteristics (n=70)

Characteristics	Patients	
	No.	%
Age		
Median	52	
Range	28-76	
Premenopausal	27	39
Postmenopausal	43	61
Stage		
I	26	37
IIA	19	27
IIB	23	33
IIIB	2	3
Node positive disease	35	50
Hormone receptors positive	62	89
Histology		
Invasive ductal carcinoma	53	76
Invasive lobular carcinoma	14	20
Mixed ductal/lobular carcinoma	3	4
Chemotherapy		
Neoadjuvant (F)AC*	4	6
antracyclines-taxanes	3	4
letrozole	1	1
Adjuvant		
(F)AC/(F)EC*	37	53
CMF**	5	7
antracyclines-taxanes	9	13
Tamoxifen	52	74
Anastrozole	2	3

* (F)AC/(F)EC: (fluorouracil), doxorubicin, cyclophosphamide/(fluorouracil), epirubicin, cyclophosphamide

**CMF: cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil

Carcinoembryonic antigen (CEA) was originally described as a glycoprotein molecule with an oncofetal expression pattern. It is widely used as a tumor marker of a variety of carcinomas, especially colon and breast cancer [9, 10]. Several systems for the CEA-RT-PCR approach have been reported to date. Gerhard et al. [6] have established a sensitive assay for the specific detection of CEA-expressing tumor cells in the bone marrow of patients with colorectal cancer and CEA-positive carcinomas. Their study has shown that the amplification of CEA-specific mRNA will allow specific and sensitive detection of single CEA-expressing tumor cells in 62 samples of the bone marrow and peripheral blood cells. Recently, Berois et al. [11] presented a study with 46 patients. CEA expression in the bone marrow was found in 17% of patients. Prognostic impact was not determined. Mitas et al. [12] have used quantitative CEA-RT-PCR for detection of occult tumor cells in axillary lymph nodes of breast cancer patients.

In this study, we have evaluated the quantitative CEA-RT-PCR as diagnostic tool for detection of isolated tumor cells in bone marrow of early breast cancer patients prior to the administration of any adjuvant systemic therapy.

Patients and methods

Patient and control population. Samples of bone marrow from sternum or iliac crest were obtained from patients with primary breast cancer treated in the Department of Oncology First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic. All patients enrolled were either post primary surgery with no evidence of disease or prior to a neoadjuvant therapy in case of locally advanced disease. Patients were enrolled between March 2001 and June 2004. Selection criteria included presentation with primary breast cancer stage I, II, and III according to AJCC [13], completion of an appropriate curative surgical procedure, or planned neoadjuvant therapy with curative intent. A total of 70 patients who satisfied these criteria were chosen: 26 (37 %) with stage I, 19 (27 %) with stage IIA, 23 (33 %) with stage IIB, and 2 (3 %) with stage IIIB. Detailed patients' characteristics are listed in Table I. All patients received adjuvant therapy according to either St. Gallen consensus from 2001 [14] or from 2003 [15]. Adjuvant chemotherapy with antracycline, non-antracycline, or antracycline-taxane based regimen was delivered to 51(73 %) patients. Among 62 (89 %) patients with expression of hormonal receptors, 54 (77%) patients received appropriate adjuvant hormonal treatment with either tamoxifen or anastrozole. Eight receptor positive patients did not receive adjuvant hormonal therapy because they had not finished adjuvant chemotherapy or radiotherapy at the time of analysis. Nine premenopausal patients with persistent ovarian function underwent ovarian ablation either with goserelin or surgery in addition to hormonal therapy. Patients were treated with breast radiation when breast-conserving surgery had been performed. Patients with more than 3 positive axillary lymph nodes underwent axillary radiation. All individuals were observed for disease recurrence and death. Reference values for the basal expression of CEA in hematopoietic tissue were obtained from blood of healthy volunteers.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the institutional Ethical Review Board. All patients or volunteers signed a written informed consent document.

Bone marrow/blood aspiration. To avoid epithelial contamination of bone marrow samples, the skin was incised before the aspirates were taken to minimize the risk of epithelial contamination. Between 0.5ml and 7.5ml (median 1.5ml) of bone marrow was aspirated from sternum (49 patients) or posterior iliac crest (21 patients) using disposable 15-gauge (1.8 mm) bone marrow needles (Allegiance Healthcare Corporation, McGaw Park, IL, USA) into syringes primed with EDTA. Peripheral blood of healthy donors was sampled from cubital vein into EDTA containing tubes. The samples were immediately processed as described in this section below (see RNA isolation and reverse transcription). Bone marrow aspiration either from sternum or posterior iliac crest as well as blood samples yielded sufficient amount of RNA for subsequent procedures.

RNA isolation and reverse transcription. Total RNA was extracted from bone marrow aspirates or blood using the commercial kit (QIAamp RNA Blood Kit, Qiagen, Valencia, USA) according to the manufacturer's protocol for fresh blood samples preparations. Concentration and purity of isolated RNA was assessed by a UV spectrometry. Three micrograms of total RNA were used for reverse transcription in a final volume of 30 μ l. RNA solution was pre-incubated with 0.3 μ g of random primers (Promega, Madison, WI) at 70 °C for 5 minutes and immediately put on ice afterwards. Then 6 μ l of 5 \times reverse transcriptase buffer RevertAid (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 3 μ l of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) and 0.75 μ l of ribonuclease inhibitor RNAsin (40 U/ μ l) (Promega, Madison, WI) were added and left for 5 minutes at room temperature. In the final step, 150 U of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase RevertAid (Fermentas, Vilnius, Lithuania) was added to each tube and samples were incubated at 42 °C for 60 minutes. Finally, reverse transcriptase was heat inactivated at 95 °C for 5 minutes.

Quantitative RT-PCR. Carcinoembryonic antigen was involved as a marker of minimal residual disease using modification of previously published method based on quantitative real-time PCR [16]. Primers were selected using PrimerPremier3 software and NCBI Reference sequences. Specific primers from two different exons and probes were selected (Generi-Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic) to span introns to reduce amplification of contaminating genomic DNA. Following primers and probe were used: CEA3 5'-TAA GTG TTG ACC ACA GCG ACC C-3', CEA4 5'-GTT CCC ATC AAT CAG CCA AGA A-3', CEA probe 5'-ATG TCC TCT ATG GCC CAG ACG ACC C-3'-BHQ1-HEX, the length of the PCR product was 167 bp. RQ RT-PCR reaction was performed in 25 μ l reaction volume consisting of 1 U of HotStart Taq Polymerase, 3 mM MgCl₂, 10 \times PCR buffer (AB Gene, Epsom, UK), 200 μ M dNTPs (Promega, Madison, WI, USA), 100 ng cDNA, 300 nM CEA3, 600 nM CEA4 and 200 nM CEA probe. The optimized thermal profile for amplification was initiated with 15 minutes Taq polymerase activation at 96 °C, followed by 50 cycles at 95 °C for 15 s and 65 °C for 15 s. Standards were manufactured by cloning of longer DNA fragments (513 bp) prepared by PCR amplification using primers CEA3outer (5'-ACA GTC TAT GCA GAG CCA CCC AAA-3') and CEA4outer (5'-GCT GTG GCC ACT GGC TGA GT - 3'). Amplified DNA was cloned applying Topo TA Cloning Kit into pCR 2.1-Topo plasmid (Invitrogen, Carlsbad, California). Concentration and purity of isolated plasmid DNA was assessed by UV absorbance method. Calculation of CEA absolute copy number in plasmid DNA was based on known plasmid molecular weight and Avogadro number (6.0236 \times 10²³ molecules.mol⁻¹). Gene expression was quantified based on calibration curves using appropriately diluted cloned gene specific standards ranging between 10² - 10⁹ copies per reaction (Figure 1). Each sample was analyzed in duplicate. Positive and negative controls were also incorporated into each experiment in order to evaluate

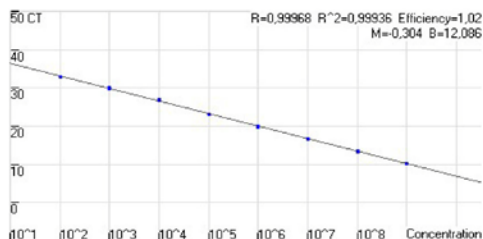


Figure 1. Typical example of calibration curve used for quantitative analysis of CEA gene expression. Ten-fold serial dilutions of standard plasmid DNA containing cloned fragment of CEA gene were made in 1mM Tris buffer. Individual dilutions corresponded to 10² - 10⁹ copies per reaction. Each sample was analyzed in duplicate and only mean values were plotted.

reproducibility and eventual sample contamination during the PCR procedure. The final results were presented as absolute copy numbers of CEA mRNA per 1 μ g of total RNA.

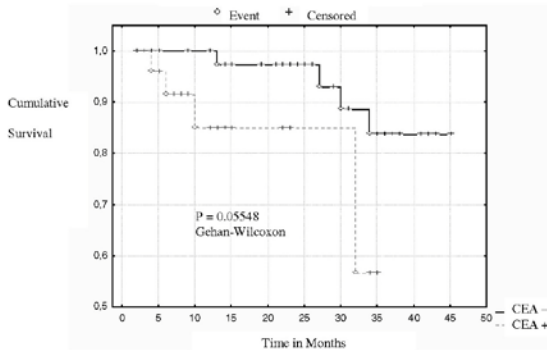
Statistical analysis

Statistical analysis was performed using software Statistica version 6 (StatSoft © 2003). We assessed correlation between CEA expression and other prognostic variables such as tumour size, infiltration of axillary lymph nodes, number of nodes involved, hormone receptors expression, histological type, and tumor grade. Furthermore, we performed univariate analysis of CEA in bone marrow and disease free survival (DFS), distant metastasis free survival (DMFS) and relapse free survival (RFS). DFS was defined as the time from entering the study to distant metastasis, locoregional recurrence, contralateral breast cancer, ductal carcinoma in-situ (DCIS), or death without tumor. DMFS was defined as the time from entering the study to distant metastasis. RFS was defined as the time from entering the study to distant metastasis, locoregional recurrence, contralateral breast cancer, or ductal carcinoma in-situ (DCIS).

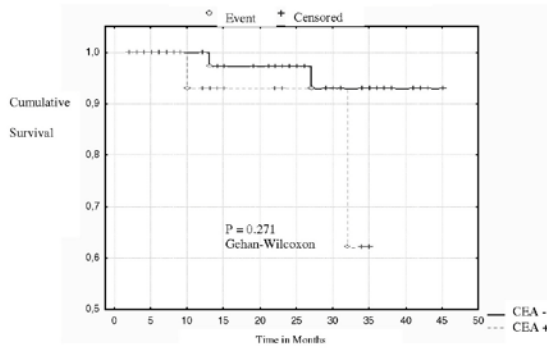
Results

We have successfully introduced sensitive and robust real time PCR method for quantitative determination of CEA expression in bone marrow and blood of breast cancer patients and/or healthy volunteers as a marker of minimal residual disease. The results of gene expression were normalized rather to the amount of total cellular RNA than to housekeeping gene(s) in order to avoid inter- and intra- individual variability. Since the background CEA mRNA expression was also found in non-malignant hematopoietic tissues, we have determined normal reference values analyzing illegitimate CEA transcription in the blood of 58 adult healthy blood donors.

A) DFS according to Kaplan Maier



B) DMFS according to Kaplan Maier



C) RFS according to Kaplan Maier

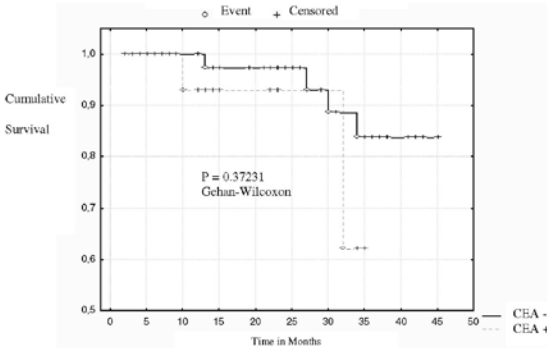


Figure 2

DFS, Disease free survival; DMFS, Distant metastasis free survival; RFS, Relapse free survival.

Low levels of CEA mRNA expression were detected in all tested control samples. Mean value of CEA expression was 83 ± 65.9 gene copies per μg of RNA. Cut-off value for minimal residual disease positivity in hematopoietic compartments was determined as 250 copies/ μg of RNA (mean value plus 2 SD). None of the healthy donors had CEA expression above the cut-off value.

Bone marrow aspirates from 70 patients were collected prior to administration of any systemic therapy. Satisfactory amount of mRNA was obtained in all 70 patients enrolled. CEA mRNA transcripts were detectable in bone marrow of 29 (41%) patients (Table 2). The majority of these patients had stage II disease: 9 stage IIA and 9 stage IIB. Ten patients had stage I and only one had stage IIIB. Slightly more than half of them (15/52%) had N+ disease (involvement of axillary lymph nodes). When compared to other prognostic features there was no correlation with tumor grade, hormone receptor status, and histological type (respectively: $r = -0.22$; $r = 0$; $r = 0.06$; $p > 0.05$ in all cases).

The median follow-up period at the time of analysis was 22 months (range, 2 to 45 months). Eight patients (9%) had experienced events recorded for DFS. 4 patients developed distant metastases, 1 locoregional recurrence, 1 DCIS, and 2 died without tumor (pulmonary embolism with no recurrence on the autopsy and 1 car accident). Among patients with CEA transcripts in the bone marrow we observed 2 systemic recurrences and 2 deaths without tumor. In patients without CEA in the bone marrow 2 systemic recurrences have been reported, 1 DCIS and 1 locoregional relapse. There was a trend to shorter DFS in the group with CEA in the bone marrow, however it was just above the level of statistical significance ($p = 0.05548$, Gehan-Wilcoxon). There was no difference between both groups as regards to DMFS and RFS (respectively: $p = 0.271$, $p = 0.37231$). DFS, DMFS, and RFS curves are displayed in Figure 2A-C. Since only 2 deaths (both not related to tumor) have been reported to date, overall survival has not been evaluated.

Discussion

The detection of occult tumor cells in the bone marrow of patients with early stages breast cancer might contribute to more accurate staging predicting disease relapse and shorter overall survival [17]. Several markers including cytokeratins, mammaglobin, and maspin have been tested to date for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with various carcinomas including breast cancer [18, 19, 20]. CEA was investigated as a marker of occult tu-

mor cells in lymph nodes, samples of peripheral blood, and bone marrow aspirates. Min et al. [21] has shown excellent diagnostic utility of RT-PCR CEA in detection of occult tumor cells in sentinel lymph node biopsies. Mitas et al. [12] achieved similar results using quantitative RT-PCR technique. In opposition others concluded that CEA had little diagnostic value in the same setting [22]. Unfortunately, all of these studies included small number of patients (from 17 to 22), thus no conclusion could have been drawn. Similar conflicting results were obtained when using peripheral blood [23]. Based on the review of literature, CEA mRNA transcripts in the bone marrow were found from 17.4% to 67% of patients. Gerhard et al. [6] detected CEA using RT-PCR in 4 out of 6 breast cancer patients. Zhong et al. [24] detected CEA in 27.8% of patients in the largest series published to date (181 patients after breast surgery) using the similar technique. Berois et al. [11] reported the smallest proportion of CEA positive bone marrow samples (17.4%; 8 out of 46 patients). We diagnosed minimal residual disease in 41% (29 out of 70) early breast cancer patients using the quantitative RT-PCR technique.

In previously published studies the presence of minimal residual disease in the bone marrow using various immunohistochemical assays was identified as an independent negative prognostic factor for disease free and overall survival of early breast cancer patients [17]. Moreover, just recently published meta-analysis confirmed these findings [25]. CEA as a marker of occult tumor cells in peripheral blood showed negative prognostic value in patients with colorectal and non-small cell lung cancer [26, 27]. In breast cancer, Jotsuka et al. [28] published results from series of 101 consecutive early breast cancer patients. They identified that CEA mRNA transcripts detected in peripheral blood adversely affected patients' prognosis. Stathopoulou et al. [29] evaluated CEA in blood samples from patients with breast, colorectal or hematological malignancies without reporting survival data. No larger study concerning prognostic value of CEA in the bone marrow has been published thus far. Overall in our study in the median follow up of 22 month we observed 8 DFS events, 4 in patients with CEA transcripts in the bone marrow. However 2 events in the group with CEA in the bone marrow were not tumor related. There was a trend to shorter DFS in the group with CEA in the bone marrow, which is, however, just above statistical significance ($p=0.05548$). This finding was not confirmed by means of DMFS and RFS. DFS data should be interpreted with extreme caution since it may be influenced by 2 tumor unrelated death in the subgroup with proven CEA transcripts in the bone marrow. No correlation with other clinically used prognostic variables has been found. Our study showed that CEA might be used as a marker of minimal residual disease in the bone marrow of patients with early stages breast cancer, however its specificity should be further evaluated on bone marrow samples of healthy volunteers to exclude the possibility of illegitimate transcripts in normal bone marrow. The prognostic significance of CEA remains to be further investigated.

Table 2. Distribution of CEA in the bone marrow according to the stage and axillary lymph nodes involvement.

	CEA + /%	CEA- /%
All patients (N=70)	29 out of 70 / 41	41 out of 70 / 59
Stage I	10 out of 29 / 35	16 out of 41 / 39
Stage IIA	9 out of 29 / 31	10 out of 29 / 25
Stage IIB	9 out of 29 / 31	14 out of 29 / 34
Stage IIIB	1 out of 29 / 3	1 out of 29 / 2
Axillary lymph nodes involvement	15 out of 29 / 52	20 out of 29 / 49

No correlation observed between CEA in the bone marrow and other prognostic variables.

The study was supported in parts by grant projects NR7804, MPO 1H-PK45 and the research concepts MSM0021620808 and MSM6198959216.

References

- [1] COTE R, ROSEN P, LESSER M et al. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749–56.
- [2] WIEDSWANG G, BORGES 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: 3469–78.
- [3] PANTEL K, SCHLIMOK G, ANGSTWURM M et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumour cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3: 165–73.
- [4] KAUL S, ZHONG XY, DIEI I et al. Tumour cell contamination (TC) in bone marrow of breast cancer patients: Improved sensitivity and quantification of tumour cells using BM2-immunomagnetic beads. *Arch Gynecol Obstet* 1996; 258: 192
- [5] DATTA YH, ADAMS PT, DROBYSKI WR et al. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12: 475–82.
- [6] GERHARD M, JUHL H, KALTHOFF H et al. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumour cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12: 725–29.
- [7] CORRADINI P, VOENA C, ASTOLFI M et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12: 1693–8.
- [8] KRISMANN M, TODT B, SCHROEDER J et al. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2769–75.
- [9] SHIVELY JE, BEATTY JD. CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. *Crit Rev Oncol Hematol* 1985; 2: 355–99.
- [10] NEUMAIER M. Chimeric CEA-specific antibody fragments and anti-idiotypic antibodies for

- immunoscintigraphy and new therapeutic approaches to colorectal carcinomas. In: Wagener C, Neumann S (eds) *Molecular diagnostics of cancer*. Berlin Heidelberg New York, Springer, 1993; p 187–206
- [11] BEROIS N, VARANGOT M, SONORA C, ZARANTONELLI L et al. Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA. *Int J Cancer* 2003; 103: 550–5.
- [12] MITAS M, MIKHITARIAN K, WALTERS C et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer* 2001; 93: 162–71.
- [13] BEAHRS OH, HENSON DE, HUTTER RVP et al. Breast cancer. In: *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th Edition, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 2002; p 161–67.
- [14] GOLDBIRSCHE A, GLICK JH, GELBER RD et al. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3817–27.
- [15] GOLDBIRSCHE A, WOOD WC, GELBER RD et al. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3357–65
- [16] SILVA JM, RODRIGUEZ R, GARCIA JM et al. Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut* 2002; 50: 530–4.
- [17] BRAUN S, VOGL FD, NAUME B et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 793–802.
- [18] SLADE MJ, SMITH BM, SINNETT HD et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 870–9.
- [19] JANKU F, KLEIBL Z, NOVOTNY J et al. a novel marker of minimal residual disease in early stages breast cancer. *Neoplasma* 2004; 51: 204–8.
- [20] BALLESTRERO A, COVIELLO DA, GARUTI A et al. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction of the maspin gene in the detection of bone marrow breast carcinoma cell contamination. *Cancer* 2001; 92: 2030–5.
- [21] MIN CJ, TAFRA L, VERBANAC KM. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Res* 1998; 58: 4581–4.
- [22] BOSTICK PJ, CHATTERJEE S, CHI DD 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: 2632–40.
- [23] CORRADINI P, VOENA C, ASTOLFI M et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12: 1693–8.
- [24] ZHONG XY, KAUL S, THOMPSON J et al. Evaluation of the reverse transcriptase/polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen for the detection of breast cancer dissemination in bone marrow and peripheral blood. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 669–74.
- [25] BRAUN S, VOGL FD, PANTEL K. Disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow (BM) and clinical outcome: Final results of pooled analysis on 10-year survival of 4703 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23, No 16S (June 1 Supplement): #502
- [26] GUADAGNI F, KANTOR J, ALOE S et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res* 2001; 61: 2523–32.
- [27] CASTALDO G, TOMAIUOLO R, SANDUZZI A et al. Marchettiello I, Salvatore F. Carcinoembryonic antigen mRNA analysis detects micrometastatic cells in blood from lung cancer patients. *Eur Respir J* 2003; 22: 418–21.
- [28] JOTSUKA T, OKUMURA Y, NAKANO S ET AL. Persistent evidence of circulating tumour cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery* 2004; 135: 419–26.
- [29] STATHOPOULOU A, MAVROUDIS D, PERRAKI M et al. Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers. *Anticancer Res* 2003; 23(2C): 1883–90.

2.3.4.2 Mikrometastatické postižení sentinelových lymfatických uzlin u karcinomu prsu

Správný staging nádorového onemocnění je nezbytným podkladem pro stanovení prognózy a terapie. V případě karcinomu prsu je pro staging důležité vyšetření axilárních lymfatických uzlin. Exenterace axily je však zatížena nemalou morbiditou, zejména vznikem lymfedému. Vyšetřením sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu je možno se v případě nepřítomnosti metastáz vyhnout následné exenteraci axily. Postižení sentinelové uzliny totiž se značnou senzitivitou a specificitou predikuje postižení axilárních uzlin. Bohužel, u třetiny až poloviny pacientek s karcinomem prsu klinického stádia I-II a bez postižení lymfatických uzlin dochází k recidivě onemocnění. V předkládané práci jsme se zabývali prognostickou hodnotou mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu.

Na přítomnost mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin byl vyšetřen soubor 44 pacientek operovaných pro karcinom prsu ve FN Olomouc v letech 2004 – 2007. Medián sledování souboru byl 25,1 (21,1-28,8) měsíců, medián doby do progresu 17,4 (10,1-21,1) měsíců. Bližší charakteristika souboru viz Tab. 8. Chirurgický výkon byl proveden ve 100% případech, u 61% byla provedena ablace, v 39% se jednalo o kvadrantektomii s následnou radioterapií. Peroperačně byla pomocí radiofarmaka a gama kamery detekována sentinelová lymfatická uzlina, která byla po preparaci rozpůlena. Polovina sentinelové uzliny a axilární uzliny byly vyšetřeny standardně histopatologicky (prokrájení, IHC barvení) a druhá polovina sentinelové uzliny byla vyšetřena metodou QRT-PCR. U všech pacientek byla následně provedena standardní exenterace axilly, vyšetření všech spádových uzlin a nodální staging. Patientky byly dále léčeny a dispenzarizovány dle platných standardních protokolů léčby.

Metodou QRT-PCR byla v sentinelových lymfatických uzlinách stanovena míra exprese markerů CEA, mamaglobinu a CK 19. Jako mikrometastaticky pozitivní byly označeny ty uzliny, kde míra exprese alespoň jednoho z vyšetřovaných markerů přesáhla stanovenou cut-off hodnotu (Tab. 3).

Tab. 8

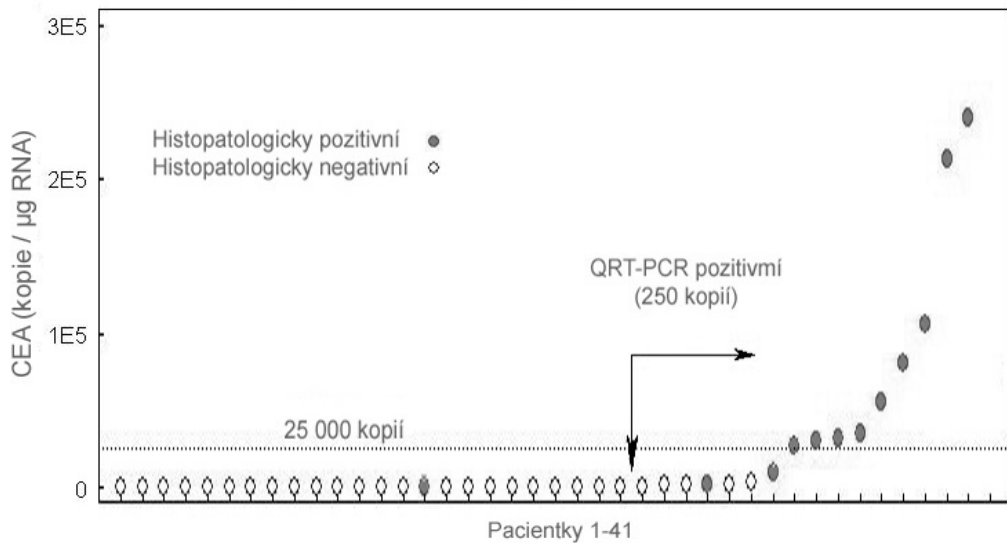
Charakteristika souboru pacientek s karcinomem prsu

Pacientky (N=44)		
	No.	%
Věk		
Medián	57	
Rozmezí	28-80	
Stádium		
0	2	5
I	16	36
IIA	8	18
IIB	7	16
IIIA	4	9
IIIB	1	2
IV	2	5
ND	4	9
N+ (postižení spádových axilárních uzlin; N1+N2)	16	36
Histologie		
Invazivní duktální karcinom	31	74
Invazivní lobulární karcinom	10	24
Kribriformní karcinom	1	2
Grading		
G1	4	12
G2	14	41
G3	16	47
Chemoterapie		
Neoadjuvantní (Doxo+NVB)	1	2
Adjuvantní	18	42
(F)AC/(F)EC	11	61
CMF	4	22
antracyklin-taxan	3	17
Radioterapie	34	80
Hormonoterapie	26	67

Histopatologickým vyšetřením bylo prokázáno mikrometastatické postižení sentinelových uzlin u 36% pacientek (16/44). QRT-PCR vyšetřením sentinelových uzlin jsme prokázali přítomnost mikrometastáz až u 59% pacientek (26/44). Všechny histopatologicky pozitivní uzliny byly zároveň QRT-PCR pozitivní. V souboru 28 pacientek s histopatologicky negativními sentinelovými uzlinami jsme metodou QRT-PCR detekovali mikrometastatické postižení u 10 pacientek (36%).

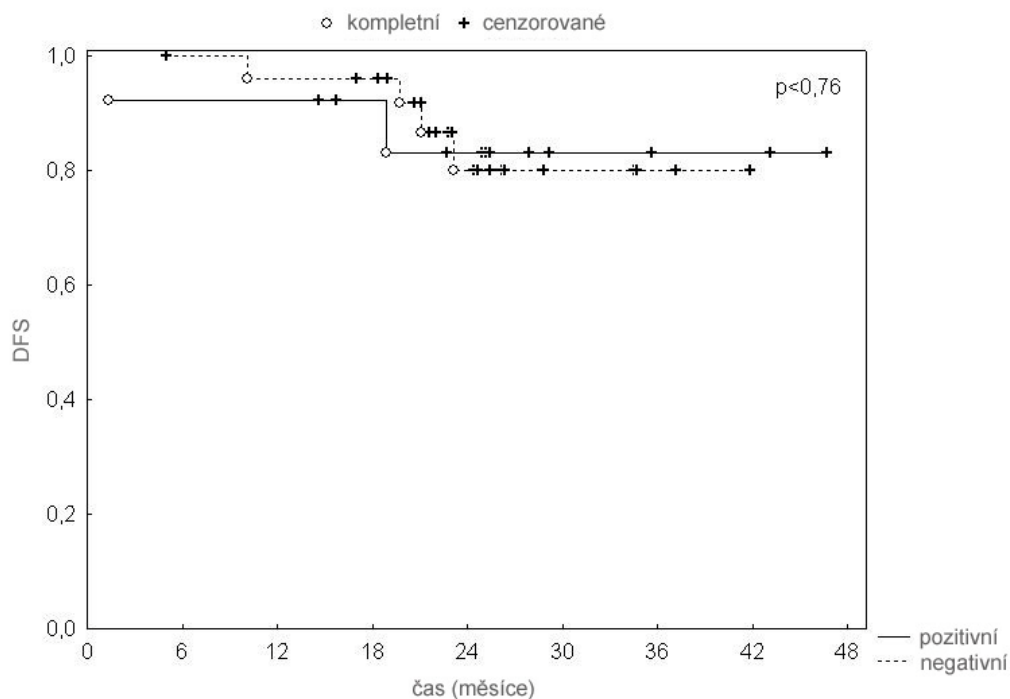
Bylo provedeno statistické zhodnocení dat. Prokázali jsme, že absolutní kvantifikací genové exprese lze dle výše exprese testovaných markerů odhadnout, zda-li bude i druhá polovina

testované lymfatické uzliny pozitivní také histopatologicky. Např. exprese karcinoembryonálního antigenu nad 250 kopií/μg RNA značí přítomnost mikrometastáz, exprese CEA nad 25 000 kopií/μg RNA již predikuje histopatologickou pozitivitu (Obr. 5).



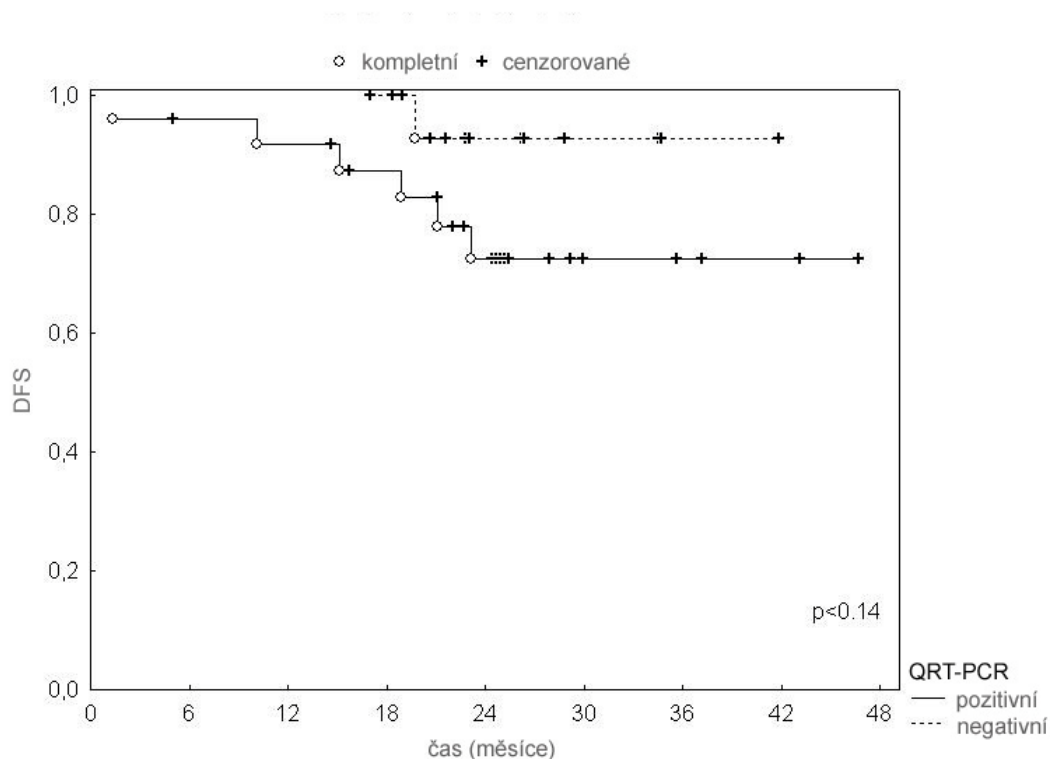
Obr. 5 Expres CEA v jednotlivých sentinelových lymfatických uzlinách, cut-off hodnoty pro stanovení molekulární, resp. histopatologické positivity mikrometastického postižení.

Statistickou analýzou parametrů přežití byla zhodnocena prognostická hodnota přítomnosti mikrometastáz v sentinelových lymfatických uzlinách. Vzhledem k relativně krátké době sledování (medián 25,1 měsíců) byla hodnocena přítomnost mikrometastáz k délce období bez známek onemocnění (disease free survival, DFS). Při hodnocení celého souboru 41 pacientek, nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v DFS ($p < 0,76$) mezi pacientkami s histopatologicky pozitivními či negativními sentinelovými uzlinami (Obr. 6), což lze vysvětlit krátkou dobou sledování. Ve skupině 13 pacientek s pozitivními uzlinami došlo ke dvěma generalizacím onemocnění s následným úmrtím. Ve skupině 28 pacientek s negativními uzlinami došlo ke dvěma lokálním recidivám (lymfatické uzliny, jizva) a dvěma generalizacím, z nichž jedna skončila úmrtím pacientky.



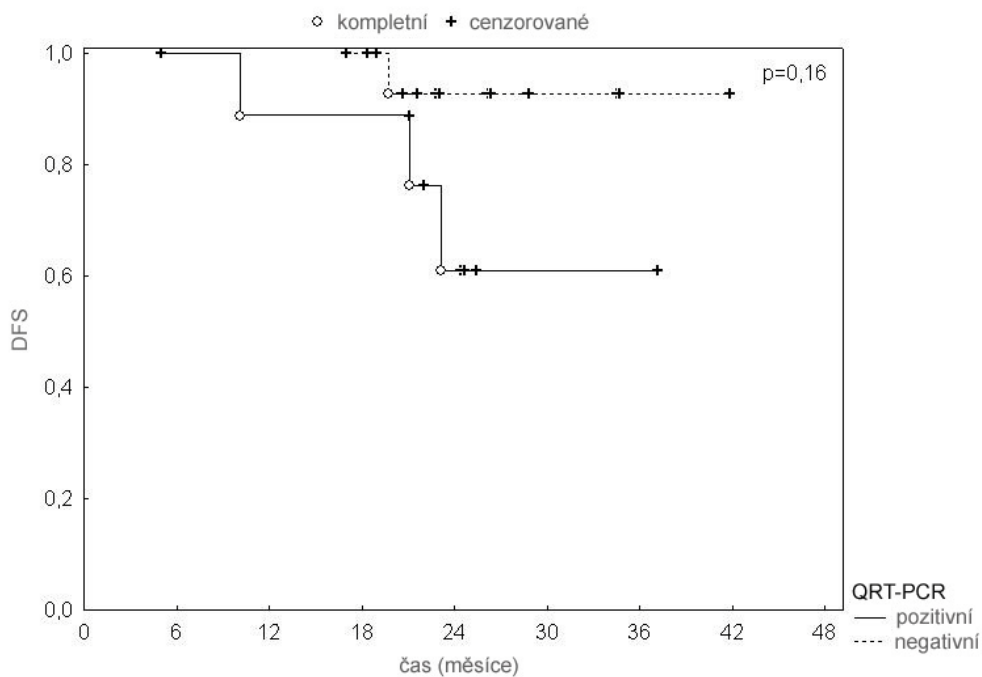
Obr. 6 DFS analýza dle histopatologické positivity sentinelových uzlin

Při rozdělení souboru 44 pacientek dle QRT-PCR positivity mikrometastatického postižení sentinelových uzlin, byl zjištěn rozdíl v DFS mezi pacientkami s QRT-PCR pozitivními a negativními sentinelovými uzlinami, který nebyl statisticky signifikantní (Obr. 7), avšak byl výraznější než v případě histopatologicky pozitivních uzlin. Pacientky s QRT-PCR pozitivními uzlinami mají kratší DFS a vyšší riziko rozvoje recidivy v relativně krátkém intervalu od diagnózy, než pacientky s uzlinami QRT-PCR negativními. Ve skupině 26 pacientek s pozitivními uzlinami došlo ke čtyřem generalizacím onemocnění a třem následným úmrtím. Ve skupině 18 pacientek s negativními uzlinami došlo pouze k jedné recidivě (recidivě v jizvě) a k žádnému úmrtí.



Obr. 7 DFS analýza dle QRT-PCR pozitivity sentinelových uzlin

Pokud jsme se zaměřili pouze na pacientky s histopatologicky negativními sentinelovými lymfatickými uzlinami (28 pacientek) a rozdělili jsme je dle QRT-PCR pozitivity mikrometastatického postižení, zjistili jsme opět rozdíl v DFS mezi oběma skupinami, ne však statisticky signifikantní ($p < 0,16$) (Obr. 8). Ve skupině pacientek s histopatologicky negativními uzlinami (pT1-2N0M0), mají pacientky s QRT-PCR pozitivními uzlinami kratší DFS a vyšší riziko rozvoje recidivy, než pacientky s uzlinami QRT-PCR negativními. Ve skupině 10 pacientek s QRT-PCR pozitivními uzlinami došlo ke dvěma generalizacím onemocnění, jedné lokální recidivě a jednomu následnému úmrtí. Ve skupině 18 pacientek s negativními uzlinami došlo pouze k jedné recidivě (recidivě v jizvě) a k žádnému úmrtí. Žádná z těchto čtyř pacientek neobdržela systémovou adjuvantní chemoterapii (Tab. 9).



Obr. 8 DFS analýza dle QRT-PCR pozitivity sentinelových uzlin – soubor histopatologicky negativních (pT1-2N0M0) patientek s karcinomem prsu

Tab. 9 Charakteristika souboru pT1-2N0M0 patientek s karcinomem prsu, u nichž došlo k recidivě nádorového onemocnění

No.	TNM	N (pozitivní / vyšetřeno)	Histologie	G	Operace	CHT	RT	HT	Recidiva	Terapie
1	pT1bN0M0	0/18	inv.dukt.ca	ND	KE	0	50+10Gy	0	v jizvě	Ablace, AC+Herceptin
2	pT1cN0M0	0/14	inv.dukt.ca	1	KE	0	50Gy	Tamoxifen	generalizace, +	BSC
3	pT1cN0M0	0/7	inv.dukt.ca	2	AE	0	0	Tamoxifen	lymf. uzlina	CMF, RT 50Gy, Aromasin
4	pT2N0M0	0/9	inv.dukt.ca	1	AE	0	50Gy	0	generalizace	Aromasin

2.3.4.3 Minimální reziduální choroba u pacientů s kolorektálním karcinomem – pilotní studie

Minimální reziduální nádorová choroba u kolorektálního karcinomu – nový prognostický marker v onkochirurgii

Minimální reziduální nádorová choroba u kolorektálního karcinomu – nový prognostický marker v onkochirurgii

(prezentácia venovaná

70. narodeninám

Prof. MUDr. Júliusa Mazucha, DrSc.)

¹Duda, M., ¹Vysloužil, K., ¹Skalický, P., ¹Klementa, I., ¹Starý, L., ²Hajdúch, M., ²Srovnal, ²J., ²Kořínková, G.

¹II. chirurgická klinika FN a LF UP Olomouc
Prof. MUDr. Miloslav Duda, DrSc.

²Laboratoř experimentální medicíny FN a LF UP Olomouc
MUDr. Marián Hajdúch

Podpořeno grantem IGA MZ ČR NR/7804-5.

Souhrn

Cíl: Zjistit význam detekce minimální reziduální nádorové choroby (MRD) u kolorektálního karcinomu (KRK) pro klasifikaci, prognózu a léčbu pacientů s tímto onemocněním.

Metodika: Detekce reziduální nádorové choroby u KRK je prováděna na našem pracovišti v rámci řešení grantu IGA MZ ČR NR/7804-5. Jedná se o výzkumný projekt na léta 2004 – 2008. Odběr materiálu k laboratorní detekci reziduální nádorové choroby provádíme ve dvou fázích operačního výkonu a při následných ambulantních kontrolách nemocného. Na počátku operace odebíráme kostní dřeň, systémovou krev a portální krev po kanylaci mesenterální vlny. Druhou skupinu odběrů tvoří systémová a portální krev, které odebíráme na závěr operace po odstranění primárního tumoru resp. metastázy. Poslední skupinu vzorků (kostní dřeň a systémová krev) získáváme při ambulantní kontrole v odstupu jednoho měsíce od operace, před případným zahájením adjuvantní léčby. Laboratorní detekci nádorových buněk v kostní dřeni a krvi provádíme metodou RT-RQ-PCR-marker CEA.

Výsledky: V období 3/2004 – 7/2006 bylo operováno a kompletně vyšetřeno celkem 255 pacientů s KRK, u kterých byla provedena resekce primárního tumoru střeva a dále 36 nemocných s jaterními metastázami KRK.

V dosavadních výsledcích byly zjištěny tyto statisticky signifikantní závislosti:

1. Pozitivita lymfatických uzlin (N status) koreluje s pozitivitou reziduální nádorové choroby v portální a systémové krvi.

2. Objem nádoru souvisí s pozitivitou MRD v kostní dřeni, na rozdíl od invazivity (hloubka prorůstání), kde vztah zatím nenacházíme.
3. Ve všech stádiích TNM je pokles MRD v kostní dřeni měsíc po operaci. Větší je u méně pokročilých tumorů.
4. V době operace byla pozitivita MRD alespoň v jednom z vyšetřovaných kompartmentů 33% a po operaci došlo k poklesu positivity na 25%.
5. Pozitivita reziduální nádorové choroby u nemocných se synchronními jaterními metastázami byla v době operace 45% oproti 24% u metastáz metachronních. Po odstranění jaterního ložiska bylo kontrolní vyšetření u synchronních metastáz pozitivní u 30% pacientů versus 13% u metastáz metachronních.

Závěr: Vyšetření minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu a jaterních metastáz se jeví jako perspektivní ukazatel zpěšňující klasifikaci nádorového onemocnění a v budoucnu možná i využitelný při dispenzarizaci a indikaci onkologické adjuvantní léčby.

Minimal residual disease in patients with colorectal carcinoma: the new prognostic marker in oncosurgery

Summary

Abstract

Aim: Minimal residual disease (MRD) in patients with colorectal carcinoma (CRC) assessment and its role in classification, prognostics, and therapy of patients with the disease.

Methods: Detection of residual disease in patients with colorectal carcinoma (CRC) has been performed in our department within the framework of the project IGA MZ ČR NR/7804-5. The research covers the period of 2004-2008. Sample material extraction for the laboratory detection of residual CRC disease is performed during two phases of surgical intervention and subsequently during the check-ups in the out-patient's department. At the beginning of surgery, bone marrow, system blood, and portal blood after cannulation of mesenterial vein are sampled. The other group of samples includes system and portal blood extracted during the final stage of surgery, after the removal of primary tumour, or metastasis, respectively. The last portion of samples (bone marrow and system blood) is obtained during the check-up one month after the intervention, before the commencement of adjuvant therapy. The method RT-RQ-PCR-marker CEA is used for the laboratory detection of tumour cells in bone marrow and blood.

Results: Between 3/2004 and 7/2006 255 patients with CRC were operated on and complex examination was carried out. In the 255 patients the resection of primary colorectal carcinoma was performed. Another 36 patients treated had colorectal carcinoma metastases in liver.

The results obtained suggest the following statistically significant correlations:

1. Positive N status correlates with positive residual disease of CRC in portal and system blood.
2. The volume of cancer correlates with positive MRD findings in bone marrow. On the contrary, the correlation with invasiveness (depth of intergrowth) has not been reported.
3. In all stages of TNM the decrease of MRD in bone marrow one month after the intervention was recorded. The difference is more significant in less developed tumors.
4. At the time of surgery, MRD was positive at least in one of the compartments examined at 33%, after the intervention there was decrease to 25%.
5. Positivity of residual disease in patients with concurrent liver metastases reached at the time of surgery 45% compared to 24% in case of metachronous metastases.

After the removal of the liver focus, the check-up proved positive finding in 30% of patients with synchronous metastases, compared with 13% in case of metachronous metastases.

Conclusion: Detection of minimal residual disease of colorectal cancer and liver metastases appears to be a prospective marker specifying the classification of tumorous condition. In the future it may be useful in dispensary care and as the indication for oncological adjuvant therapy.

Úvod

Minimální reziduální nádorovou chorobou (MRD – minimal residual diseases) označujeme přítomnost izolovaných či kolujících nádorových buněk v krvi, kostní dřeni, mízních uzlinách a tělních dutinách např. peritoneální dutině. Tyto buňky jsou považovány za prekursor vzniku vzdálených metastáz. MRD nelze zaměňovat za mikrometastázy, což jsou shluky nádorových buněk se stromálními buňkami (clustery) do velikosti 2 mm. Oba tyto stavy nemusí nutně vyústit ve vznik manifestních nádorových metastáz a zatím nejsou známy přesné mechanismy, za jakých okolností k tomu dochází. Koncentrace těchto nádorových buněk ve zkoumaných vzorcích je pod detekčním limitem klasických cytologických metod a obtížně jsou prokazatelné i imunohistochemickými vyšetřeními. Až rozvoj nových molekulárně biologických metod umožňuje zkoumat MRD na nové kvalitativní úrovni.

Význam průkazu MRD u kolorektálního karcinomu a u solidních nádorů vůbec není zatím přesně vyhodnocen. V teoretické rovině lze předpokládat, že by toto vyšetření mohlo přispět k zpsnění klasifikace a prognózy a stanovení cílené adjuvantní léčby. Určení rozsahu a pokročilosti nádorového onemocnění se označuje jako „staging“. Využívá se přitom současných zavedených vyšetření jako je ultrazvuk, výpočetní tomografie atd. Tyto metody však nemají dostatečnou citlivost pro detekci časných stádií metastázování a právě průkaz MRD může v budoucnu zpřesnit určení pokročilosti a klasifikace nádorů. Pro určení těchto časných, dosud běžnými metodami nepostizitelných stádií se začíná užívat označení „ultrastaging“.

S určením pokročilosti nádorového onemocnění samozřejmě úzce souvisí stanovení prognózy a cílená indikace adjuvantní léčby.

Metodika

Od roku 2004 jsme zahájili v rámci řešení grantového projektu plánovaného do roku 2008 vyšetřování MRD u operovaných pro kolorektální karcinom. Provádíme odběr venózní a portální krve a kostní dřevě vždy na počátku operace, na závěr operace pak znovu venózní a portální krev a jeden měsíc po operaci před zahájením eventuální adjuvantní léčby znovu vyšetříme venózní krev a kostní dřeň. Portální krev odebíráme ze zakanylované odvodné žíly od tumoru, či přímo z v.portae. Vzorky vyšetřujeme v laboratoři experimentální medicíny při dětské klinice LF UP v Olomouci.

Vyšetření se provádí metodou RT-RQ-PCR – marker CEA. Všichni nemocní jsou trvale dispenzarizováni podle stanoveného protokolu členy našeho týmu. Získané laboratorní výsledky budou analyzovány a konfrontovány s klinickým nálezem operovaných po tři až pětiletém sledování. V této práci podáváme prvou předběžnou zprávu o našich výsledcích po dvou letech trvání projektu.

Klinický soubor

V letech 2003 – 2005 bylo na II. chirurgické klinice FN a LF UP v Olomouci provedeno 594 kurativních resekcí pro kolorektální karcinom. Od roku 2004 jsme v prospektivní studii začali u operovaných vyšetřovat MRD. Podle stanovené metodiky tak bylo vyšetřeno v období 2004/3 – 2006/7 281 nemocných. Charakteristika našeho souboru vyplývá z tabulky 1 a grafů 1,2,3,4.

Výsledky

Toto průběžné hodnocení analyzuje výsledky vyšetření MRD u celkem 281 operovaných v letech 2004/3 – 2006/7. Celkem u nich bylo vyšetřeno 1740 vzorků na přítomnost MRD. V době operace byla zjištěna pozitivita MRD alespoň v jednom z vyšetřovaných kompartmentů v průměru u 33% operovaných. Nejčastější byla pozitivita

v kostní dřeni v 27%, v portální krvi v 9% a v systémové krvi v 9%. Při kontrolním vyšetření asi měsíc po operaci poklesla přítomnost MRD aspoň v jednom z vyšetřovaných kompartmentů v průměru na 25%. V kostní dřeni to bylo 20% a v systémové krvi v 8%.

Dosud zjišťujeme tyto významné závislosti:

- Pozitivita lymfatických uzlin (N status) statisticky významně koreluje s pozitivitou MRD v portální a systémové krvi.
- Velikost nádoru koreluje s pozitivitou MRD v kostní dřeni, na rozdíl od invazivity (hloubka prorůstání), kde jednoznačnou korelací zatím nenacházíme.
- Ve všech klinických stádiích dle TNM klasifikace je vidět pokles positivity MRD v kostní dřeni měsíc po resekcii tumoru, pokles je větší u klinických stádií 1 a 2, než u 3 a 4.
- Pozitivita MRD u nemocných se synchronními jaterními metastázami byla v době operace 45% oproti 27% u metastáz metachronních. Po odstranění jaterního ložiska bylo kontrolní vyšetření u synchronních meta-

stáz pozitivní u 30% pacientů versus 13% u metastáz metachronních.

- Doba sledování nemocných je od 3 do 27 měsíců, vyhodnocení klinických výsledků je ve stádiu zpracování. Detailní analýzou korelace klinického nálezu a pozitivní MRD provedeme v tří a pětiletém intervalu od operace.

Diskuse

Výskyt lokoregionálních metastáz po RO resekci je dnes považován za ukazatele kvality chirurgického výkonu, který může operatér ovlivnit dodržováním platných zásad radikality u příslušného nádoru. Naproti tomu výskyt vzdálených metastáz je vysvětlován předoperační, případně peroperační diseminací nádorových buněk. Přítomnost volných nádorových buněk v těle mimo vlastní nádor, především v krvi, kostní dřeni či uzlinách se všeobecně označuje jako minimální reziduální nádorová choroba (MRD). První popis diseminace nádorových buněk v krvi u karcinomu pochází už z roku 1869 (1), ale stoupající pozornost byla tomuto problému věnována teprve s rozvojem metod vhodných k detekci volných nádorových buněk. Jak různé klasické cytologické metody (11,19) užívané v padesátých a šedesátých letech minulého století, tak o dvacet let později využívané metody imunohistochemické (25,29) se ukázaly jako málo spolehlivé, protože koncentrace cirkulujících nádorových buněk se většinou nachází pod detekčními možnostmi těchto vyšetření. Teprve s rozvojem nových molekulárně biologických metod (real time RT-PCR) je dána možnost MRD řádně monitorovat (5,9,10). Principem detekce MRD je identifikace nádorových buněk epitelálního původu v krvi, kostní dřeni či lymfatických uzlinách. Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje buď průkaz pro nádor specifických mutací DNA (např. mutace genu K-ras nebo mutace p53). Tento způsob je omezen jen na nádory s těmito mutacemi a může přinášet falešně pozitivní výsledky, způsobené nálezy fragmentů volné nádorové DNA, které se mohou uvolnit z nekrotických rozpadlých buněk. Výhodnější je proto průkaz exprese genu jednovláknové RNA, označované jako messenger RNA (m-RNA) metodou reversní transkriptázy – PCR (RT-PCR) z nádorových buněk. Zatímco volné RNA se velmi rychle degraduje, pak nález m-RNA koresponduje s přítomností živých nádorových buněk (17, 21, 27). Pro detekci nádorových buněk metodou real-time RT-PCR u solidních nádorů je důležitý výběr vhodného markeru, genu, který je dostatečně specifické pro sledovanou nádorové buňky.

Může to být např. karcinoembryonální antigen, cyto-keratin 20, mucin či mammaglobulin 1 apod. (5, 10). Výhodou této metody je vysoká senzitivita s průkazem i nádorové buňky na 107 normálních buněk (21).

Pozornost věnovaná výskytu MRD u solidních nádorů v posledních deseti letech stoupá (11, 16, 22, 30). I když hodnocení je prováděno u celé řady solidních nádorů např. u melanomu, prostaty, karcinomu prsu, cervixu, štítné žlázy apod., přece jen relativně největší pozornost je věnována problematice kolorektálního karcinomu (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 18, 20, 23, 24, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34). Větší počty vyšetřených a dlouhodobější sledování nemocných je však i u kolorektálního karcinomu za-

tím výjimkou (tab. 2). Většina studií se shoduje v tom, že pro určení klinického významu nálezu MRD u nemocných s kolorektálním karcinomem jsou nutné rozsáhlejší prospektivní dlouhodobé studie. K tomu by měl přispět i náš projekt, jehož první průběžné výsledky zde předkládáme.

Závěr

Vyšetření MRD u kolorektálního karcinomu a jaterních metastáz se jeví jako perspektivní ukazatel zpřesňující klasifikaci nádorového onemocnění. V budoucnu je i možnost jeho využití při dispenzarizaci nemocných a indikaci onkologické adjuvantní léčby. Zpřesnění metody detekce reziduální choroby slibuje vedle detekce CEA zavedení dalších znaků. Pacienti budou nadále sledováni a výsledky vyhodnocovány v korelaci s klinickým vývojem onemocnění a pozdějším vznikem metastáz.

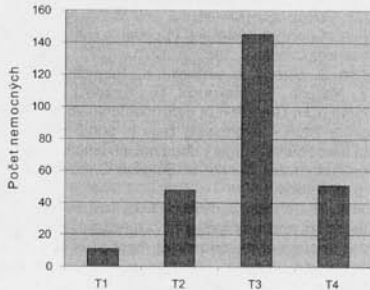
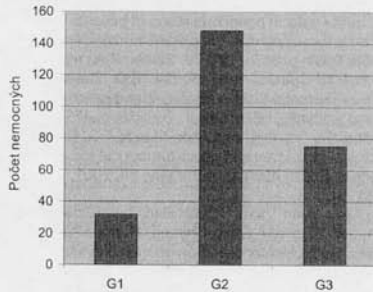
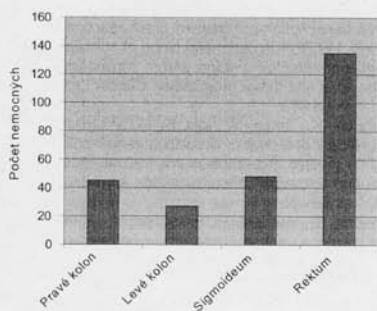
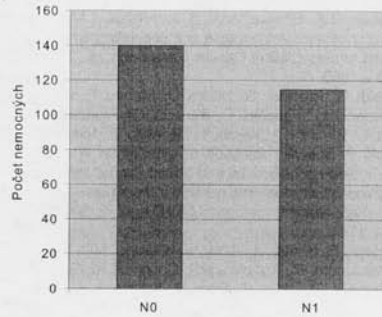
Literatura

1. Ashwort, T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death *Australian Med. J.*, 14,1869, p. 146
2. Bessa, X., Castells, A., Lacy, A.M., Elizalde, J.I., Delgado, S., Boix, L., Piñol, L., Pellise, M., Valdecasas, J.G.G., Pique, J.M. Laparoscopic-Assisted vs. Open colectomy for colorectal cancer: Influence on neoplastic cell mobilization *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2001, 5, 1.
3. Bessa, X., Piñol, V., Bel, S.C., Piazuelo, E.I., Lacy, A.M., Elizalde, J.I., Pique, J.M. and Castells, A. Prognostic value of postoperative detection of blood circulating tumor cells in patients with colorectal cancer operated on for cure *Annals of Surgery*, 237, 2003, 3, p. 368 – 375
4. Buxhofer, V., Ausch, C., Ogris, E., Schiesel, R., Hinterberger, W. Immunocytochemical and molecular detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in colorectal cancer *Article in German Acta Med. Austriaca Suppl.*, 59, 2002, p. 57 - 57
5. Campana, D. and Pui, C.H. Detection of minimal residual disease in acute leukemias: methodological advances and clinical significance *Blood*, 85, 1995, p. 1416 – 1434
6. Dandachi, N., Balic, M., Stanzer, S., Halm, M., Resel, M., Hinterleitner, T.A., Samonigg, H., Bauernhofer, T. Critical evaluation of real-time transcriptase-polymerase chain reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20mRNA in colorectal cancer patients. *J.Mo.Diagn.*, 7, 2005, 5, p. 631 – 637
7. Dieterle, C.P., Conzelmann, M., Linnemann, U., Berger, M.R. Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for K-ras mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.*, 10, 2004, 2, p. 641 – 650
8. Douard, R., Wind, P., Sales, J.P., Landi, B., Berger, A., Benichou, J., Gayral, F., Loric, S., Cugnenc, Ph. Long-term prognostic value of detection of circulating colorectal cancer cells using CGM2 reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Surgery*, 139, 2006, 4, p. 556 - 562
9. Erill, N., Colomer, A.S., Calvo, M., Vidal, A., Roman, R., Verdu, M., Cordon Cardo C, Puig, X. A novel multiplexing, polymerase chain reaction-based assay for the analysis of chromosome 18q status in colorectal cancer *J.Mol. Diagn.*, 7, 2005, 4, p. 478 - 485
10. Gerhard, M., Juhl, H., Kalthoff, H., Schreiber, H., W., Wagoner, C. and Neumaier, M. Specific detection of carci-

- noembryonic antigenexpressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.*, 12, 1994, p. 725 - 729
11. Ghossein, R.A., Bhattacharya, S. and Rosai, J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors *Clinical Cancer Research*, 5, 1999, p. 1950 - 1960
 12. Giribaldi, G., Procida, S., Ulliers, D., Mannu, F., Volpato, R., Mandili, G., Fanchini, L., Bertetto, O., Fronda, G., Simula, L., Rimini, E., Cherchi, G., Bonello, L., Maule, MM, Turri, F. Specific detection of cytokeratin 20-positive cells in blood of colorectal and breast cancer patients by a high sensitivity real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *J.Mol.Diagn.*, 8, 2006, 1, p. 105 - 112
 13. Guadagni F., Kantor, J., Aloe, S., Carone, MD, Spila, A., D'Alessandro, R., Abbolito, MR, Cosimelli, M, Graziano, F., Carboni, F., Carlini, S., Perri, P., Sciarretta, F., Greiner, W., Kashmini, SV., Steinberg, SM, Roselli, M., Schlom, J. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers *Cancer Res.*, 61, 2001, 2, p. 2523-2532
 14. Guller, U., Zajac, P., Schneider, A., Bosch, B., Vorburger, St., Zuber, M., Spagnoli, G.C., Oertli, D., Maurer, R., Metzger, U., Harder, F., Heberer, M., Marti, W.R. Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergo surgery for colorectal cancer *Ann. of Surgery*, 236, 2002, 6, p. 768 - 776
 15. Guo, J., Xiao, B., Jin, Z., Quin, L., Chen, J., Chen, H., Zhang, X., Liu, Z. Detection of cytokeratin 20mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by immunomagnetic bead enrichment and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction *J. Gastroenterol Hepatol.*, 20, 2005, 8, p. 1279 - 1284
 16. Hermanek, P., Hutter, R.V.P., Sobin, L.H., Wittekind, Ch. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis *Cancer*, 86, 1999, p. 12
 17. Chelly, J., Concordet JP., Kaplan JC, Kahn, A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 1989, p. 2617 - 2621
 18. Chen, Wei-Shone, Chung, Ming-Yi, Liu, Jin-Hwang, Liu, J.M., Lin, Jen-Kou, Impact of circulating free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during laparoscopic surgery *World J. Surg.*, 28,2004, p. 552 - 557
 19. Christopherson, W. Cancer cells in the peripheral blood a second look. *Acta Cytol.*, 9, 1965, p. 169 - 174
 20. Ito, S., Nakanishi, H., Hirai, T., Kato, T., Kodera, Y., Feng, Z., Kasa, Y., Ito, K., Akiyama, S., Nakao, A., Tatamatsu, M., Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a LightCycler. *Cancer Lett.*, 183, 2002, p. 195 - 203
 21. Johnson PWM, Burchill, SA., Selby, P.J., The molecular detection of circulating tumor cells. *Br. J. Cancer*, 72, 1995, p.268 - 276
 22. Von Knebel Doeberitz, M., Koch, M, Weit, J., Herfarth, CH. Diagnostik und bedeutung der „Minimal Residual Disease“ bei Patienten mit kolorektalem karzinom *Zentralbl. Chir.*, 125, 2000, suppl.1, s. 15 - 19
 23. Koch, M., Weitz, J., Kiele, P., Banner, A., Willeke, F., Lehnert, T., Herfarth, C., Von Knebel Doeberitz M. Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central, and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer. *Arch. Surg.*, 136, 2001, p. 85 - 9
 24. Kufer, P., Zippeliues, A., Lutterbüse, R., Mecklenburg, I., Enzmann, T., Montan, A., Weckermann, D., Passlick, B., Frang, N., Reichardt, P., Dugas, M., Köllermann, MW, Pantel, K., Riethmüller, G., Heteroneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of mikrometastatic disease. *Cancer Res*, 62, 2002, p. 251 - 61
 25. Redding, W.H., Coombes, R.C., Monaghan, p., Clink, H.M., Imrie, S. F., Dearnaley, D.P., Ormerod, M.G., Sioane, J.P., Gazet, J.C., Powles, T.J. and Munro Neville, A. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer *Lancet*, 2, 1983, p. 1271 - 1273
 26. Sadahiro, S., Suzuki, T., Ishikawa, K., Saguchi, T., Mada, Y., Yasuda, S., Makuuchi, H., Yurimoto, S. and Murayama, CH. Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA - expressing cells in portal and peripheral blood during surgery does not influence relapse in colorectal cancer *Annals of Surgical Oncology*, 12, 2005, p. 988 - 994
 27. Schiedeck, Th., Wellm, C., Roblick, UJ., Broll, R., Bruch, HP. Diagnosis and monitoring of colorectal cancer by L6 blood serum polymerase chain reaction is superior to carcinoembryonic antigen-enzyme-linked immunosorbent assay. *Dis Colon Rektum*, 46, 2003, 6, p. 818 - 825
 28. Schuster, R., Max, N., Mann, B., Heufelder, K., Thilo, F., Gröne, J., Rokos, R. Buhr, H.J., Thiel and U. Keilholz, E. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int.J.Cancer*, 108, 2004, p. 219 - 227
 29. Stahel, R.A., Mabry, M., Skarkin, A.T., Speak, J. and Bernal, S.D. Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody. *J.Clin. Oncol.*, 3, 1985, p. 455 - 456
 30. Tsavellas, G., Patel, H. and Allen-Mersh, T.G. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 88, 2001, p. 1307 - 1320
 31. Wang, Jaw-Yuan, Wu, Chan-Han, Lu, Chien-Yu, Hsieh, Jan-Sing Wu, Deng-Chyang, Huang, Sung-Yu, Lin, Shiu-Ru. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis *World J.Surg.*, 30, 2006, p. 1007 - 1013
 32. Wong, IH, Yeo, W., Chan, AT., Johnson, PJ. Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for cytokeratin 19mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Dukes stage, serum carcinoembryonic antigen level and tumor progression *Cancer Lett.*, 162, 2001, 1, p. 65 - 73
 33. Yamaguchi, K., Takagi, Y., Aoki, S., Futamura, M., Saji, S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection *Ann. Surg.*, 232, 2000, 1, p. 58 - 65
 34. Yokoyama, S., Yamaue, H. Prediction of distant metastasis by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction for epithelial and variant CD 44mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer. *Arch. Surg.*, 137, 2002, 9, p. 1069 - 1073

Tab.1: Soubor nemocných vyšetřených na MRD (3/2004 – 7/2006)

	Pocet pacientu	Pocet vzorku
Resekce střeva pro kolorektální karcinom	255	1582
Léčba jaterních metastáz	36	158
Celkem	281	1740

Graf 1: Rozsah nádoru a hloubka invaze tumoru (T-staging) - soubor nemocných vyšetřených na MRD (3/2004 – 7/2006, n=255 nemocných)**Graf 2:** Histologický grading tumoru - soubor nemocných vyšetřených na MRD (3/2004 – 7/2006, n=255 nemocných)**Graf 3:** Lokalizace tumoru - soubor nemocných vyšetřených na MRD (3/2004 – 7/2006, n=255 nemocných)**Graf 4:** Nádorové postižení lymfatických uzlin - soubor nemocných vyšetřených na MRD (3/2004 – 7/2006, n=255 nemocných)**Tab.2:** Základní údaje z publikací o MRD u kolorektálního karcinomu z let 1995-2006

Detekce MRD metodou RT-PCR u kolorektálního karcinomu	1995 – 2000		2001 – 2006	
	Pocet publikací	1995 – 2000	Pocet publikací	2001 – 2006
Pocet publikací	27		24	
Použitý marker				
cytokeratin	18		8	
CEA	9		8	
jiný			7	
Průměrný počet vyšetřených nemocných	37 (5 – 103)		67 (18 – 199)	
Podíl MRD u sledovaných průměr	13 – 100% 48,8%		7 – 86% 51%	
Doba sledování neuváděno	12 – 28 měsíců 18 prací		28 – 59 měsíců 15 prací	
Vliv na prognózu nepřiznivý	6		5	
nehodnoceno či neprukazný	21		19	

Zpracováno dle: *British Journal of Surgery*, 88, 2001, 1307 – 1320(cit.30) (1995-2000)

MEDLINE a vlastní rešerše literatury (2001-2006)

Adresa:
Prof. MUDr. Miloslav Duda, DrSc.
II. chirurgická klinika LF UP a FN
Olomouc, ČR

2.3.4.4 Minimální reziduální choroba u pacientů s kolorektálním karcinomem – analýza přežití

Do studie analyzující prognostickou hodnotu přítomnosti MRD u kolorektálního karcinomu bylo zahrnuto celkem 182 pacientů (111 mužů a 68 žen) průměrného věku 64,5 let (46 – 81, 95% CI) (Tab. 10). Žádný pacient z našeho souboru neobdržel neoadjuvantní chemoradioterapii, všechny nádory byly histologicky verifikovány s nálezem invazivního adenokarcinomu ve všech případech. Medián počtu vyšetřených lymfatických uzlin byl 13 (rozmezí 0-50). Všech 182 pacientů bylo dispenzarizováno a léčeno dle standardních léčebných protokolů. V době provedení statistické analýzy přežití měli pacienti za sebou onkologickou kontrolu ne starší než jeden rok. Průměrná doba sledování v našem souboru byla 21,7 měsíce. Všech 147 pacientů stádia I-III podstoupilo chirurgický zákrok s kurativním záměrem (R0 resekce), žádný z pacientů nezemřel do 30 dnů po operaci.

Tab. 10 Charakteristika souboru pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku

	n	Pohlaví		Průměrný věk (95% CI)	Průměrná doba sledování (měsíce) (95% CI) p<0,000001	Průměrný DFS (měsíce) (95% CI) p<0,000001	Grading			Diagnóza		S_CEA	S_CA 19-9
		ženy / muži						1	2	3	Karcinom tlustého střeva		
Klinické stádium	1	41	19/22	65.4 (62,0; 68,8)	22.2 (17,8; 26,6)	21.0 (16,7; 25,23)	7	23	3	22	19	8 /40 (20,0)	7/28 (25,0)
	2	59	22/37	63.0 (60,2; 65,8)	20.4 (16,9; 24)	19.0 (15,5; 22,4)	4	33	10	40	19	16/51 (31,4)	14/47 (29,8)
	3	47	12/35	64.9 (61,8; 68,1)	27.0 (23,1; 31)	24.6 (20,8; 28,5)	4	26	7	32	15	9/41 (22,0)	6/35 (17,1)
	4	32	15/17	66.4 (61,9; 69,4)	15.3 (10,3; 20,4)	12.1 (7,0; 16,8)	4	13	4	27	5	7/25 (28,0)	5/24 (20,8)
Celkem	182	68/111	64.5 (46; 81)	21.7 (19,6; 23,8)	19.7 (17,6; 21,8)	19	95	24	121	58	157	134	

Peroperační pozitivita MRD za použití CEA byla zjištěna alespoň v jednom z vyšetřovaných kompartmentů u 29,7% pacientů stádia I-IV (9,9% v periferní krvi, 23,6% v kostní dřeni). Při použití CK20 byla detekována přítomnost MRD v alespoň jednom kompartmentu u 30,7% pacientů (28,6% v periferní krvi, 9,9% v kostní dřeni). MRD pozitivita alespoň jednoho markeru (CEA nebo CK20) v krvi anebo kostní dřeni byla detekována u 49,5% pacientů v den operace (33,5% v periferní krvi, 31,9% v kostní dřeni).

Pozitivita MRD v kontrolních vzorcích jeden měsíc po resekci tumoru byla za použití CEA nalezena u 16,4% pacientů (7,8% v periferní krvi, 13,4% v kostní dřeni). Při použití CK 20 byla zjištěna MRD pozitivita v kontrolních vzorcích u 40,2% pacientů (34,1% v periferní krvi, 21,8% v kostní dřeni). MRD pozitivita alespoň jednoho markeru (CEA nebo CK20) v krvi nebo kostní dřeni byla nalezena u 46,6% pacientů jeden měsíc po operaci (33,6% v periferní krvi, 31,8% v kostní dřeni). MRD pozitivita v jednotlivých klinických stádiích je uvedena v Tab. 11.

Nebyla prokázána žádná statisticky významná tendence mezi vzrůstající MRD pozitivitou a klinickým stádiem onemocnění.

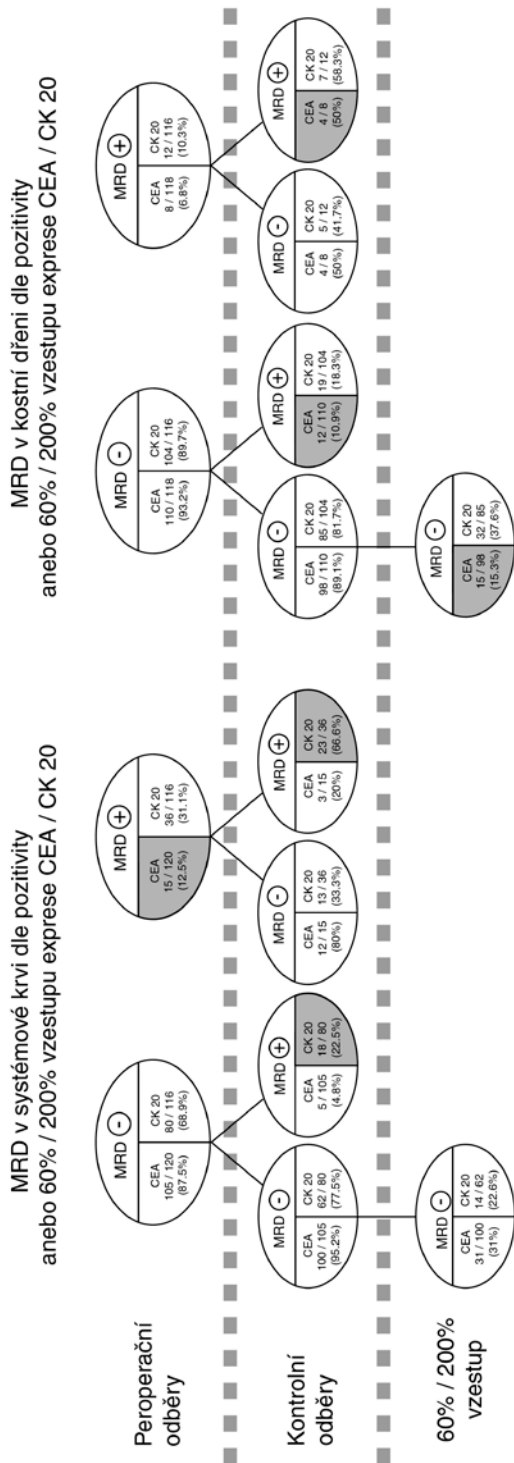
Tab. 11. Zastoupení MRD pozitivních nálezů v periferní krvi a kostní dřeni pacientů s kolorektálním karcinomem (všechna klinická stádia) rozdělených dle jednotlivých klinicko-patologických parametrů.

		CEA (pozitivní /celkem (%))				CK20 (pozitivní /celkem (%))			
		Systémová krev peroperační	Systémová krev 1 měsíc po operaci	Kostní dřeň peroperační	Kostní dřeň 1 měsíc po operaci	Systémová krev peroperační	Systémová krev 1 měsíc po operaci	Kostní dřeň peroperační	Kostní dřeň 1 měsíc po operaci
Klinické stádium	1	*					**		**
	2	5/41 (12,20)	4/31 (12,90)	10/41 (24,39)	4/31 (12,90)	13/41 (31,71)	18/29 (62,07)	3/41 (7,32)	12/29 (41,38)
	3	2/59 (3,39)	2/49 (4,08)	15/59 (25,42)	5/47 (10,64)	15/59 (25,42)	8/47 (17,02)	5/59 (8,48)	2/47 (4,26)
	4	9/47 (19,15)	2/40 (5,00)	11/47 (23,47)	7/40 (17,50)	14/47 (29,79)	15/40 (37,50)	7/47 (14,89)	12/40 (30,00)
T	1	1/33 (3,03)	2/17 (11,77)	7/33 (21,21)	2/16 (12,50)	9/33 (27,27)	3/15 (20,00)	3/33 (9,09)	3/16 (18,75)
	2	**					**		*
	3	4/13 (30,77)	0/7 (0,00)	4/13 (30,77)	1/7 (14,29)	5/13 (38,46)	5/8 (62,50)	1/13 (7,69)	2/8 (25,00)
	4	3/37 (8,11)	5/32 (15,63)	12/37 (32,43)	5/32 (15,63)	11/37 (29,72)	16/30 (53,33)	4/37 (10,81)	12/30 (40,00)
N	0	7/109 (3,67)	5/90 (5,56)	22/99 (20,95)	12/87 (13,79)	30/109 (27,52)	21/87 (24,13)	13/109 (11,93)	12/87 (13,79)
	1	3/8 (37,50)	0/6 (0,00)	1/8 (12,50)	0/6 (0,00)	3/8 (37,50)	3/5 (60)	0/8 (0,00)	2/6 (33,33)
Objem tumoru	<5cm ³	*							
	5-100cm ³	6/101 (5,94)	6/81 (7,41)	24/101 (23,76)	9/79 (11,39)	28/101 (27,72)	26/77 (33,77)	9/101 (8,91)	13/77 (16,88)
	>100cm ³	10/66 (15,15)	4/54 (7,41)	16/66 (24,24)	9/53 (16,98)	20/66 (30,30)	18/52 (34,62)	9/66 (13,63)	15/53 (28,30)
S_CEA	Pozitivní	2/18 (11,11)	2/16 (12,50)	2/18 (11,11)	0/15 (0,00)	3/18 (16,67)	7/14 (50,00)	1/18 (5,55)	6/14 (42,86)
	Negativní	10/99 (10,10)	6/81 (7,41)	24/99 (24,24)	14/77 (17,72)	33/99 (33,33)	25/79 (31,65)	13/99 (13,13)	14/79 (17,72)
S_CA 19-9	Pozitivní	0/12 (0,00)	0/10 (0,00)	5/13 (41,67)	1/10 (10,00)	1/12 (8,33)	1/9 (11,11)	1/12 (8,33)	1/9 (11,11)
	Negativní	1/32 (3,13)	0/27 (0)	5/32 (15,63)	3/26 (11,54)	7/32 (21,88)	5/26 (19,23)	11/32 (34,38)	8/26 (30,77)
S_CA 19-9	Pozitivní	13/91 (14,29)	4/76 (5,26)	23/91 (25,28)	8/75 (10,67)	27/91 (29,67)	13/73 (17,81)	44/91 (48,35)	13/73 (17,81)
	Negativní	2/26 (7,69)	1/24 (4,17)	5/26 (19,23)	4/23 (17,39)	8/26 (30,77)	5/23 (21,74)	15/26 (57,70)	6/23 (26,09)
S_CA 19-9	Pozitivní	11/86 (12,79)	3/73 (4,11)	22/86 (25,58)	7/72 (9,72)	25/86 (29,07)	13/70 (18,57)	37/86 (43,02)	14/70 (20,00)
	Negativní								
		* p<0,05							
		** p<0,01							

Při hodnocení přítomnosti MRD jako nezávislého prognostického faktoru byla porovnána MRD pozitivita v krvi a kostní dřeni v den operace a jeden měsíc po výkonu s klasickými prognostickými faktory (TNM stádium, invazivita, postižení lymfatických uzlin, velikost tumoru, sérové hladiny onkomarkerů CEA a CA 19-9). Nebyly však prokázány žádné statisticky významné rozdíly (Tab. 11). Přítomnost MRD také nesouvisí s pohlavím, lokalizací nádoru a gradíngem (Tab. 10). Byly nalezeny pouze jednotlivé rozdíly v analyzovaných

skupinách, avšak bez statisticky významného zvyšujícího se trendu vzhledem k hodnoceným parametrům. Dle našich výsledků je přítomnost MRD nezávislá na dalších klinicko-laboratorních charakteristikách nemoci.

V naší studii byla provedena analýza sérových hladin CEA a CA 19-9, a to jak předoperačních, tak kontrolních jeden měsíc po výkonu. Jako pozitivní byly hodnoceny hladiny vyšší než 5 μ g/l u CEA a 37 kU/l u CA 19-9. Stratifikace předoperačních pozitivních nálezů v jednotlivých klinických stádiích je uvedena v Tab. 10. Byla provedena korelační analýza mezi přítomností MRD v jednotlivých kompartmentech za použití CEA i CK20 a mezi hladinou či pozitivitou sérových onkomarkerů, a to jak peroperačních, tak kontrolních hodnot. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné souvislosti mezi přítomností MRD a sérovými onkomarkery CEA a CA 19-9 (Tab. 11).

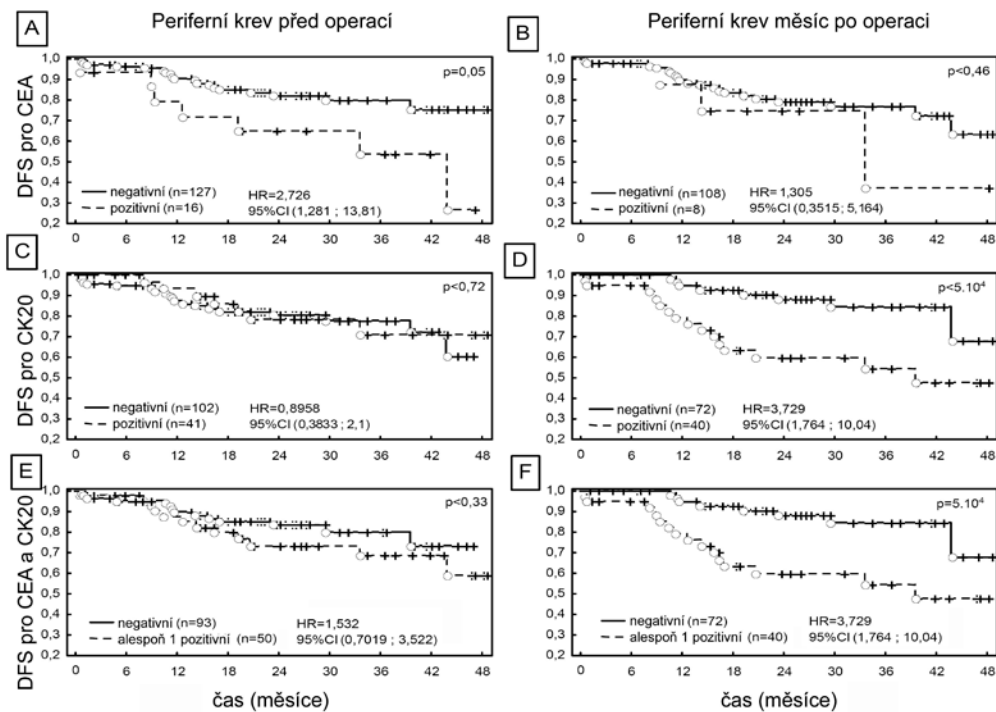


Obr. 9.

Schéma studie detekce MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem

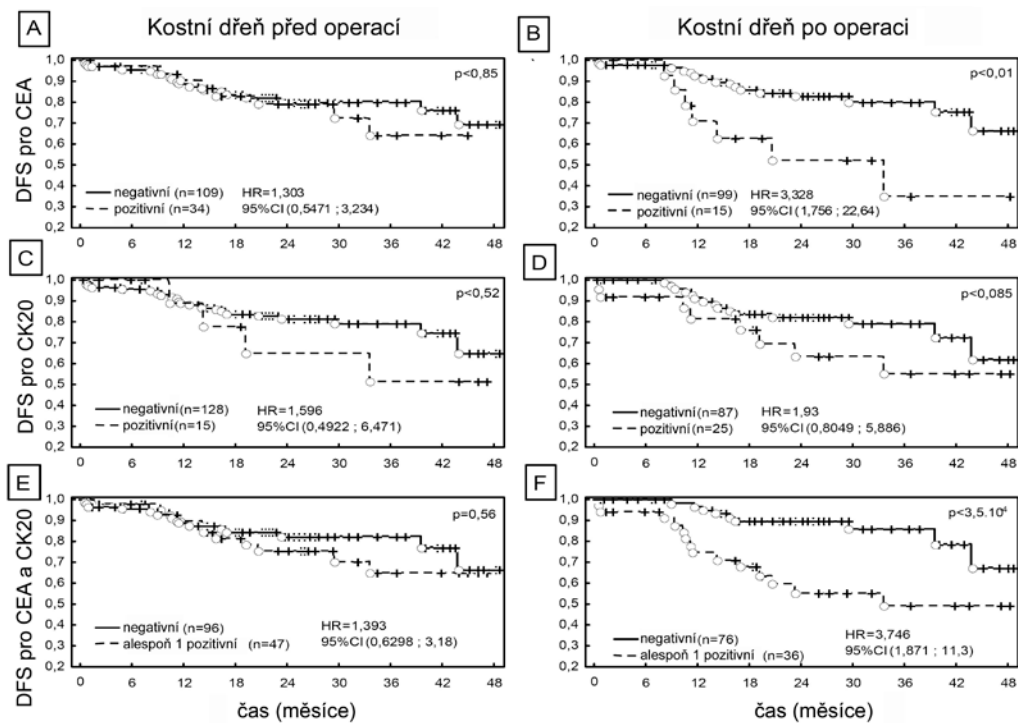
Do analýzy přežití bez známek onemocnění (disease-free survival, DFS) bylo zahrnuto celkem 147 pacientů I.-III. klinického stádia kolorektálního karcinomu, kteří podstoupili radikální operaci s kurativním záměrem (R0 resekce). Charakteristika souboru viz Tab. 10. Prognostický význam MRD byl hodnocen dle QRT-PCR pozitivitu CEA a CK20 v krvi a kostní dřeni, v den operace a jeden měsíc po operaci. DFS analýzy byly provedeny také pro kombinace obou markerů a také dle dynamiky exprese CEA a CK20 mezi peroperačním a kontrolním vzorkem. Byla provedena též analýza celkového přežití (overall survival, OS), avšak žádné významné výsledky vzhledem ke krátké době sledování nebyly nalezeny (data nejsou zobrazena). Celkem u 24 ze 141 (17%) pacientů I.-III. stádia kolorektálního karcinomu se během doby sledování objevila recidiva nádorového onemocnění. Průměrná doba sledování byla 22,9 měsíců. Co se týče lokalizace primárního tumoru, nebyly nalezeny žádné rozdíly v DFS a OS mezi pacienty s rakovinou tlustého střeva anebo konečníku.

DFS analýza pacientů rozdělených dle přítomnosti MRD v peroperačním a kontrolním vzorku periferní krve za použití CEA a CK20 jako markerů nádorových buněk přinesla několik zajímavých zjištění (Obr. 10). Pacienti s pozitivitou MRD v peroperačním vzorku krve za použití CEA (Obr. 10A) a v kontrolním vzorku měsíc po operaci za pomocí CK20 (Obr. 10D) měli statisticky významně kratší DFS ($p = 0,05$, resp. $p = 0,0005$) a vyšší riziko vzniku recidivy onemocnění (HR = 2,726, resp. HR = 3,729).



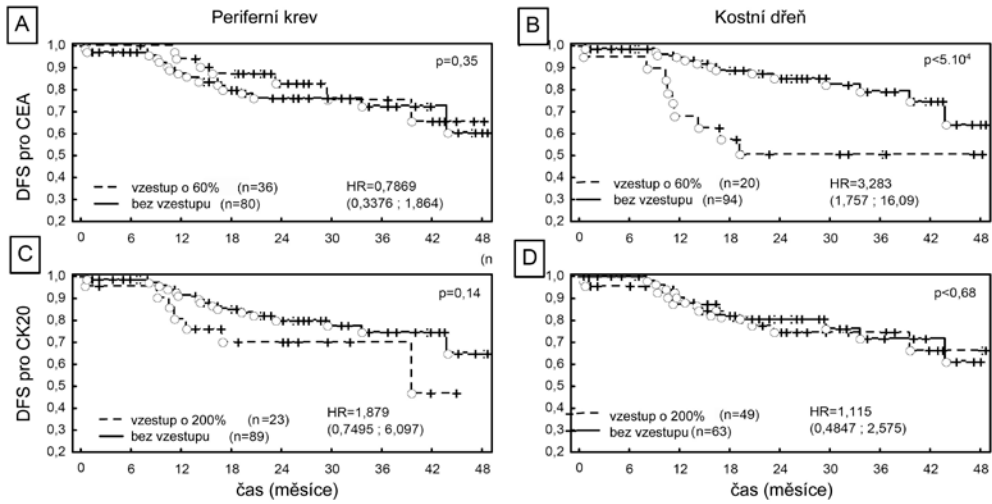
Obr. 10 DFS analýza pacientů s kolorektálním karcinomem dle positivity MRD v perooperačním a kontrolním vzorku systémové krve

Obdobná analýza hodnotila vztah mezi DFS a přítomností MRD v perooperačním a kontrolním vzorku kostní dřeně měsíc po operaci za použití CEA a CK20. Bylo zjištěno, že pacienti s přítomností MRD ve vzorku kostní dřeně jeden měsíc po operaci za použití CEA (Obr. 11B) a za použití kombinace CEA a CK20 (Obr. 11F) měli statisticky významně kratší DFS ($p = 0,01$, resp. $p = 0,00035$) a vyšší riziko vzniku recidivy onemocnění ($HR = 3,328$, resp. $HR = 3,746$), než pacienti bez přítomnosti MRD v kostní dřeni.



Obr. 11 DFS analýza pacientů s kolorektálním karcinomem dle positivity MRD v perooperačním a kontrolním vzorku kostní dřeně odebraném měsíc po operaci

Dalším cílem bylo zhodnotit dynamiku exprese jednotlivých markerů. Porovnávala se exprese CEA a CK20 v krvi a kostní dřeni v den operace a měsíc po výkonu. Podařilo se identifikovat skupinu pacientů, u nichž jak v perooperačních, tak v kontrolních vzorcích nedosahovaly exprese markerů cut-off hodnot, ale přesto u nich došlo k min. 60% nárůstu exprese CEA v kostní dřeni. Tito pacienti měli rovněž statisticky významně kratší DFS ($p = 0,0005$) a vyšší riziko vzniku recidivy onemocnění ($HR = 3,283$), než pacienti bez nárůstu exprese CEA nad 60% (Obr. 12B). Pro CK20 se nám podobné souvislosti odhalit nepodařilo (měřeno vzestupem exprese o 200%).



Obr. 12 DFS analýza pacientů s kolorektálním karcinomem dle dynamiky MRD ve vzorcích systémové krve a kostní dřeně

2.3.4.5 Komentované výsledky

V naší studii byla pro detekci MRD u solidních tumorů pro svou vyjímečnou senzitivitu vybrána metoda QRT-PCR a dle obecně platných pravidel byly navrženy primery a sondy pro stanovení absolutní genové exprese vybraných markerů nádorových buněk. Význam přítomnosti MRD u pacientů se solidními tumory byl sledován na souboru pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem prsu. Pro detekci MRD u pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku byly jako markery nádorových buněk vybrány CEA a CK 20. Pro detekci mikrometastáz v sentinelových uzlinách u pacientek s karcinomem prsu byly jako markery použity MGB1 a CEA.

V naší studii, zabývající se MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem, byla metodou QRT-PCR stanovována absolutní genová exprese CEA a CK20 v krvi a kostní dřeni. Jednou z mnoha vlastností solidních nádorů je jejich heterogenita a genetická nestabilita, taktéž cirkulující okultní nádorové buňky jsou z genetického pohledu heterogenní skupinou (Klein et al., 2002). Nalezení vhodného, dostatečně senzitivního i specifického markeru cirkulujících nádorových buněk je tedy velmi obtížné. V současnosti jsou pro detekci MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem, vzhledem k vysoké expresi v primárním tumoru a nízké expresi v krvi a kostní dřeni, doporučovány jako markery CEA a CK20 (Yamaguchi et al., 2000; Ito et al., 2002; Patel et al., 2002; Tsouma et al., 2008). Použití multimarkerové analýzy je také spolehlivější než analýzy MRD založené na jediném markeru (Racila et al., 1998; Conzelmann et al., 2005). Kvantitativní stanovení genové exprese markerů MRD umožňuje určit cut-off hodnoty s rozlišením mezi fyziologickým a patologickým stavem. Následně umožňuje posoudit změny v přítomnosti cirkulujících nádorových buněk během dispenzarizace pacienta. Cut-off hodnoty byly v naší studii stanoveny na základě analýzy exprese jednotlivých markerů v kontrolní skupině zdravých dárců krve.

Design naší studie již od počátku počítal se sledováním dynamiky exprese markerů, proto byly vzorky periferní krve a kostní dřene vyšetřovány jak peroperačně, tak jeden měsíc po operaci před zahájením případné adjuvantní chemoterapie. V několika recentních studiích byla u pacientů s kolorektálním karcinomem prokázána vyšší prognostická hodnota přítomnosti cirkulujících nádorových buněk v kontrolních, pooperačních vzorcích periferní krve, než ve vzorcích peroperačních (Sadahiro et al., 2007; Allen-Mersch et al., 2007). Načasování odběru vzorků krve se tedy zdá být rozhodující pro odhad významu přítomnosti MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem. Ukazuje se, že nádorové buňky uvolněné do krevního řečiště během operace pravděpodobně nemají významný metastatický potenciál (Yamaguchi et al., 2000). V naší studii jsme zjistili statisticky významně kratší DFS u pacientů s přítomností MRD v peroperačním vzorku

periferní krve za použití CEA a v kontrolním vzorku krve jeden měsíc po operaci za použití CK20 ($p = 0,05$, resp. $p = 0,0005$) (Obr. 10).

Dosud nebyly publikovány žádné studie o riziku vzniku recidivy nádorového onemocnění ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem a negativitou QRT-PCR vyšetření na přítomnost MRD. Díky designu naší studie jsme mohli porovnat dynamiku exprese CEA a CK20 v krvi a kostní dřeni mezi peroperačními a kontrolními vzorky. Zajímala nás skupina pacientů, u nichž QRT-PCR vyšetření neprokazovalo přítomnost MRD ani v peroperačních, tak v kontrolních vzorcích. Bylo zjištěno, že již 60% zvýšení exprese CEA v kostní dřeni, které však nedosahuje cut-off hodnot pro pozitivitu MRD, rovněž identifikuje statisticky významně pacienty s kratším DFS ($p = 0.005$) a vyšším rizikem vzniku recidivy ($HR=3,283$) (Obr. 12). Vzhledem k interindividuální variabilitě v expresi jednotlivých markerů lze předpokládat, že tito pacienti mají již primárně velmi nízkou cut-off hodnotu exprese CEA. Výsledky naší studie ukazují, že nejenom MRD pozitivita, ale také dynamika exprese markerů může identifikovat rizikové pacienty.

Vyšetření kostní dřene není obvyklým vyšetřením při diagnostice nádorových onemocnění, s výjimkou hematologických malignit. Jen několik málo publikovaných prací se zabývalo vyšetřením kostní dřene u pacientů s kolorektálním karcinomem pomocí vysoce citlivých molekulárně biologických metod založených na PCR. Byla prokázána špatná prognóza pacientů s CK 20 pozitivitou kostní dřene (Soeth et al., 1997; Wolfrum et al., 2005; Koch et al., 2006). Žádná studie se však nezabývala prognostickou hodnotou přítomnosti MRD v kostní dřeni na základě CEA positivity. Nicméně výsledky naší studie naznačují, že vyšetření kostní dřene u pacientů s kolorektálním karcinomem je užitečné pro zjištění mikrometastáz. Dle našich zjištění, měli pacienti s CEA pozitivitou v kontrolním vzorku kostní dřene statisticky významně kratší DFS a téměř 4x vyšší riziko recidivy onemocnění (Obr. 11). V případě kombinace CEA s CK20 byla statistická významnost ještě vyšší. Aspirace kostní dřene sice není příjemným vyšetřením pro pacienty, avšak kostní dřeň je jedinečným prostorem pro nádorové buňky umožňující přesnější diagnostiku pokročilosti nádorového onemocnění zejména v kontextu hematogenní diseminace. Co se týče závislosti mezi přítomností klinicko-patologických charakteristik onemocnění a přítomností MRD zjištěné na základě QRT-PCR vyšetření pro CEA a CK20, nebylo publikováno mnoho prací. V některých studiích korelovala přítomnost MRD s klinickým stádiem (Guadagni et al., 2001; Miura et al., 2003; Iinuma et al., 2006; Zhang et al., 2005; Soeth et al., 1997), se sérovou hladinou onkomarkeru CEA (Silva et al., 2002; Piva et al., 2000) nebo s postižením lymfatických uzlin (Katsumata et al., 2003; Piva et al., 2000). Avšak v některých studiích nebyla zjištěna žádná souvislost mezi přítomností MRD a klasickými prognostickými faktory (Koch et al., 2006; Schuster et al., 2004). Nutno

podotknout, že výsledky všech publikovaných studií jsou velmi heterogenní. V naší studii jsme korelovali jak absolutní genovou expresi, tak MRD pozitivitu, se všemi klinicko-patologickými charakteristikami onemocnění (klinické stádium, TNM klasifikace, grading, velikost primárního tumoru, sérové hladiny CEA a CA 19-9), avšak nenalezli jsme žádné statisticky významné souvislosti. V souladu s recentně publikovanými studiemi (Uen et al., 2008; Koch et al., 2006) předpokládáme, že přítomnost MRD je nezávislým prognostickým faktorem u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Další část předkládané dizertační práce se zabývá mikrometastatickým postižením sentinelových lymfatických u pacientek s karcinomem prsu. Správný staging nádorového onemocnění je nezbytným podkladem pro stanovení prognózy a terapie. V případě karcinomu prsu je pro staging důležité vyšetření axilárních lymfatických uzlin. Exenterace axily je však zatížena nemalou morbiditou, zejména vznikem lymfedému. Vyšetřením sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu je možno se v případě nepřítomnosti metastáz vyhnout následné exenteraci axily. Postižení sentinelové uzliny totiž se značnou senzitivitou a specificitou predikuje postižení axilárních uzlin. V současnosti však probíhají četné diskuse, jak postupovat v případě pozitivního nálezu v sentinelové uzlině (Alran et al., 2007; Van Zee et al., 2003). Zda-li provést následnou exenteraci či nikoliv. Jisté však je, že pozitivita sentinelové lymfatické uzliny řadí onemocnění do vyššího klinického stádia s potřebou adjuvantní chemoterapie. Bohužel, u třetiny až poloviny pacientek s karcinomem prsu klinického stádia I-II a bez postižení lymfatických uzlin dochází k recidivě onemocnění. V předkládané práci jsme se zabývali přítomností mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu. Metodou QRT-PCR pro CEA, MGB1 a CK19 jsme detekovali přítomnost mikrometastáz u 59% pacientek (26/44), histopatologicky bylo detekováno metastatické postižení pouze u 32% pacientek (13/41). V souboru 28 pacientek s histopatologicky negativními sentinelovými uzlinami jsme metodou QRT-PCR detekovali mikrometastické postižení u 10 pacientek (36%). Gillanders a kol. (2004) publikoval obdobné výsledky, kdy za použití QRT-PCR pro CEA, MGB1 a PIP (prolaktin indukující protein) prokázal přítomnost mikrometastáz u 33% (112/344) pacientek s primárně histopatologicky negativními uzlinami. Jiná studie prokázala QRT-PCR pozitivitu u 40% (40/102) histopatologicky negativních sentinelových uzlin (Trudeau et al., 1999). QRT-PCR metodika díky své citlivosti umožňuje tedy identifikovat 30-40% pacientek s primárně histologicky negativními uzlinami, avšak s přítomností mikrometastáz, které jsou pod detekční mezí klasických histopatologických metod. Nebyly dosud publikovány žádné práce, které by se zabývaly prognostickou hodnotou mikrometastáz v sentinelových uzlinách zjištěnými metodou QRT-

PCR. V naší studii jsme prokázali trend ke kratšímu DFS u pacientek s karcinomem prsu stádia pT1-2M0M0 a QRT-PCR pozitivitou sentinelové uzliny, než u pacientek QRT-PCR negativních (Obr. 8). Zjištění zatím nedosáhlo statistické významnosti ($p=0,16$), což může být způsobeno zejména malým počtem zařazených pacientek a také poměrně krátkou dobou sledování (25,1 měsíců).

2.3.5 Použití markerů minimální reziduální choroby k objasnění mechanismu účinku protinádorových léčiv

4-arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazol CDK inhibitory: SAR studie, krystalová struktura v komplexu s CDK2, selektivita a buněčné účinky

4-Arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK Inhibitors: SAR Study, Crystal Structure in Complex with CDK2, Selectivity, and Cellular Effects[‡]

Vladimír Kryštof,[‡] Petr Cankar,[§] Iveta Fryšová,[§] Jan Slouka,[§] George Kontopidis,^{||,1} Petr Džubák,[#] Marián Hajdúch,[#] Josef Srovnal,[#] Walter F. de Azevedo Jr.,[⊙] Martin Orság,[‡] Martina Paprskářová,[‡] Jakub Rolčík,[‡] Aleš Látr,[‡] Peter M. Fischer,^{||,⊙} and Miroslav Strnad^{*,‡}

Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, tř. Svobody 8, 772 00 Olomouc, Czech Republic, Structure Based Design Group, Cyclacel Pharmaceuticals, Incorporated, James Lindsay Place, Dundee, DD1 5JJ, Scotland, United Kingdom, Laboratory of Experimental Medicine, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Palacký University and Faculty Hospital, Puškinova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic, and Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

Received May 15, 2006

In a routine screening of our small-molecule compound collection we recently identified 4-arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazoles as a novel group of ATP antagonists with moderate potency against CDK2-cyclin E. A preliminary SAR study based on 35 analogues suggests ways in which the pharmacophore could be further optimized, for example, via substitutions in the 4-aryl ring. Enzyme kinetics studies with the lead compound and X-ray crystallography of an inhibitor–CDK2 complex demonstrated that its mode of inhibition is competitive. Functional kinase assays confirmed the selectivity toward CDKs, with a preference for CDK9-cyclin T1. The most potent inhibitor, 4-[(3,5-diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazanyl]phenol **31b** (CAN508), reduced the frequency of S-phase cells of the cancer cell line HT-29 in antiproliferation assays. Further observed cellular effects included decreased phosphorylation of the retinoblastoma protein and the C-terminal domain of RNA polymerase II, inhibition of mRNA synthesis, and induction of the tumor suppressor protein p53, all of which are consistent with inhibition of CDK9.

Introduction

The cyclin-dependent kinases (CDKs^s) are a family of serine/threonine protein kinases that play essential roles in the regulation of cell division. Individual CDKs phosphorylate distinct substrates in different phases of the cell cycle and are, therefore, classified as G1 (CDK4 and CDK6-D cyclins, CDK2-cyclin E), S (CDK2-cyclin A, CDK1-cyclin A), and G2/M (CDK1-cyclin B) phase-specific CDKs.^{1,2} The activity of these kinases is tightly regulated at several levels: through interactions with negative and positive regulatory partners, activation by phosphorylation or dephosphorylation, and shifts in their subcellular localization. Cell cycle deregulation is frequently accompanied by altered CDK activity in many cancers, caused either by changed expression or activation of CDKs and/or their interacting proteins. For these reasons, cell cycle CDKs, especially CDK2 and CDK4, have been actively pursued as pharmacological targets for novel anticancer agents.^{3–6}

During the past decade various drug discovery programs have led to the identification of many potent and selective ATP-antagonist inhibitors of CDKs, despite the fact that the active site in protein kinases is highly conserved (reviewed recently in refs 7–9). Generally, such inhibitors consist of structurally distinct, flat heterocyclic molecules, which enter the active site and compete with ATP, a feature usually demonstrated by enzyme kinetics and inhibitor-CDK2 cocrystal analyses. Anti-CDK drugs possess prominent inhibitory properties against cancer cells both in vitro and in vivo, and several are currently being evaluated in clinical trials as a new generation of anticancer chemotherapeutics.^{10,11}

Apart from roles in cell cycle regulation, several CDKs also participate in other physiological processes such as neuronal functions (CDK5, CDK11), apoptosis (CDK1, CDK5), and transcription (CDK2, CDK7, CDK8, CDK9, CDK11); these processes have also been shown to be affected by pharmacological inhibitors of CDKs.^{6,12} In particular, CDKs implicated in the regulation of transcription at the level of RNA polymerase II (RNAP-II) have recently attracted interest among medicinal chemists because of the roles of these CDKs during viral infection.^{13,14} Small DNA viruses rely on host cell CDKs for their replication; some require the host expression apparatus, while others encode their own cyclins, which activate cellular CDKs or contain proteins that directly recruit CDKs to the nascent viral transcripts.¹³ Some CDK inhibitors, such as flavopiridol and roscovitine, have already been shown to interfere with the replication of several viruses, and this activity is attributed to inhibition of transcription.^{15–18}

These transcriptional CDK inhibitors may also have oncological applications. Until recently, the antiproliferative effects of CDK inhibitors (which are mainly oligospecific) against tumor cells were thought to be due to cellular attenuation of

* Corresponding author. Tel.: +420 585 634 850. Fax: +420 585 634 870. E-mail: strnad@zix.upol.cz

[‡] The structure has been deposited with the Protein Data Bank (PDB) under the accession code 2CLX.

[§] Palacký University and Institute of Experimental Botany.

^{||} Palacký University.

[⊙] Cyclacel Pharmaceuticals, Inc.

¹ Current address: Veterinary Faculty, University of Thessaly, P. O. Box 199, 43100 Karditsa, Greece.

[#] Palacký University and Faculty Hospital.

[⊙] Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

[⊙] Current address: Centre for Biomolecular Sciences, School of Pharmacy, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG7 2RD, U.K.

[‡] Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinase; RNAP–II, RNA polymerase II; CTD, C-terminal domain; DRB, 5,6-dichloro-1-(β)-D-ribofuranosylbenzimidazole; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CEA, carcinoembryonic antigen; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

CDK2 activity.¹⁹ However, recent target validation studies have shown that CDK2 knockout mice are fully viable and, even, that cancer cells can proliferate in the absence of CDK2.^{20,21} The exact reasons for the undoubted antitumor activity, both in vitro and in vivo, of many CDK inhibitors remain unclear, but probably more than one CDK must be targeted at the same time to achieve an antiproliferative effect. In particular, inhibition of the CDKs that mediate phosphorylation of the C-terminal domain (CTD) of RNAP-II is thought to contribute markedly to the cytotoxic potency of such compounds, as shown for instance with flavopiridol and roscovitine.^{22–25} A rapid decline in levels of key proteins, due to inhibition of transcription, may be the ultimate cause of the cytotoxicity of pharmacological inhibitors of CDKs, especially when both the affected protein and the corresponding mRNA have short half-lives. One such gene product is the antiapoptotic factor Mcl-1, which is crucial for the survival of a range of cell types. Its down-regulation either by roscovitine or siRNA is sufficient to induce apoptosis.^{26,27} More particularly, selective CDK9 inhibition could serve as a potential therapeutic strategy against tumor invasion and metastasis, as recently demonstrated by the finding that inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α promotes tumor progression through activation of matrix metalloproteinases.²⁸

During the course of our ongoing CDK inhibitor discovery and development program, we have already identified several series of structurally diverse compounds that possess the ability to block CDK phosphorylating activities.^{29–34} More recently, we discovered that the screening hit 4-phenylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazole compound **1b** inhibits CDK2-cyclin E. Although this inhibition is comparatively weak, the simple two-step synthetic assembly of the 4-phenylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazole system prompted us to develop a novel group of protein kinase inhibitors. We thus went on to synthesize a group of 35 3,5-diamino-1*H*-pyrazole derivatives substituted with different arylazo groups at position 4, to analyze their structure–activity relationships and to determine the in vitro antiproliferative properties of these compounds against cancer cell lines.

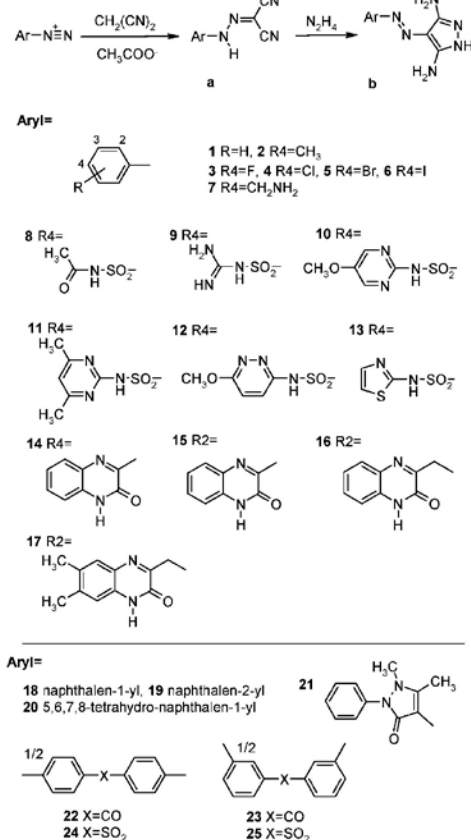
Chemistry

The 4-arylaazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazole CDK inhibitory compounds were synthesized as outlined in Scheme 1. The precursor hydrazones **a** were obtained by diazotization of the appropriate arylamines, followed by condensation with malonodinitrile. Finally, cyclocondensation of these dicyanohydrazones with hydrazine afforded the 4-arylaazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazoles **b**. In total, 12 hydrazones and 18 4-arylaazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazoles were synthesized for the first time. Reaction yields and compound characterization data are included in the Supporting Information, as well as relevant literature references for compounds already described (Supplementary Tables 1–3, Supporting Information).

Results and Discussion

CDK2 Kinase Inhibitory Activity. Routine screening of our compound libraries for protein kinase inhibitors led to the identification of **1b** as the first representative of a novel group of compounds that can diminish the catalytic activity of CDK2-cyclin E. In an effort to identify basic relationships between their structure and activity, a number of derivatives differing in the 4-arylaazo function were synthesized and evaluated. As shown in Figure 1, the 4-halogenophenyl derivatives **3b–6b** have similar inhibitory activities to **1b** (i.e., the analogue with an unsubstituted phenyl ring), while the nonpolar 4-methylphenyl derivative **2b** shows a small decrease in activity. Other

Scheme 1. Synthesis of 4-Arylaazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazoles



nonpolar substituents also retained the inhibitory activity at the level of **1b**, for example, the comparatively bulky naphthalen-1-yl derivative **18b** (but not the isomeric **19b**) or the partially saturated congener **20b**. Although these data suggest that large aromatic substituents may be compatible with CDK2 inhibitory activity, when other bulky arylamines were used as starting materials, the resulting diaminopyrazoles **8b–17b** did not display significant CDK2 inhibitory activity. The explanation for these findings could be related to the nature of the *para* substituent in the arylazo group: a large substituent causing a detrimental effect, probably through steric hindrance. Such an effect is also indicated by the reduced inhibitory activity of the *p*-aminomethyl analogue **7b**. The next subgroup of compounds, **21b–24b** obtained from aryldiamines, contained dimeric 3,5-diamino-1*H*-pyrazole systems, so the resulting molecules were much bulkier, and as expected, these derivatives exhibited reduced and insignificant CDK inhibitory activity.

Following the finding that the majority of compounds with at least some activity against CDK2 possessed a small 4-arylaazo group, we turned our attention to the effects of various small substituents on the phenyl ring. Specifically, we prepared and tested a series of 4-phenylazo derivatives with an additional

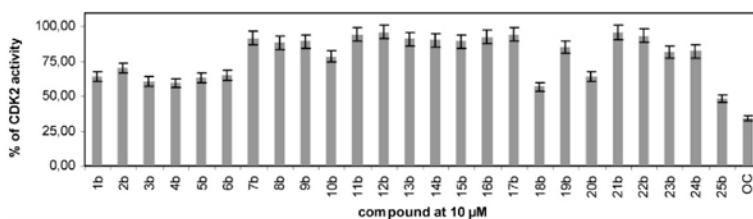


Figure 1. Inhibition of CDK2-cyclin E by 4-arylamino-3,5-diamino-1H-pyrazoles at 10 μM concentration; olomoucine (OC) was included as a control. Average values from three determinations \pm SD.

Table 1. Inhibition of CDK2 and In Vitro Antiproliferative Activity of Selected Derivatives

No	R	IC_{50}^a (μM ; or % of viable cells)				
		CDK2	MCF7	HOS	G361	K562
1b	H	22 \pm 5	>100 (74 \pm 5%)	>100 (83 \pm 8%)	>100 (75 \pm 2%)	>100 (90 \pm 14%)
18b	2-CH=CH-CH=CH-3	10 \pm 3	>100 (56 \pm 1%)	>100 (79 \pm 8%)	>100 (55 \pm 14%)	50 \pm 3 (7.7 \pm 6%)
20b	2-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -3	15 \pm 6	81 \pm 9 (39 \pm 10%)	92 \pm 5 (32 \pm 6%)	77 \pm 4 (27 \pm 5%)	55 \pm 1 (26 \pm 7%)
26b	2-NO ₂	6.1 \pm 1.7	>100 (62 \pm 9%)	>100 (57 \pm 6%)	>100 (58 \pm 2%)	100 \pm 10 (48 \pm 4%)
27b	3-NO ₂	23 \pm 2	65 \pm 7 (44 \pm 6%)	>100 (95 \pm 5%)	>100 (69 \pm 8%)	79 \pm 6 (28 \pm 5%)
28b	4-NO ₂	40 \pm 9	>100 (60 \pm 4%)	>100 (80 \pm 8%)	>100 (61 \pm 10%)	71 \pm 6 (25 \pm 3%)
29b	2-OH	2.5 \pm 0.1	>100 (72 \pm 6%)	>100 (84 \pm 7%)	>100 (74 \pm 12%)	>100 (72 \pm 8%)
30b	3-OH	6.0 \pm 0.2	>100 (71 \pm 9%)	>100 (83 \pm 8%)	>100 (70 \pm 10%)	>100 (53 \pm 6%)
31b	4-OH	3.5 \pm 0.7	33 \pm 5 (20 \pm 6%)	49 \pm 9 (22 \pm 8%)	64 \pm 5 (8.3 \pm 4%)	62 \pm 8 (23 \pm 7%)
32b	2-COOH	92 \pm 12	>100 (97 \pm 7%)	>100 (91 \pm 10%)	>100 (96 \pm 12%)	>100 (89 \pm 6%)
33b	3-COOH	28 \pm 9	>100 (102 \pm 8%)	>100 (94 \pm 11%)	>100 (93 \pm 7%)	>100 (84 \pm 8%)
34b	4-COOH	>100	>100 (97 \pm 9%)	>100 (92 \pm 3%)	>100 (86 \pm 14%)	>100 (96 \pm 9%)
35b	2-CH ₂ OH	17 \pm 5	>100 (51 \pm 10%)	>100 (87 \pm 8%)	>100 (84 \pm 11%)	>100 (86 \pm 2%)
olomoucine		5.0 \pm 1.0	134 \pm 5	144 \pm 15	147 \pm 14	145 \pm 22

^a IC_{50} measured in the presence of 15 μM ATP. % of viable cells in the presence of 100 μM of the test compound. Average values from three determinations \pm SD.

small polar phenyl substituent (derivatives **26b–35b** in Table 1). The most effective members of the series were hydroxy and nitro compounds. In the case of the phenol analogues, the *ortho* (**29b**) and *para* (**31b**) isomers showed the lowest CDK2 IC_{50} values, whereas the *meta*-hydroxy derivative **30b** was about half as potent. Further modification, by insertion of a methylene group between the 2-OH and the phenyl groups (**35b**), led to a decline in activity compared with the homologue **29b**. Interestingly, nitrated compounds **26b–28b** displayed a different positional effect. Here, the position of the nitro group affected the CDK2 inhibitory activity in the order *ortho* > *meta* > *para*, with a 2- to 4-fold drop of potency between the different isomers. All carboxylic acids (**32b–34b**) drastically lost inhibitory activity.

Mechanism of CDK2 Inhibition. To further investigate the mechanism of CDK2-cyclin E inhibition by the 4-phenylamino-3,5-diamino-1H-pyrazole compounds, kinase assays were performed with one of the more potent analogues, **31b**, in which the concentrations of both ATP and the inhibitor were varied. Double reciprocal plots of the data (Figure 2) show that compound **31b** exhibited pure competitive inhibition with respect to ATP, with an apparent K_i value of 13.3 μM , similar to that found with most other known pharmacological CDK inhibitors.

Kinase Selectivity. The selectivity of the most active compounds against CDK2 (i.e., **1b**, **26b**, **27b**, **30b**, **31b**, and **35b**) was then tested against six purified CDKs, including CDK1, CDK4, CDK7, and CDK9 (Table 2). These assays

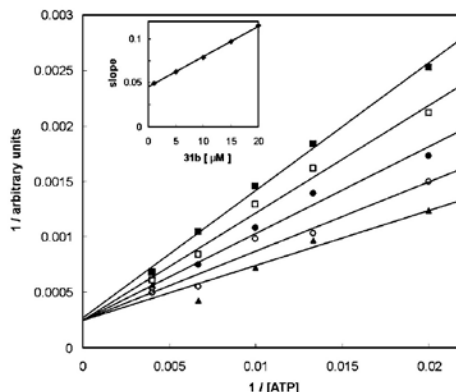


Figure 2. Double reciprocal plot of CDK2-cyclin E activity in the presence of **31b** as a function of ATP concentration. The inhibitor concentrations were 1 μM (filled triangles), 5 μM (empty circles), 10 μM (filled circles), 15 μM (empty squares), and 20 μM (filled squares). The inset shows the secondary replot of slopes vs concentrations of **31b** ($K_i = 13.3 \mu\text{M}$).

confirmed that phenylamino-3,5-diamino-1H-pyrazoles are efficient inhibitors of members of the CDK family other than CDK2. In addition to CDK2-cyclin E, another G1-phase specific kinase,

Table 2. Selectivity of 4-Arylazo-3,5-diaminopyrazoles against Purified Cyclin-Dependent Kinases

compd	IC ₅₀ ^a					
	CDK1/B	CDK2/E	CDK2/A	CDK4/D1	CDK7/H	CDK9/T1
1b	>100	100	>100	>100	>100	15 ± 3
26b	42 ± 3	22 ± 3	88 ± 1	16 ± 1	77 ± 5	5.6 ± 5
27b	>100	68 ± 6	>100	70 ± 12	>100	12.4 ± 3.2
30b	>100	51 ± 10	>100	56 ± 13	82 ± 15	1.5 ± 0.5
31b	44.0 ± 7	20 ± 6	69 ± 1	13.5 ± 3.1	26 ± 13	0.35 ± 0.04
35b	>100	77 ± 5	>100	>100	>100	26 ± 1

^a Kinase activity assayed in the presence of 100 μ M ATP. Average values from three determinations \pm SD.

Table 3. Selectivity of **31b** against Various Protein Kinases

protein kinase	kinase activity ^a (%)
CDK9/cyclin T1	6.9
CDK2/cyclin E	31
c-Abl	84
CHK1	89
CK2	65
GSK3 β	81
MAPK1	99
p70S6K	51
PKA	67
PKB α	100
SAPK α	82

^a In the presence of 10 μ M test compound.

CDK4-cyclin D1, was inhibited approximately to the same degree by **26b**, **27b**, **30b**, and **31b**. Structurally related 3-aminopyrazole CDK inhibitors (e.g., PNU-292137), which were identified during the course of our investigation, appear to possess different selectivity profiles and do not inhibit CDK4.^{35,36} Interestingly, CDK2 in complex with cyclin A proved to be about 4-fold less-sensitive to the pyrazole derivatives **26b** and **31b** than CDK2-cyclin E. Surprisingly, all of these derivatives were most potent against CDK9-cyclin T1, unlike any other known classes of CDK inhibitors, with **31b** being the most effective inhibitor, with submicromolar potency (IC₅₀ = 0.35 μ M). The selectivity ratios with respect to CDK9 of the derivative **31b** ranged from 40 to 200 for various other CDKs, suggesting that significant selectivity, even within the CDK family, can be attained with the diaminopyrazole pharmacophore.

To further characterize the pyrazole derivatives, CDK inhibitor **31b** was assayed (at a fixed concentration of 10 μ M) against nine other protein kinases, including CDK9 and CDK2 as reference controls (Table 3). Most of the kinases tested were inhibited poorly or not at all, corroborating the selectivity of pyrazole derivatives toward CDKs. Surprisingly, **31b** showed a distinct selectivity profile when compared with other CDK inhibitors. For example, purines also inhibit ERK2 and CDK7,^{37–39} whereas paullones and aloisines also inhibit GSK3 β .^{39,40} Another compound that also reduces CTD phosphorylation of RNAP-II via CDK9 inhibition, 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB), inhibits casein kinases too,^{41,42} an effect not observed with **31b**.

Of the kinases tested, only the structurally distinct ribosomal p70S6 kinase was found to be slightly sensitive to **31b**, with an IC₅₀ value of about 10 μ M. Although this kinase is one of the potential intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol B, as shown by affinity chromatography,³⁷ the selectivity profile of **31b** is not reminiscent of any other pharmacological CDK inhibitor, although its cellular kinase specificity profile remains to be determined.

Crystal Structure of 31b with CDK2. The crystal structure of the monomeric CDK2–**31b** complex was determined at 1.80 Å resolution (Supplementary Table 4, Supporting Information) to determine the inhibitor's binding mode within the active site of the kinase and to verify the competitive character of the inhibition. As expected, **31b** binds to the ATP site located in the cleft between the N- and C-terminal kinase domains (Figure 3a). The inhibitor is oriented with the 3,5-diaminopyrazole system facing the CDK2 hinge region polypeptide backbone, where it interacts with Glu81 and Leu83 through three H-bonds (Figure 3b), in a manner similar to that of other heterocyclic CDK inhibitors.⁴³ The phenylazo moiety faces the Phe80 phenyl ring, forming a π interaction and the phenol function H-bonding to the carboxyl of Asp145 (Figure 3b). The orientation and the H-bond pattern of **31b** in the active site corresponds to those of PNU-292137, recently described as a selective CDK2 inhibitor.^{35,36} Interestingly, **31b** is observed to adopt a conformation close to a coplanar *cis*-diaryldiazine (Figure 3c). The energetically less-favorable *cis* ligand conformation, compared to the *trans* arrangement, appears to be preferred because it enables simultaneous interaction with the diaminopyrazole and phenol moieties described above. Diaryldiazines can undergo facile *cis*–*trans* isomerization under a variety of conditions and by several mechanisms; whereas *trans*-diaryldiazines exist predominantly in planar conformations, this is not possible in the *cis* geometry, where the two aryl systems are not coplanar.⁴⁴ The electron density for **31b** in the CDK2 complex is well-defined apart from the phenol substituent, where weak density is observed for the benzene ring and density for the OH group is absent. We suggest that this situation is due to the fact that the electron density represents an average picture of two binding modes, in which the ligand adopts *cis* conformations with the phenol group either above or below the plane of the remaining aryldiazine system.

Model of 31b Complexed to CDK9. The selectivity of **31b** toward CDK9-cyclin T1 found during kinase assays prompted an investigation into the structural basis for this selectivity. Analysis of the modeled interactions between **31b** and CDK9 (Figure 3b) indicates the participation of Asp167 (which corresponds to Asp145 in CDK2) in an H-bond with the phenol-OH of **31b**. H-bond interactions corresponding to those with Glu81 and Leu83 observed in the CDK2–**31b** complex appear to be absent in the CDK9–**31b** model. This is the first CDK inhibitor to show no participation of the molecular fork of CDK in intermolecular hydrogen bonds, previously described to be present in intermolecular hydrogen bonds in the structures of all CDK–inhibitor complexes studied so far.⁴⁵ In the CDK9 complex structure, CDK9 interactions with **31b** are characterized by predominantly hydrophobic and van der Waals interactions between the protein and the 4-phenylazo moiety. Most of the intermolecular contacts between CDK9 and **31b** involve a hydrophobic pocket formed by the residues Ile25, Val33, Phe103, Cys116, Leu156, Ala166, and Asp167. A direct structural comparison of both binary complexes indicates that the high specificity of **31b** for CDK9 does not stem from the establishment of H-bonds, because the CDK9–**31b** complex presents a smaller number of H-bonds than the CDK2–**31b** complex. The most striking difference between the two complexes concerns the intermolecular contact area, which is significantly higher in the CDK9 complex (190 Å²) than in the CDK2 complex (174 Å²; Figure 3d,e). Structural inspection of the interaction between **31b** and CDK9 suggests that the inhibitor's specificity against CDK9 is probably due to the 4-phenylazo moiety, which affords a higher intermolecular

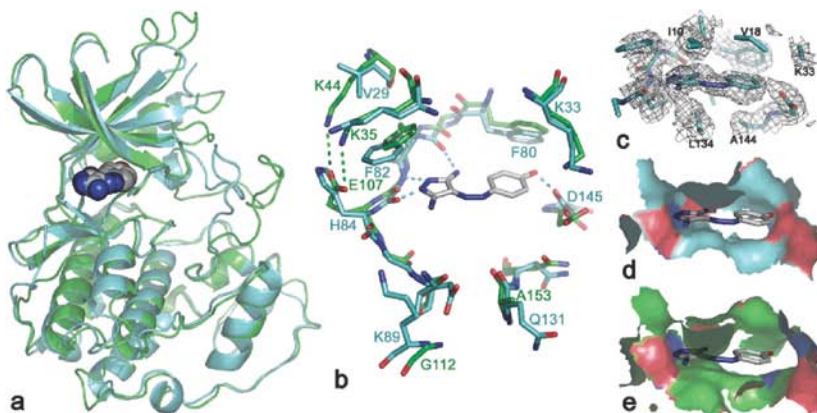


Figure 3. Crystal structure of CDK2 complex with **31b**. (a) The experimentally determined 3D structure of CDK2 (cyan) aligned with the modeled structure of CDK9 (green); the ligand is shown as a space-filling CPK representation. (b) Details of the interactions between ligand and residues of the ATP-binding pocket, indicated with broken lines. (c) Observed electron density around the bound inhibitor **31b**. The protein surfaces within 4 Å of the ligand are shown for CDK2 (d) and CDK9 (e), respectively.

contact area with CDK9 than that observed for the CDK2–**31b** complex. Especially interesting is the presence of two salt bridges (Glu107–Lys35 and Glu107–Lys44) in the CDK9–**31b** structure; these were also observed in the CDK9–flavopiridol complex and involve residues from two different lobes of the CDK9 structure.⁴⁵ This strong electrostatic interaction brings the two lobes of CDK9 closer together, which increases the contact area between the enzyme and the inhibitor. These salt bridges are not observed in the CDK2–**31b** complex. A tighter ATP-binding pocket observed in the CDK9–**31b** complex makes possible a higher number of intermolecular van der Waals contacts between CDK9 and **31b**.

Cellular Activity. The 4-phenylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazoles with the most potent CDK inhibitory activity were tested for antiproliferative activity against four human tumor cell lines of different histological origins. The results are summarized in Table 1. All compounds except derivatives **27b**, **28b**, **31b**, and **20b** showed only marginal effects, with IC_{50} values exceeding 100 μ M. This weak activity is comparable with that of olomoucine, a well-known but weak inhibitor of CDK1 and CDK2.⁴⁶ In general, derivatives substituted with bulky aryl moieties (e.g., sulfonamides **8b**–**13b** or bis-azo derivatives **22b**–**25b**, data not shown) showed either very low or no antiproliferative activity, while some pyrazoles with smaller 4-aryl side chains displayed measurable IC_{50} values.

Surprisingly, the observed effects of the position of the hydroxyl- and nitro-phenyl substituents on the activity did not simply reflect the CDK inhibition pattern. Hydroxy compounds **29b** and **31b**, among the most potent CDK2 inhibitors, showed significant differences in cell proliferation assays. Compound **31b** caused significant reductions in cell number in all four cell lines used. In contrast, **29b** and **30b**, despite their potent CDK inhibition, caused much weaker responses. Conversely, the nitro derivatives **26b** and **28b**, which differed approximately 7-fold in CDK inhibition potency, induced cell death at comparable concentrations.

Notably, compound **20b**, which has a weak impact on CDK activity, also showed antiproliferative activity, exceeding that of the olomoucine control on all tested cell lines, probably due to its relatively low polar surface area, which may facilitate

membrane penetration and alter its enzyme binding parameters. In summary, the observed discrepancies between the results of the kinase and cellular assays suggest that the pyrazole compounds' effects on targets other than CDKs may contribute to their antiproliferative activity and/or that their physicochemical properties affect their cellular activities.

Cell Cycle Effects. It is well known that CDK2 and CDK4 play critical roles in the G1-S transition of the cell cycle by phosphorylating the retinoblastoma protein (pRb), which in turn activates E2F-mediated transcription of S-phase specific genes.⁴⁷ Inhibition of cellular CDK activity is, therefore, expected to result in inhibition of pRb phosphorylation and cell cycle arrest in the G1 phase. To investigate further the cellular effects of the 4-arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazoles, we therefore evaluated compound **31b** (an analogue with strong anti-CDK and growth inhibition activities and high selectivity) using cell cycle analysis and expression–phosphorylation assays in cancer cells. The antiproliferative activity of **31b** was verified by flow cytometric analysis of subconfluent and asynchronously growing HT-29 cells, which were doubly stained with propidium iodide and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). In accordance with the selectivity of **31b** toward CDK9-cyclin T1 when measured *in vitro*, this compound did not influence the cell cycle, unlike the less-selective CDK inhibitor roscovitine, which blocked both G1-S and G2-M transitions (Figure 4). With **31b**, we only observed a difference in the S-phase cell population, which showed substantially reduced intensity of the BrdU signal compared with control cells. Subsequently, increases in the sub-G1 cell population, usually considered apoptotic, were observed in cells treated with either **31b** or roscovitine for periods longer than 3 h.

When MCF7 cells were treated with varying concentrations of **31b** for 24 h, dose-dependent inhibition of pRb phosphorylation at Ser807 and Ser780 (both of which are specifically phosphorylated during the G1 phase of the cell cycle by CDK4-cyclin D) and Thr821 (specifically phosphorylated by CDK2-cyclin E) was observed in immunoblots of total proteins probed with phosphospecific antibodies (Figure 5). The results demonstrate the ability of **31b** to affect the activities of CDK4 and CDK2 in cells. In addition, a drop in pRb phosphorylation

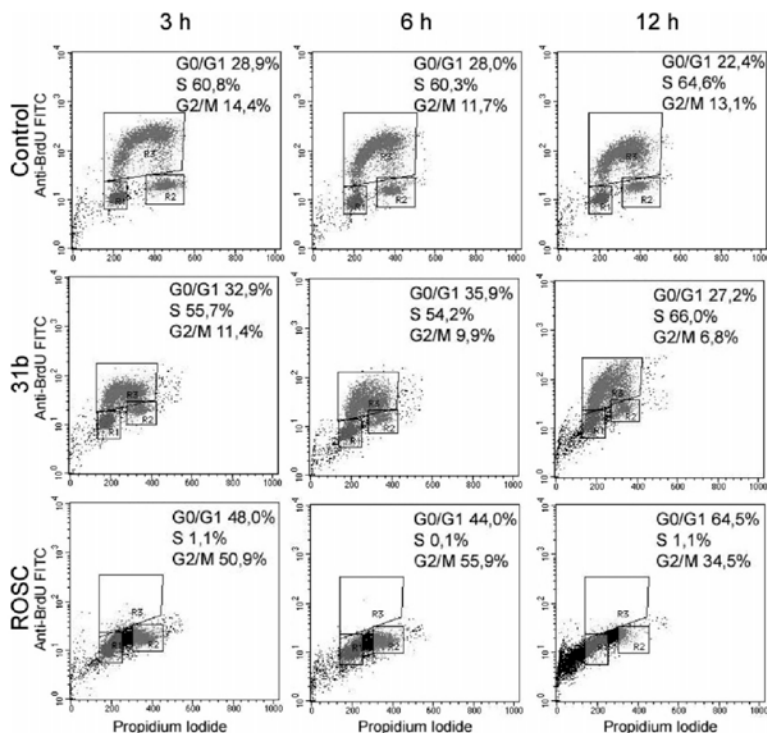


Figure 4. Cell cycle analysis and BrdU incorporation in HT-29 cells treated with **31b** (50 μ M) or roscovitine (70 μ M). Drug concentrations were equivalent to IC_{50} values of the compounds against HT-29 cells.

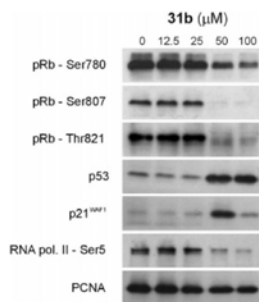


Figure 5. Immunoblot analysis of MCF7 cells treated for 24 h with the indicated concentrations of **31b**. Phosphorylation of pRb appears to be reduced at Ser780 and Ser807 (indicative of decreased activity of CDK4) and Thr821 (indicative of decreased activity of CDK2) by **31b**. In addition, the compound appears to induce increases in the levels of the tumor suppressor protein p53 and p21^{WAF1} and to reduce the phosphorylation of CTD of RNA polymerase II, indicating that it induces blocks in transcription.

occurred at inhibitor concentrations between 25 and 50 μ M, in accordance with the observed IC_{50} value for MCF7 growth inhibition (Table 1). However, due to the marked selectivity of **31b** toward CDK7 and CDK9, we surmise that decreased phosphorylation of pRb may be caused by insufficient activity

of CDK4 and CDK2 (blocked activation by CDK7, absence of cyclins) rather than by direct inhibition.

Inhibition of Transcription. Pharmacological CDK inhibitors usually increase the cellular level of the tumor suppressor protein p53 and, consequently, transcription of p53-activated genes.^{24,48} This effect probably results from direct inhibition of CDKs involved in the regulation of transcription, that is, CDK7, CDK8, and CDK9, which leads to decreased levels of short-lived mRNA and protein gene product. One such mRNA encodes the negative regulator p53-specific Mdm2 ubiquitin E3 ligase. Insufficient elongation of the ligase triggers stabilization of the p53 protein, as demonstrated by cell treatment with certain CDK inhibitors.^{24,32,48} Paradoxically, a block in transcription can thus be accompanied by increased levels of certain proteins, like p53 and its downstream regulated tumor suppressor p21^{WAF1}. We, therefore, evaluated the effect of the derivative **31b** at various concentrations on the levels of p53 and p21^{WAF1} proteins in MCF7 cells and found that 24 h incubation with **31b** at concentrations of 50 and 100 μ M resulted in strongly increased levels of p53 (Figure 5). Accumulated p53 then transactivated the cell cycle inhibitory protein p21^{WAF1}, levels of which were maximal at 50 μ M **31b**. In addition, the activity of **31b** was significant at concentrations close to the IC_{50} value for MCF7 growth inhibition. Thus, increased levels of p21^{WAF1} may also contribute to inhibition of CDKs in cells. Olomoucine, tested in parallel as a control, was effective at doses of about 100 μ M (data not shown).

Table 4. Inhibition of mRNA Synthesis by Compound **31b** (50 μ M) or Roscovitine (70 μ M) in HT-29 Cells^a

	GAPDH copies/ 10^6 cells ^b			
	0 h	3 h	6 h	12 h
control	2 124 368 ±399 147	4 096 055 ±906 931	1 395 413 ±233 769	3 030 440 ±230 709
roscovitine	ND	3 945 095 ±446 126	3 146 605 ±898 073	3 926 015 ±965 476
31b	ND	3 342 533 ±334 107	3 785 908 ±479 616	1 811 960 ±581 162

	CEA copies/ 10^6 cells ^b			
	0 h	3 h	6 h	12 h
control	26 030 ±3236	34 053 ±2409	14 235 ±1568	18 630 ±2506
roscovitine	ND	30 568 ±3005	19 150 ±4801	24 350 ±8988
31b	ND	27 900 ±3690	22 620 ±816	12 005 ±4123

	EpCAM copies/ 10^6 cells ^b			
	0 h	3 h	6 h	12 h
control	4 238 025 ±162 292	8 732 195 ±398 172	2 609 440 ±362 215	4 888 343 ±531 734
roscovitine	ND	8 258 813 ±788 357	6 151 085 ±404 186	6 863 365 ±16 636
31b	ND	6 047 138 ±485 595	5 069 600 ±471 663	2 951 620 ±121 527

^a After the indicated period, total RNA was extracted and absolute numbers of GAPDH, CEA, and EpCAM gene transcripts were quantified by real-time PCR. Drug concentrations were equivalent to IC₅₀ values for the inhibitors against HT-29 cells. ^b Average values from four determinations \pm SD.

The CDK inhibitor roscovitine has also been reported to inhibit mRNA synthesis, possibly through inhibition of CDK7 and CDK9, which phosphorylate the CTD of RNAP-II and thus activate transcription.^{22,25} The possibility that **31b** could lead to a loss of phosphorylation of RNAP-II in cells was assessed by Western blot analysis with phosphospecific CTD antibodies. Figure 5 shows there was a concentration-dependent decrease of Ser5 phosphorylation of RNAP-II in MCF7 cells treated with **31b** for 24 h. Moreover, two epithelial genes, encoding carcinoembryonic antigen (CEA) and human epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), and one housekeeping gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), were selected for analysis of transcriptional inhibition using quantitative real-time PCR (RQ RT-PCR) in the HT-29 colon cancer cell line (Table 4). Copy numbers of GAPDH, CEA, and EpCAM mRNAs decreased in a time-dependent manner when incubated with either **31b** at 50 μ M or roscovitine at 70 μ M. However, **31b** was much more potent in this respect, which is consistent with its direct inhibition of CDK9-cyclin T1.

Conclusions

The most potent pyrazole derivative from the series presented here was 4-[(3,5-diamino-1*H*-pyrazol-4-yl)diazonyl]phenol **31b** (designated CAN508), which selectively inhibited CDK9 kinase *in vitro*. The derivative proved to be a competitive inhibitor of CDK2-cyclin E with respect to ATP. Cellular activity of **31b** blocks proliferation of several tested cancer cell lines. Despite **31b** having high specificity toward CDK9-cyclin T1, its inhibition does not seem to be the sole reason for the induction of p53 and the observed antiproliferative potency. The well-known CDK inhibitor roscovitine, which has similar affinity for CDK9,^{11,32,38} causes accumulation of p53 in cells treated at concentrations lower than **31b**.^{32,48} A comparison of the CDK selectivity profiles suggests that inhibition of other kinases

(probably via combined effects on CDK2, CDK7, and CDK9) may be responsible for the antiproliferative and pro-apoptotic potency of CDK inhibitors. However, the cellular activity of several 4-phenylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazole derivatives significantly exceeded that of olomoucine, thus, they represent good starting points for further structural optimization of specific CDK9 inhibitors, with potential pharmacological applications in oncology and virology.

Experimental Section

General. All compounds prepared were homogeneous, according to thin-layer chromatographic analysis. Elemental analyses were performed with an EA elemental analyzer (Fisons Instruments). Melting points were determined using a Boettius stage apparatus and are not corrected. All reaction solvents and reagents were purchased from Sigma-Aldrich, unless specified otherwise. Specific antibodies were purchased from Cell Signaling (total pRb and pRb phosphorylated at Ser780 and Ser807), Biosource (pRb phosphorylated at Thr821), Abcam (RNA polymerase II phosphorylated at Ser5), and Becton–Dickinson (anti-BrdU-FITC conjugate) or were generous gifts from B. Vojtěšek (p53, PCNA, p21^{WAF1}).

General Method for Preparing Pyrazones a. The appropriate amine (5 mmol) was dissolved in a mixture of water (30 mL) and hydrochloric acid (4.5 mL of 37% w/v soln). A solution of NaNO₂ (0.35 g, 5 mmol) in ice-cold water (5 mL) was added dropwise with stirring to the cooled amine solution (0–5 °C). The diazonium salt solution so formed was then added dropwise to a solution of malononitrile (0.5 g, 7.5 mmol) and NaOAc (12.5 g) in water (50 mL) with continuous stirring and cooling. After adding the diazonium salt, the reaction mixture was stirred and cooled for an additional 30 min before being placed in a refrigerator overnight. The following day, the precipitated hydrazone product was filtered, washed with water, and dried. Yields were between 90 and 100% (for details see the Supporting Information). For the preparation of compounds **32a–35a**, twice the above quantities of hydrochloric acid, NaNO₂, malononitrile, and NaOAc were used.

General Method for Preparing Pyrazoles b. A solution of hydrazine hydrate (0.5 g, 9 mmol) in MeOH (30 mL) was added to the hydrazone **a** (3 mmol). The reaction mixture was heated under reflux for 4 h and was then evaporated to dryness. The solid residue was recrystallized from appropriate solvents (for details see Supplementary Table 2, Supporting Information). Compounds **13b** and **14b** were precipitated from aqueous solution by acidification with hydrochloric acid to pH = 1.

Enzyme Inhibition Assay. CDK2-cyclin E kinase was produced in Sf9 insect cells co-infected with appropriate baculoviral constructs, as previously described.²⁹ The enzyme was purified on a NiNTA column (Qiagen) and assayed with 1 mg/mL histone H1 in the presence of 15 μ M ATP, 0.05 μ Ci [γ -³²P]ATP and of the test compound in a final volume of 10 μ L, all in reaction buffer (50 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM 2-glycerolphosphate, 1 mM NaF, 1 mM DTT, pH 7.4). After a 10 min incubation, reactions were stopped by adding 5 μ L of 3% aq H₃PO₄. Aliquots were spotted onto P-81 phosphocellulose (Whatman), which was subsequently washed 3 \times with 5% aq H₃PO₄ and finally air-dried. To quantify kinase inhibition, a BAS-1800 digital image analyzer (Fujifilm) was employed. Kinase activity was expressed as a percentage of maximum activity. The concentration of the test compounds required to decrease the CDK activity by 50% was determined from dose–response curves and designated IC₅₀. For the kinetic analyses, the activity was expressed as arbitrary units (AU) of digital image analyzer signal.

Kinase Selectivity. CDK selectivity was evaluated using a panel of purified kinases (CDK1-cyclin B, CDK2-cyclin A, CDK4-cyclin D1, CDK7-cyclin H, and CDK9-cyclin T1), as previously described.^{38,49} Other protein kinase activities were measured in duplicates at a single fixed concentration of **31b** (10 μ M): c-Abl, CHK1, GSK3 β , p70S6K, PKA and PKBR were assayed in 8 mM MOPS, pH 7.0, 0.2 mM EDTA, MAPK1 and SAPK2 α in 25 mM Tris, pH 7.5, 0.02 mM EGTA, and CK2 in 20 mM HEPES, pH

7.6, 0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, 2 mM DTT, 0.1% Triton X-100, all with 10 mM Mg-acetate, 10 μ M ATP, [γ - 32 P]ATP (500 cpm/pmol) and appropriate peptide substrates for 40 min. The reactions were stopped by adding 5 μ L of 3% aq H_3PO_4 . Aliquots were then spotted onto a P30 filtermat and washed 3 \times with 5% aq H_3PO_4 and air-dried prior to scintillation counting.

Crystallization and Structure Determination. Human recombinant CDK2 was expressed, purified, and crystallized as previously described.^{43,50} Data were collected at the Cyclacel home source using a R-AXIS IV++ image plate (Rigaku). Data processing was carried out using programs from the d⁸TREK software suite.⁵¹ The structures were solved by molecular replacement using MOLREP⁵² and PDB entry 1PW2 as the search models for CDK2. ARP/wARP⁵³ was used for the addition of water molecules, and REFMAC⁵² was used for structural refinement. A number of rounds of refinement and model building with the program Quanta (Accelrys) were carried out. Crystallographic data and statistics are summarized in Supplementary Table 4 (Supporting Information). The structure has been deposited with the Protein Data Bank (PDB) under the accession code 2CLX.

Molecular Model of the CDK9–31b Complex. A previously published protocol was used to model the binary CDK9–31b complex.⁴⁵ Briefly, the atomic coordinates for CDK2–31b were used as the starting points for modeling the CDK9–31b complex. Therefore, the final model of the complex includes the atomic coordinates of the inhibitor 31b. This has been confirmed by computational docking studies using PRINCLANE (<http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/princiane/>). Fifteen residues from the N-terminus and 45 from the C-terminus were removed from the CDK9 model because there is no good template for these fragments. The webserver Parmodel was used to generate all models for the CDK9–31b complex.⁵⁴ Several slightly different models can be calculated by varying the initial structure. We generated 1000 models for the CDK9–31b complex, and the final models were selected based on stereochemical quality. The optimization of the complex was carried out by the use of the variable target function method, followed by 500 steps of conjugate gradient minimization using Parmodel.⁵⁴ All optimization processes were performed on a Beowulf Cluster (BioComp, S. J. do Rio Preto, Brazil). The overall stereochemical quality of the final model for the complex of CDK9–31b was assessed by the program Parmodel.⁵⁴ Analysis of the stereochemical quality of the final model of the CDK9 indicates that 98.6% nonglycine residues lie in the most favored and additional allowed regions of the Ramachandran plot and only 1.4% lie in the generously allowed regions. Root-mean-square (rms) differences from ideal geometries for bond lengths and angles were calculated with Parmodel.⁵⁴ Overall deviations from ideal geometry are 0.025 Å for bond distances and 2.51° for bond angles.

Cell Maintenance and Growth Inhibition Assay. The ability of the test substances to inhibit cancer cell growth was determined in vitro with K562, MCF7, HOS, and G361 cell lines. The cells, cultured in DMEM (supplemented with 10% fetal calf serum, 4 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin) in a humidified CO₂ incubator at 37 °C, were redistributed into 96-well microtiter plates at appropriate densities for their respective cell sizes and growth rates. After a 12 h preincubation, test compounds in 6-fold dilutions were added. Treatment (in the 1–100 μ M range) lasted for 72 h. At the end of this period, the cells were fed for 1 h with Calcein AM, and the fluorescence of the live cells was measured at 485 nm/538 nm (ex/em) with a Fluoroskan Ascent reader (Labsystems). IC₅₀ values, the drug concentrations lethal to 50% of the cancer cells, were determined from the dose–response curves.

Immunoblotting. For direct immunoblotting, total cellular protein lysates were prepared by harvesting treated cells in Laemmli sample buffer. Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membrane. The blotted membranes were stained with Ponceau-S in 1% aq AcOH to verify equal protein loading, destained, and blocked in PBS and 0.1% Tween 20 (PBS-T) with 5% low fat milk. The membranes were

then incubated with specific antibodies overnight. After washing three times in PBS-T, the membranes were incubated with a 1:2000 dilution of peroxidase-conjugated secondary antibodies. After another three washes in PBS-T, peroxidase activity was detected using ECL+ reagents (AP Biotech) according to the manufacturer's instructions.

BrdU Incorporation and Cell Cycle Analysis. Subconfluent HT29 cells were treated with 31b or roscovitine at concentrations corresponding to IC₅₀ values (50/70 μ M) for 3, 6, and 12 h. The cultures were fed a pulse of 10 μ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) for 30 min at 37 °C before harvesting. The cells were trypsinized, fixed with ice-cold 70% ethanol, incubated on ice for 30 min, washed with PBS, and resuspended in 2 M aq HCl for 30 min at room temperature to denature their DNA. Following neutralization with 0.1 M Na₂B₄O₇, the cells were harvested by centrifugation and washed with PBS containing 0.5% Tween-20 and 1% BSA. They were then stained with anti-BrdU FITC-labeled antibody (1:50, Becton-Dickinson) for 30 min at room temperature in the dark. The cells were then washed with PBS, incubated with propidium iodide (0.1 mg/mL) and RNase A (0.5 mg/mL) for 1 h at room temperature in the dark, and finally analyzed by flow cytometry using a 488 nm single beam laser (FACSCalibur, Becton Dickinson).

RNA Isolation and Reverse Transcription. Total RNA was extracted from treated/control HT-29 cells (5×10^6) cultured in 6-well panels with TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of isolated RNA was assessed by UV spectroscopy. Three microgram portions of total RNA were used for reverse transcription in a final volume of 30 μ L. The RNA solution was preincubated with 0.3 μ g of random primers (Promega) at 70 °C for 5 min and immediately placed on ice. Then, 6 μ L of 5 \times RevertAid reverse transcriptase buffer (Fermentas), 3 μ L of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), and 0.75 μ L of 40 U/ μ L RNasin ribonuclease inhibitor (Promega) were added, and the mixtures were incubated for 5 min at room temperature. In the final step, 150 U of RevertAid Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Fermentas) was added to each tube, the samples were incubated at 42 °C for 60 min, and the reverse transcriptase was then heat-inactivated at 95 °C for 5 min.

Real-Time Polymerase Chain Reaction (RQ RT-PCR). Two epithelial genes, encoding CEA (CEACAM5) and human EpCAM (TACSTD 1), and one housekeeping gene, encoding GAPDH, were selected for analysis of transcriptional inhibition using quantitative real-time PCR. Primers were selected using PrimerPremier3 software and NCBI reference sequences (accession numbers NM_004363, NM_002354, and NM_002046, respectively). Specific primers from two different exons and probes (Generi-Biotech, Czech Republic) to span introns were designed to reduce amplification of genomic DNA. The following primers and probes were used: CEA3 5'-TAA GTG TIG ACC ACA GCG ACC C-3', CEA4 5'-GTT CCC AIC AAT CAG CCA AGA A-3', CEA probe 5'-AIG TCC TCT ATG GCC CAG ACG ACC C-3'-BHQ1-HEX; EpCAM3 5'-AAA CAC AAA GCA AGA GAA AAA CCT-3', EpCAM4 5'-AAT TTT GGA TCC AGT TGA TAA CG-3', EpCAM probe 5'-TTG CGG ACT GCA CTT CAG AAG GA-3'-BHQ1-HEX; GAPDH-F 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3', GAPDH-R 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT-3', GAPDH probe 5'-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CG-3'-BHQ1-FAM. RQ RT-PCR reactions were performed in 25 μ L reaction volumes consisting of 1 U of HotStart Taq polymerase, 3 mM MgCl₂, 10 \times PCR buffer (AB Gene), 200 μ M dNTPs (Promega), 100 ng DNA, and variable amounts of primer/probe: 300 nM CEA3, 600 nM CEA4, and 200 nM CEA probe; 400 nM EpCAM3, 400 nM EpCAM4, and 200 nM EpCAM probe; 300 nM GAPDH-F, 300 nM GAPDH-R, and 200 nM GAPDH probe. The optimized thermal profiles for amplification involved 15 min Taq polymerase activation at 96 °C, followed by 50 cycles at 95 °C for 15 s and 65 °C for 15 s (CEA), 50 cycles at 95 °C for 15 s and 59 °C for 15 s (EpCAM), and 50 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s (GAPDH). Gene expression was quantified from calibration curves

using appropriately diluted gene specific amplicons ranging between 30 and 1 000 000 copies per reaction. Each sample was analyzed in duplicate. Positive and negative controls were also incorporated into each experiment to evaluate reproducibility and possible sample contamination during the PCR procedure.

Acknowledgment. The authors thank K. Faková, E. Hirnová, J. Hudcová, and the screening group members at Cyclacel for their contributions. B. Vojtěšek is acknowledged for the gift of antibodies and Sees-editing for English corrections. The work was supported by GACR Grant 204/03/D231, MSM Grant 6198959216, and SMOLBnet FAPESP 01/07532-0. W.F.A. is a researcher for the Brazilian Council for Scientific and Technological Development, CNPq.

Supporting Information Available: Data from the elemental analyses, melting points, recrystallization solvents of newly prepared compounds, references to previously known compounds, as well as X-ray data are included. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261–291.
- Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* **1996**, *274*, 1672–1677.
- Sielecki, T. M.; Boylan, J. F.; Benfield, P. A.; Trainor, G. L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1–18.
- Dai, Y.; Grant, S. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2003**, *3*, 362–370.
- Fischer, P. M.; Lane, D. P. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1213–1245.
- Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 417–425.
- Hirai, H.; Kawanishi, N.; Iwasawa, Y. Recent advances in the development of selective small molecule inhibitors for cyclin-dependent kinases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 167–179.
- McInnes, C.; Fischer, P. M. Strategies for the design of potent and selective kinase inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 1845–1863.
- Fischer, P. M. The design of drug candidate molecules as selective inhibitors of therapeutically relevant kinases. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1563–1583.
- Fischer, P. M.; Gianella-Borradori, A. Recent progress in the discovery and development of CDK inhibitors. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2005**, *14*, 457–477.
- Benson, C.; Kaye, S.; Workman, P.; Garrett, M.; Walton, M.; de Bono, J. Clinical anticancer drug development: targeting the cyclin-dependent kinases. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 7–12.
- Loyer, P.; Trembley, J. H.; Katona, R.; Kidd, V. J.; Lahti, J. M. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell. Signalling* **2005**, *17*, 1033–1051.
- Schang, L. M. Advances on cyclin-dependent kinases (CDKs) as novel targets for antiviral drugs. *Curr. Drug Targets: Infect. Disord.* **2005**, *5*, 29–37.
- Fischer, P. M. Cyclin-dependent kinase inhibitors: discovery, development and target rationale for different therapeutic applications. *Drugs Future* **2005**, *30*, 911–929.
- Chao, S.-H.; Fujinaga, K.; Marion, J. E.; Taube, R.; Sausville, E. A.; Senderowicz, A. M.; Peterlin, B. M.; Price, D. H. Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28345–28348.
- Schang, L. M. Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1697*, 197–209.
- Agbottah, E.; de La Fuente, C.; Nekhai, S.; Barnett, A.; Gianella-Borradori, A.; Pumfery, A.; Kashanchi, F. Antiviral Activity of CYC202 in HIV-1-infected Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3029–3042.
- Heredia, A.; Davis, C.; Bamba, D.; Le, N.; Gwarzo, M. Y.; Sadowska, M.; Gallo, R. C.; Redfield, R. R. Indirubin-3'-monooxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication. *AIDS* **2005**, *19*, 2087–2095.
- Fischer, P. M. The use of CDK inhibitors in oncology: a pharmaceutical perspective. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 742–746.
- Ortega, S.; Prieto, I.; Odajima, J.; Martin, A.; Dubus, P.; Sotillo, R.; Barbero, J. L.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat. Genet.* **2003**, *35*, 25–31.
- Tetsu, O.; McCormick, F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 233–245.
- Ljungman, M.; Paulsen, M. T. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 785–789.
- Chao, S.-H.; Price, D. H. Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31793–31799.
- Demidenko, Z. N.; Blagosklonny, M. V. Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3653–3660.
- Whittaker, S. R.; Walton, M. I.; Garrett, M. D.; Workman, P. The cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 262–272.
- MacCallum, D. E.; Melville, J.; Frame, S.; Watt, K.; Anderson, S.; Gianella-Borradori, A.; Lane, D. P.; Green, S. R. Seliciclib (CYC202, R-roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5399–5407.
- Lacrima, K.; Valentini, A.; Lambertini, C.; Taborelli, M.; Rinaldi, A.; Zucca, E.; Catapano, C.; Cavalli, F.; Gianella-Borradori, A.; MacCallum, D. E.; Bertoni, F. In vitro activity of cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (Seliciclib, R-roscovitine) in mantle cell lymphomas. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 1169–1176.
- Shan, B.; Zhuo, Y.; Chin, D.; Morris, C. A.; Morris, G. F.; Lasky, J. A. Cyclin-dependent kinase 9 is required for tumor necrosis factor- α -stimulated matrix metalloproteinase-9 expression in human lung adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1103–1111.
- Havlicek, L.; Fuksova, K.; Kryštof, V.; Orsag, M.; Vojtesek, B.; Strnad, M. 8-Azapurines as new inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5399–5407.
- Havlicek, L.; Hanus, J.; Vesely, J.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Shaw, G.; Strnad, M. Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 408–412.
- Kryštof, V.; Lenobel, R.; Havlicek, L.; Kuzma, M.; Strnad, M. Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3283–3286.
- Kryštof, V.; McNaie, I. W.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M.; Müller, P.; Vojtesek, B.; Orsag, M.; Havlicek, L.; Strnad, M. Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1763–1771.
- Moravcova, D.; Kryštof, V.; Havlicek, L.; Moravec, J.; Lenobel, R.; Strnad, M. Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2989–2992.
- Moravec, J.; Kryštof, V.; Hanus, J.; Havlicek, L.; Moravcova, D.; Fuksova, K.; Kuzma, M.; Lenobel, R.; Otyepka, M.; Strnad, M. 2,6,8,9-Tetrasubstituted Purines as New CDK1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2993–2996.
- Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Amici, R.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Corti, L.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Villa, M.; Pierce, B. S.; Pulici, M.; Giordano, P.; Martina, K.; Fritzen, E. L.; Nugent, R. A.; Casale, E.; Cameron, A.; Ciometti, M.; Roletto, F.; Isacchi, A.; Fogliatto, G.; Pesenti, E.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Leach, K. L.; Clare, P. M.; Fiorentini, F.; Varasi, M.; Vulpatti, A.; Warpehoski, M. A. 3-Aminopyrazole inhibitors of CDK2/Cyclin A as antitumor agents. 1. Lead finding. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3367–3380.
- Pevarello, P.; Brasca, M. G.; Orsini, P.; Traquandi, G.; Longo, A.; Nesi, M.; Orzi, F.; Piutti, C.; Sansonna, P.; Varasi, M.; Cameron, A.; Vulpatti, A.; Roletto, F.; Alzani, R.; Ciometti, M.; Albanese, C.; Pastori, W.; Marsiglio, A.; Pesenti, E.; Fiorentini, F.; Bischoff, J. R.; Mercurio, C. 3-Aminopyrazole Inhibitors of CDK2/Cyclin A as antitumor agents. 2. Lead optimization. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2944–2956.
- Knockaert, M.; Gray, N.; Damiens, E.; Chang, Y.-T.; Grellier, P.; Grant, K.; Fergusson, D.; Mottram, J.; Soete, M.; Dubremetz, J.-F.; Le Roch, K.; Doerig, C.; Schultz, P. G.; Meijer, L. Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 411–422.
- McClue, S. J.; Blake, D.; Clarke, R.; Cowan, A.; Cummings, L.; Fischer, P. M.; MacKenzie, M.; Melville, J.; Stewart, K.; Wang, S.; Zhelev, N.; Zheleva, D.; Lane, D. P. In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 463–468.

- (39) Bain, J.; McLaughlan, H.; Elliott, M.; Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **2003**, *371*, 199–204.
- (40) Mettey, Y.; Gompel, M.; Thomas, V.; Garnier, M.; Leost, M.; Ceballos-Picot, I.; Noble, M.; Endicott, J.; Vierfond, J.-M.; Meijer, L. Aloisines, a new family of CDK/GSK-3 inhibitors. SAR study, crystal structure in complex with CDK2, enzyme selectivity, and cellular effects. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 222–236.
- (41) Zandomeni, R.; Zandomeni, M. C.; Shugar, D.; Weinmann, R. Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3414–3419.
- (42) Meggio, F.; Shugar, D.; Pinna, L. A. Ribofuranosyl-benzimidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 89–94.
- (43) Wu, S. Y.; McNae, I.; Kontopidis, G.; McClue, S. J.; McInnes, C.; Stewart, K. J.; Wang, S.; Zheleva, D. I.; Marriage, H.; Lane, D. P.; Taylor, P.; Fischer, P. M.; Walkinshaw, M. D. Discovery of a novel family of CDK inhibitors with the program LIDAEUS: Structural basis for ligand-induced disordering of the activation loop. *Structure* **2003**, *11*, 399–410.
- (44) Stepanic, V.; Baranovic, G.; Smrecki, V. Structure and vibrational spectra of conjugated acids of trans- and cis-azobenzene. *J. Mol. Struct.* **2001**, *569*, 89–109.
- (45) De Azevedo, W. F., Jr.; Canduri, F.; Da Silveira, N. J. F. Structural basis for inhibition of cyclin-dependent kinase 9 by flavopiridol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 566–571.
- (46) Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 771–786.
- (47) Sherr, C. J. Principles of tumor suppression. *Cell* **2004**, *116*, 235–246.
- (48) Kotala, V.; Uldrijan, S.; Horky, M.; Trbusek, M.; Strnad, M.; Vojtesek, B. Potent induction of wild-type p53-dependent transcription in tumour cells by a synthetic inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1333–1339.
- (49) Wang, S.; Meades, C.; Wood, G.; Osnowski, A.; Anderson, S.; Yuill, R.; Thomas, M.; Mezna, M.; Jackson, W.; Midgley, C.; Griffiths, G.; Fleming, I.; Green, S.; McNae, I.; Wu, S. Y.; McInnes, C.; Zheleva, D.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M. 2-Anilino-4-(thiazol-5-yl)pyrimidine CDK inhibitors: Synthesis, SAR analysis, X-ray crystallography, and biological activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1662–1675.
- (50) Kontopidis, G.; Andrews, M. J. I.; McInnes, C.; Cowan, A.; Powers, H.; Innes, L.; Plater, A.; Griffiths, G.; Paterson, D.; Zheleva, D. I.; Lane, D. P.; Green, S.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M. Insights into cyclin groove recognition: complex crystal structures and inhibitor design through ligand exchange. *Structure* **2003**, *11*, 1537–1546.
- (51) Pflugrath, J. The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr.* **1999**, *D55*, 1718–1725.
- (52) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr.* **1997**, *D53*, 240–255.
- (53) Lamzin, V. S.; Wilson, K. S. Automated refinement for protein crystallography. *Methods Enzymol.* **1997**, *277*, 269–305.
- (54) Uchoa, H. B.; Jorge, G. E.; Freitas Da Silveira, N. J.; Camera, J. C., Jr.; Canduri, F.; De Azevedo, W. F., Jr. Parmodel: a web server for automated comparative modeling of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 1481–1486.

JM0605740

3. Souhrnné výsledky a diskuse

Maligní nádory vycházející z epiteliálních tkání jsou nejčastější formou nádorového onemocnění v západních zemích. I přes obrovský pokrok v léčbě onkologických onemocnění zůstává mortalita stále vysoká. Pokrok v léčbě je v současnosti obecně nejlépe vidět na poměru stále rostoucí incidence nádorových nemocí, avšak stagující mortalitě. Mortalita je stále více spojená se vznikem vzdálených metastáz, které se objeví až během protinádorové léčby nebo po jejím ukončení, nejsou však diagnostikovatelné v čase primární diagnózy. Riziko vzniku metastáz se dá odhadnout pomocí statistických dat, která vycházejí z údajů jako je velikost primárního tumoru, postižení lymfatických uzlin, gradingu, angioinvasze apod. Nediagnostikovatelné okultní nádorové buňky či mikrometastázy mohou přispět k neúspěchu primární léčby tím, že léčba je podhodnocena, což vede ke zhoršení prognózy pacienta. V současnosti neexistuje standardní metoda s dostatečnou citlivostí pro detekci mikrometastáz nebo okultních nádorových buněk. Pokud by existovala, bylo by možné identifikovat pacienty s vyšším rizikem vzniku metastáz, na které by se mohla zaměřit adjuvantní chemoterapie, určená primárně k eliminaci zbylých, okultních nádorových buněk. A naopak by bylo možné identifikovat pacienty s nízkým rizikem, u kterých by bylo možné se vyhnout podání nákladné a často velmi zatěžující chemoterapie.

Dnes běžně používané zobrazovací, biochemické, cytogenetické ani imunologické metody neumožňují detekci cirkulujících nádorových buněk a mikrometastáz s požadovanou citlivostí. Teprve rozvoj molekulárně-biologických metod založených na principu PCR umožnil zvýšit senzitivitu a detekovat až 1 nádorovou buňku mezi 1-10 miliony buněk nenádorových. Tyto metody se dnes s úspěchem používají u hematologických malignit, kde jsou pro jednotlivé diagnózy díky dobře popsaným genetickým změnám dostupné vysoce specifické markery nádorových buněk. U solidních tumorů se z důvodu vysoké míry genetické instability a nádorové heterogenity dostatečně senzitivní a specifické markery teprve hledají.

V předkládané práci byla pro detekci MRD u solidních tumorů zvolena pro svou výjimečnou senzitivitu metoda kvantitativní RT-PCR. Dle publikovaných prací byly vybrány kandidátní geny, jež se vyznačovaly vysokou specificitou pro nádorové tkáně. Byl proveden vlastní design primerů a průb včetně přípravy standardů pro absolutní kvantifikaci genové exprese. Optimalizace RT-PCR v sobě zahrnovala ověření specifity a senzitivity navržených markerů pro detekci MRD. Výsledky potvrzují velmi vysokou a specifickou expresi karcinoembryonálního antigenu a cytokeratinu 20 v kolorektálních karcinomech a na vysoce specifickou expresi mamaglobinu 1 a cytokeratinu 19 v karcinomech mamárního původu.

Senzitivita metody byla experimentálně ověřena a potvrdila možnost detekce 1 nádorové buňky mezi 1-4 milióny buňkami nenádorovými v závislosti na použitém markeru. Diagnostická specifita byla ověřena ve vzorcích krve 58 zdravých dárců a je u všech testovaných markerů nad úrovní 95%, kromě CEA, kde činí 94,4%. Zvolené markery tedy poskytují dostatečnou senzitivitu a specifitu pro detekci MRD u vybraných solidních nádorů (kapitola 2.3.1).

Potřeba identifikovat nové markery s ještě vyšší specificitou a senzitivitou však stále trvá. Jednou z možností identifikace vhodných markerů pro detekci MRD je použití moderních metod založených na principu DNA microarrays. Statistickým porovnáním expresních profilů nádorových a nenádorových tkání lze nalézt diferencielně exprimované geny specifické pro jednotlivé nádorové subpopulace, které je možné s úspěchem využít pro detekci MRD metodami QRT-PCR. Provedli jsme metodou DNA microarray za použití Affymetrix U133 Plus 2.3 Array analýzu genové exprese v 30 mikrodisekovaných vzorcích tkání (5 vzorků invazivního duktálního karcinomu, 5 vzorků invazivního lobulárního karcinomu, 10 vzorků normálních duktálních buněk a 10 vzorků normálních lobulárních buněk). Byly identifikovány dva kandidátní geny, asporin a collagen triple helix repeat containing I, zapojené do procesu karcinogeneze karcinomu prsu. Dále bylo zjištěno, že proteiny EMPI (Epithelial membrane protein 1), DVLI (Dishevelled, dsh homolog 1), DDRI (Discoidin domain receptor family, member 1) jsou diferencielně exprimované v buňkách lobulárního a duktálního karcinomu, což může být užitečné při histopatologické diagnostice. Geny kódující tyto proteiny lze v budoucnu využít jako markery cirkulujících nádorových buněk pro detekci MRD u jednotlivých histogenetických podtypů karcinomu prsu (kapitola 2.3.2).

V předkádané práci byla zavedena a zvalidována metoda QRT-PCR pro detekci MRD u solidních nádorů. Panel sedmi specifických markerů (Tab. 1) lze využít nejen pro detekci MRD, ale také pro diferencielní diagnostiku metastáz a maligních výpotků neznámého původu. Obecně se jedná o 3-7% pacientů s diseminovaným nádorovým onemocněním, u nichž nelze současnými zobrazovacími a histopatologickými metodami určit primární ložisko. To se samozřejmě negativně odráží v nesnadné léčbě a špatné prognóze onemocnění, kdy medián přežití činí 3-4 měsíce. Byla publikována kazuistika 74 letého muže s náhle vzniklou kvadruparézou a nálezem míšních metastáz. Histopatologicky se jednalo o metastázu adenokarcinomu, primární tumor nebyl nalezen. Provedená imunohistochemická (negativita CK7, CK20, TTF1) ani molekulární (nepřítomnost aktivujících mutací v genech EGFR1 a k-ras) vyšetření nevedla k určení primárního původu metastázy. V tomto případě se však nepodařilo provést RT-PCR analýzu exprese specifických genů vzhledem nedostatečnému množství vyizolované kvalitní RNA. Stanovením exprese vybraných specifických markerů

metodou RT-PCR lze ale v mnoha případech pomoci v diferenciaci diagnostice těchto závažných onemocnění (kapitola 2.3.3).

V předkládané práci byl význam přítomnosti MRD u pacientů se solidními tumory sledován na souboru pacientů s kolorektálním karcinomem a karcinomem prsu. Pro detekci MRD u pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku byly jako markery nádorových buněk vybrány CEA a CK 20. Pro detekci mikrometastáz v sentinelových uzlinách a v kostní dřeni u pacientek s karcinomem prsu byly jako markery použity MGB1 a CEA. Kvantitativní stanovení genové exprese markerů MRD umožňuje určit cut-off hodnoty s rozlišením mezi fyziologickým a patologickým stavem. Následně umožňuje posoudit změny v přítomnosti cirkulujících nádorových buněk během dispenzarizace pacienta. Cut-off hodnoty byly v naší studii stanoveny na základě analýzy exprese jednotlivých markerů v kontrolní skupině zdravých dárců krve.

Byla sledována přítomnost MRD v kostní dřeni u 70 pacientek s karcinomem prsu klinického stádia I-III. U 8 pacientek (11,4%) došlo k rozvoji recidivy nádorového onemocnění. Medián sledování byl 22 měsíců. Metodou QRT-PCR pro CEA jsme prokázali přítomnost MRD v kostní dřeni u 41% (29 ze 70) pacientek. Čtyři z osmi událostí hodnocených v rámci DFS byly popsány u pacientek s CEA pozitivitou kostní dřene. Nicméně 2 události ve skupině s CEA pozitivitou neměly přímý vztah k nádoru. Ve skupině s CEA pozitivitou kostní dřene byl pozorován trend ke kratšímu DFS, který byl těsně nad hranicí statistické významnosti ($p=0,05548$). Nicméně tento trend nebyl potvrzen obdobnými nálezy u DMFS ani RFS. Nebyla potvrzena korelace s ostatními klinickými a laboratorními prognostickými faktory. Studie prokázala, že technika QRT-PCR pro CEA může být využita pro detekci MRD v kostní dřeni pacientek s časnými stádii karcinomu prsu. Prognostická hodnota MRD v kostní dřeni pacientek s karcinomem prsu však zůstává nejasná (kapitola 2.3.4.1).

Dále jsme se u pacientek s karcinomem prsu zabývali mikrometastatickým postižením sentinelových lymfatických uzlin a jeho prognostickou hodnotou. Byl vyšetřen a sledován soubor 44 pacientek operovaných pro karcinom prsu. Medián sledování souboru byl 25,1 měsíců, medián doby do progresu 17,4 měsíců, k progresi došlo během sledování u 7 pacientek (15,9%). Metodou QRT-PCR pro CEA, MGB1 a CK19 jsme detekovali přítomnost mikrometastáz v sentinelových lymfatických uzlinách u 59% pacientek (26/44), přičemž histopatologicky bylo detekováno metastatické postižení pouze u 32% pacientek (13/41). V souboru 28 pacientek s histopatologicky negativními sentinelovými uzlinami jsme metodou QRT-PCR detekovali mikrometastatické postižení až u 10 pacientek (36%).

Zaměřili jsme se zejména na pacientky s histopatologicky negativními sentinelovými lymfatickými uzlinami (28 pacientek) a rozdělili jsme je dle QRT-PCR pozitivitu

mikrometastatického postižení. Zjistili jsme rozdíl v DFS mezi oběma skupinami, zatím ne však statisticky signifikantní ($p < 0,16$) (kapitola 2.4.2.2, obr. 8). Ve skupině pacientek s histopatologicky negativními uzlinami (pT1-2N0M0), mají pacientky s QRT-PCR pozitivními uzlinami kratší DFS a vyšší riziko rozvoje recidivy, než pacientky s uzlinami QRT-PCR negativními. Ve skupině 10 pacientek s QRT-PCR pozitivními uzlinami došlo ke dvěma generalizacím onemocnění, jedné lokální recidivě a jednomu následnému úmrtí. Ve skupině 18 pacientek s negativními uzlinami došlo pouze k jedné recidivě (recidivě v jizvě) a k žádnému úmrtí. Žádná z těchto čtyř pacientek neobdržela systémovou adjuvantní chemoterapii (kapitola 2.2.4.2).

V další kapitole předkládné práce (kapitola 2.3.4.4) se zabýváme přítomností MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem a její prognostickou hodnotou. Ve sledované skupině 147 pacientů s kolorektálním karcinomem klinického stádia I-III došlo u 24 (16,3%) k rozvoji recidivy nádorového onemocnění. Medián sledování byl 22,9 měsíců. Přítomnost MRD byla detekována v peroperačních vzorcích krve a kostní dřeně 51,7% pacientů za použití QRT-PCR pro CEA a CK20. V kontrolních vzorcích 1 měsíc po operaci byla detekována přítomnost MRD u 47% pacientů. Pacienti s pozitivitou MRD v peroperačním vzorku krve za použití CEA (Obr. 10A) a v kontrolním vzorku za pomoci CK20 (Obr. 10D) měli statisticky významně kratší DFS ($p = 0,05$, resp. $p = 0,0005$) a vyšší riziko vzniku recidivy onemocnění ($HR = 2,726$, resp. $HR = 3,729$). Obdobně bylo zjištěno, že pacienti s přítomností MRD v kontrolním vzorku kostní dřeně za použití CEA (Obr. 11B) a za použití kombinace CEA a CK20 (Obr. 11F) měli statisticky významně kratší DFS ($p = 0,01$, resp. $p = 0,00035$) a vyšší riziko vzniku recidivy onemocnění ($HR = 3,328$, resp. $HR = 3,746$), než pacienti bez přítomnosti MRD v kontrolním vzorku kostní dřeně. Dále nás zajímala skupina pacientů, u nichž QRT-PCR vyšetření neprokazovalo přítomnost MRD ani v peroperačních, ani v kontrolních vzorcích měsíc po operaci, ale výsledky indikovaly nárůst exprese epiteliálních markerů pro možnou přítomnost nádoru. Bylo zjištěno, že již 60% zvýšení exprese CEA v kostní dřeni, které však stále nedosahuje cut-off hodnot pro pozitivitu MRD, identifikuje statisticky významně ($p = 0,005$) pacienty s kratším DFS a vyšším rizikem vzniku recidivy ($HR=3,283$) (Obr. 12). Vzhledem k interindividuální variabilitě v expresi jednotlivých markerů lze předpokládat, že tyto pacienti mají již primárně velmi nízkou cut-off hodnotu exprese CEA. Výsledky naší studie ukazují, že nejenom MRD pozitivita, ale také dynamika exprese markerů může identifikovat rizikové pacienty.

Při hodnocení přítomnosti MRD jako nezávislého prognostického faktoru byla porovnána MRD pozitivita v krvi a kostní dřeni v den operace a jeden měsíc po výkonu s klasickými

prognostickými faktory (TNM stádium, hloubka invazivity, postižení lymfatických uzlin, velikost tumoru, sérové hladiny onkomarkerů CEA a CA 19-9). Nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly (Tab. 11). Přítomnost MRD také nesouvisí s pohlavím, lokalizací nádoru a gradingem (Tab. 10). Byly nalezeny pouze jednotlivé rozdíly v analyzovaných skupinách, avšak bez statisticky významného zvyšujícího se trendu vzhledem k hodnoceným parametrům. Dle našich výsledků je přítomnost MRD nezávislým prognostickým faktorem (kapitoly 2.3.4.3 a 2.3.4.4).

V poslední části dizertační práce prezentujeme využití metody kvantitativní RT-PCR k objasnění mechanismu účinku nových protinádorových léčiv. Vzhledem k přesnosti absolutní kvantifikace metody QRT-PCR a díky poměrně specifické a stabilní expresi námi zavedených markerů MRD, lze tyto markery využít při sledování mechanismu účinku nových látek. Inhibitory cyklin-dependentních kináz se vyznačují v různé míře vyjádřenou schopností inhibice buněčného cyklu a transkripce. Sledovali jsme mechanismus účinku 4-arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazolu v nádorové linii kolorektálního karcinomu HT29. QRT-PCR metodou pro CEA, EpCAM a GAPDH byla zjištěna výrazná inhibice transkripce. Následnými analýzami byl zjištěn výrazný inhibiční účinek 4-arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazolu na cyklin-dependentní kinázu 9, která přímou foforylací RNA-polymerázy II kontroluje proces transkripce. Přesnou kvantifikací genové exprese metodou QRT-PCR lze přispět k objasnění mechanismus účinku nových látek s potencionálním protinádorovým účinkem. (kapitola 2.3.5)

4. Souhrn

Minimální reziduální choroba u solidních tumorů, detekovaná ať již ze vzorků krve, kostní dřeně nebo lymfatických uzlin, je předmětem výzkumu již několik let. Pro její detekci se stále častěji využívají molekulárně-biologické metody vyznačující se vysokou citlivostí, zejména metody založené na principu PCR. Za vysokou citlivostí však poněkud pokulháva specifická jednotlivých markerů používaných pro detekci okultních nádorových buněk.

Prvním cílem předkládané práce bylo zavést a optimalizovat metodu QRT-PCR pro detekci MRD u solidních tumorů. Byla provedena kompletní validace metody včetně stanovení senzitivity a specifity. Jako markery pro detekci MRD u kolorektálního karcinomu byly vybrány CEA a CK20, pro karcinom prsu poté CEA, MGB1 a CK19. Vybrané markery se vyznačují vysokou senzitivitou a specificitou.

Dále jsme se zaměřili na identifikaci nových potencionálních markerů s využitím metody DNA microarrays. V souboru vzorků karcinomu prsu byly identifikovány diferenciólně exprimované geny kódující proteiny EMPI (Epithelial membrane protein 1), DVLI (Dishevelled, dsh homolog 1), DDRI (Discoidin domain receptor family, member 1) umožňující rozlišení lobulárního a duktálního karcinomu.

Význam přítomnosti MRD u pacientů se solidními tumory byl analyzován u pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku a u pacientek s karcinomem prsu. Naše studie prokázala, že přítomnost MRD v periferní venózní krvi a kostní dřeni u nemocných s kolorektálním karcinomem zjištěná metodou QRT-PCR pro znaky CEA a CK20 je nezávislým negativním prognostickým znakem a identifikující rizikové pacienty, které dle dnešních kritérií řadíme do potenciálně časných stádií kurabilních lokální léčbou. Prokázali jsme také negativní prognostickou hodnotu MRD v kostní dřeni pacientek s karcinomem prsu a jasný trend ke kratšímu DFS u pacientek s MRD pozitivitou sentinelových uzlin.

QRT-PCR metodou pro CEA, EpCAM a GAPDH byl sledován mechanismus účinku 4-arylazo-3,5-diamino-1*H*-pyrazolu. Byla zjištěna výrazná inhibice transkripce, následnými analýzami byl potvrzen výrazný inhibiční účinek na cyklin-dependentní kinázu 9. Uvedená metoda expresní analýzy tak byla využita pro studium molekulárního účinku protinádorových léčiv.

Detekce MRD metodou QRT-PCR představuje účinný nástroj v klinické onkologii, který svým přínosem v oblasti ultrastagingu znamená zpřesnění diagnostiky a následné léčby onkologicky nemocného pacienta v duchu „správná léčba, správnému pacientovi, ve správnou chvíli“. Pro definitivní zhodnocení a zařazení vyšetření MRD do algoritmu rozhodování o podání adjuvantní léčby pacientům s kurabilním karcinomem bude potřeba delšího sledování větších souborů pacientů.

5. Summary

Minimal residual disease detection in blood, bone marrow and lymph nodes in patients with solid tumors is being investigated for several years, and the PCR based methods are the most useful techniques for MRD detection due its high sensitivity and specificity.

Optimization of QRT-PCR method for MRD detection was the first objective of this work. Complete validation of methods including determination of sensitivity and specificity was successfully performed. CK20 and CEA were selected as markers for the detection of MRD in colorectal cancer, while CEA, CK19 and MGB1 were used in breast cancer. Selected markers were typical of high sensitivity and specificity.

Another part of the study was focused on identification of novel specific biomarkers for breast cancer with potential use as biomarkers for MRD detection. We used microarrays method to analyze differentially expressed genes in breast cancer (ductal versus lobular subtypes) and the proteins EMPI (Epithelial membrane protein 1), DVLI (Dishevelled, dsh homolog 1), DDRII (Discoidin domain receptor family, member 1) were specifically identified. These proteins allow discrimination of lobular and ductal breast cancer.

Due to tumor specific expression profiles, the MRD markers can be used also for differential diagnosis of metastases and effusions of unknown origin. Performed histopathological and immunohistochemical examinations sometimes don't lead to determining the primary origin of metastases. In such cases it is possible to use molecular-biological methods based on the PCR principle.

The significance of MRD was analyzed in two patients cohorts with colorectal and breast cancer. Our study showed that the presence of MRD in peripheral venous blood and bone marrow in patients with colorectal cancer using QRT-PCR for CEA and CK20 is an independent negative prognostic factor identifying patients at high risk of disease recurrence. We demonstrated a poor prognosis of breast cancer patients with MRD presence in the bone marrow and a clear trend towards shorter DFS in patients with MRD positive sentinel lymph nodes.

Moreover, QRT-PCR method for CEA, EpCAM and GAPDH was used for identification the mechanism of action of potential anticancer drugs 4-arylazo-3 ,5-diamino-1H-pyrazole. There was found significant inhibition of transcription, subsequent analysis had confirmed a significant inhibitory effect on cyclin-dependent kinase 9.

The presented study shows, that the detection of MRD in solid tumors is an effective tool in clinical oncology, which contributes to the more precise diagnosis and subsequent treatment of cancer patient in the spirit of "The right treatment to the right patient at the right time".

However, for the final evaluation and inclusion of MRD testing into the standard diagnostic algorithm of early cancer patients we will need a more extensive studies.

6. Seznam použité literatury

1. Pantel K., Cote R.J., Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*, 1999 Jul 7, 91(13), 1113 - 24.
2. Wang J., Wu Ch., Lu Ch., et al. Molecular Detection of Circulating Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Colorectal Cancer Using RT-PCR: Significance of the Prediction of Postoperative Metastasis. *World J Surg*, 2006, 30, 1007 - 1013.
3. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, 25, 169 - 193.
4. Liotta L. A., Stetler – Stevenson W. G. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res*, 1991, 51(18), 5054-59.
5. Hagenbeek A. Minimal residual disease in leukemia: state of the art 1991. *Leukemia*, 1992, 6(2), 12 - 16.
6. Fehm T., Sagalowsky A., Clifford E., et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res*, 2002, 8, 2073 – 2084.
7. Martin V. M., Siewert C., Scharl A., et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol*, 1998, 26, 252 – 264.
8. Naume B., Borgen E., Beiske K., et al. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J Hematother*, 1997, 6, 103 – 114.
9. Tsavellas G., Huang A., McCullough T., et al. Flow cytometry correlates with RT-PCR for detection of spiked but not circulating colorectal cancer cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2002, 19, 495 – 502.
10. Ward M. S. The use of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of malignant hematological disorders. *Pathology* 1999, 31(4), 382 – 392.
11. Dieffenbach C.W., Dveksler G.S. PCR primer a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
12. Maguire D., O' Sullivan G. C., Collins J. K., et al. Bone Marrow Micrometastases and Gastrointestinal Cancer Detection and Significance. *The American Journal of Gastroenterology*, 2000, 95(7).
13. Ring A., Smith I. E., Dowset M. Circulating tumour cells in breast cancer. *The Lancet Oncology*, 2004, 5, 79 – 88.
14. Amutan M., Batey D. Real-Time Quantification of Genomic DNA using DyNAzyme II DNA Polymerase and SYBR Green I Dye. *MJ Research Application Note*, 1(1).
15. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, 29, 23 - 39.
16. Smith B. M., Slade M. J., 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. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, 18(7), 1432 – 1439.
17. Lambrechts A. C., Bosma A. J., Klaver S. G., et al. Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1999, 56, 219 – 231.
18. Slade M. J., Smith B. M., Sinnet H. D., et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999, 17, 870 – 879.

19. Watson M. A., Fleming T. P. Mammaglobin, a mammary-specific member of uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*, 1996, 56, 860 – 865.
20. Zehenter B. K., Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clinical Biochemistry*, 2004, 37, 249 – 257.
21. Watson M. A., Dintzis S., Darrow Ch. M., Voss L. E. et al. Mammaglobin Expression in Primary Metastatic, and Occult Breast Cancer. *Cancer Research*, 1999, 59, 3028 – 3031.
22. Núñez-Villar M. J., Martínez-Arribas F., Pollán M., et al. Elevated mammaglobin a(h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res*, 2003, 5(3), 65 – 67.
23. Grünewald K., Haun M., Urbanek M., Fiegl M., Müller-Holzner E., Günsilius E., Dünser M., Marth Ch., Gastl G. Mammaglobin gene expression: A superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Laboratory Investigation*, 2000, 80(7), 1071 - 1077.
24. Sjodin A., Guo D., Hofer P., et al. Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors. *The Society for Investigative Dermatology*, 2003, 121(2).
25. Tanaka Y., Amos K. D., Fleming T. P., et al. Mammaglobin-A is a tumor-associated antigen in human breast carcinoma. *Surgery*, 2003, 133(1), 74 – 80.
26. Corradini P., Voena C., Astolfi M., Dell'Oro S., Pilotti S., Arrigoni G., Bregni M., Pileri A., Gianni A.M. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Annals of Oncology*, 2001, 12, 1693 - 1698.
27. Marchetti A., Buttitta F., Bertacca G., et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *Journal of Pathology*, 2001, 195, 186 – 190.
28. Zach O., Kasparu H., Krieger O., et al. Detection of Circulating Mammary Carcinoma Cells in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients Via a Nested Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Assay for Mammaglobin mRNA. *Journal of Clinical Oncology*, 1999, 17(7), 2015 – 2019.
29. Silva J. M., Dominguez G., Silva J., et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7, 2821 – 2825.
30. Min J., Tafra L., Verbanac K. Identification of Superior Markers for Polymerase Chain Reaction Detection of Breast Cancer Metastases in Sentinel Lymph Nodes. *Cancer Research*, 1998, 58, 4581 – 4584.
31. Lin Y., Chen S., Hsueh S., et al. Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. *Cancer Sci*, 2003, 94(1), 99 – 102.
32. Han J., Kang Y., Shin H., et al. Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2003, 127.
33. Bossolasco P., Ricci C., Farina G., et al. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for mammaglobin gene. *Cancer Detection and Prevention*, 2002, 26, 60 – 63.
34. Ignatiadis M., Kallergi G., Ntoulia M., et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2008 May 1, 14(9), 2593 - 600.
35. Iakovlev V.V., Goswami R.S., Vecchiarelli J., et al. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat*, 2008 Jan, 107(1), 145 - 54.

36. Coulombe P. A., Omary M. B. Hard and soft principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 14, 110 – 122.
37. Moll R., Franke W. W., Schiller D. L. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1982, 31, 11 – 24.
38. Schoenfeld A., Kruger K. H., 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. *European Journal of Cancer*, 1997, 33(6), 854 – 861.
39. Manzotti M., Dell’Orto P., Maisonneuve P., et al. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for Multiple mRNA Markers in the Detection of Breast Cancer Metastases in Sentinel Lymph Nodes. *Int. J. Cancer*, 2001, 95, 307 – 312.
40. Berois N., Varangot M., Aizen B., et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK 19, MUC 1 and CEA using RT-PCR. *European Journal of Cancer*, 2000, 36, 717 – 723.
41. Fehm T., Hoffmann O., Aktas B., et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by reverse-transcriptase polymerase chain reaction and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res*, 2009 Aug 10, 11(4).
42. Daskalaki A., Agelaki S., Perraki M., et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer*, 2009 Aug 18, 101(4), 589-97.
43. Wong I. H. N., Yeo W., Chan A. T., Johnson P. J. Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Dukes` stage, serum carcinoembryonic antigen level and tumor progression. *Cancer Letters*, 2001, 162, 65 – 73.
44. Lassmann S., Bauer M., Soong R., Schreglmann J., Tabiti K., Nährig J., Rürger R., Höfler H., Werner M. Quantification of CK 20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR and immunohistochemistry reveals inter- and intratumor heterogeneity. *J Pathol*, 2002, 198, 198 – 206.
45. Vlems F. A., Diepstra J. H. S., Cornelissen I. M. H. A., Ruers T. J. M., Ligtenberg M. J. L., Punt C. J. A., van Krieken J. H. J. M., Wobbes Th., van Muijen G. N. P. 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. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2002, 55, 156 – 163.
46. Kruger W. H., Jung R., Detlefsen B., et al. Interference of cytokeratin-20 and mammaglobin reverse-transcriptase polymerase chain assays designed for the detection of disseminated cancer cells. *Medical Oncology*, 2001, 18(1), 33 – 38.
47. Miyake Y., Yamamoto H., Fujiwara Y., et al. Extensive Micrometastases to Lymph Nodes as a Marker for Rapid Recurrence of Colorectal Cancer: A Study of Lymphatic Mapping. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7, 1350 – 1357.
48. Wong S.C., Chan C.M., Ma B.B., et al. Clinical significance of cytokeratin 20-positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2009 Feb 1, 15(3), 1005 - 12.
49. Shen C., Hu L., Xia L., Li Y. Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*, 2008 Nov, 38(11), 770 - 6.

50. Silva A. L., Diamond J., Silva M. R. G., et al. Cytokeratin 20 is not a reliable molecular marker for occult breast cancer cell detection in hematological tissues. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2001, 66, 59 – 66.
51. Inoue T., Nakanishi H., Inada K., et al. Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction of urinary cytokeratin 20 detects transitional cell carcinoma cells. *The Journal of Urology*, 2001, 166, 2134 – 2141.
52. Champelovier P., Mongelard F., Seigneurin D. CK 20 Gene Expression: Technical Limits for the Detection of Circulating Tumour Cells. *Anticancer Research*, 1999, 19, 2073 – 2078.
53. Kao R.H., Huang L.C. High false-positive rate of cytokeratin-19 in detecting circulating tumor cells for nasopharyngeal carcinoma. *Chang Gung Med J*, 2002 Apr, 25(4), 238 - 44.
54. Takano H., Okamoto A., Fukushima K., et al. Low specificity of cytokeratin 19 mRNA expression in the peripheral blood cells from patients with ovarian tumors. *Oncol Rep*, 2000 Sep-Oct, 7(5), 1023 - 5.
55. Zimmermann W., Weber B., Ortlieb B., et al. Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res*, 1988, 48, 2550 – 2554.
56. Aquino A., Formica V., Prete S. P., et al. Drug-induced increase of carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Pharmacological Research*, 2004.
57. Macdonald J. S. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Semin Ocol*, 1999, 26, 556 – 560.
58. Mitas M., Mikhitarian K., Walters Ch. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int. J. Cancer*, 2001, 93, 162 – 171.
59. Taniguchi T., Makino M., Suzuki K., Kaibara N. Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen mRNA levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma. *American Cancer Society*, 2000, 89(5), 970 - 976.
60. Ito S., Nakanishi H., Hirai T., Kato T., Kodera Y., Feng Z., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A., Tatematsu M. Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a LightCycler. *Cancer Letters*, 2002, 183, 195 – 203.
61. Sadahiro S., Suzuki T., Tokunaga N., Yurimoto S., Yasuda S., Tajima T., Makuuchi H., Murayama Ch., Matsuda K. Detection of tumor cells in a portal and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma using competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *American Cancer Society*, 2001, 92(5), 1251 – 1258.
62. Okami J., Dohno K., Sakon M, et al. Genetic Detection for Micrometastases in Lymph Node of Biliary Tract Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6, 2326 – 2332.
63. Kubota K., Nakanishi H., Hiki N., et al. Quantitative detection fo micrometastases in the lymph nodes of gastric cancer patients with real-time RT-PCR: A comparative study with immunohistochemistry. *Int. J. Cancer*, 2003, 105, 136 – 143.
64. Goemine J. C., Guillaume T., Salmon M., et al. Unreliability of carcinoembryonic antigen reverse transcriptase-polymerase chain reaction in detecting contaminating breast cancer cells in peripheral blood stem cells due to induction od CEA by growth factors. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 24, 769 – 775.
65. De Luca A., Pignata S., Casamassimi A., et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Carcinoma Patients by a Novel Epidermal Growth Factor Receptor Reverse Transcription-PCR Assay. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6, 1439 – 1444.

66. Kune G.A., Kune S., Field B., et al Survival in patients with large-bowel cancer. A population-based investigation from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Dis. Colon Rectum*, 1990, 33, 938 – 946.
67. Bohm B., Schwenk W., Huckle H.P., et al. Does methodic long-term follow-up affect survival after curative resection of colorectal carcinoma? *Dis Colon Rectum*, 1993, 36, 280 – 286.
68. Mitchell P.J., Ravi S., Griffiths B., et al. Multicentre review of lymph node harvest in colorectal cancer. Are we understaging colorectal cancer patients? *Int J Colorectal Dis* (in press), 2009 Apr 23.
69. Tsavellas G., Patel H., Allen-Mersh T.G. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 2001, 88, 1307 – 1320.
70. Uen Y., Lin S., Wu D., et al. Prognostic significance of multiple molecular markers for patients with stage II colorectal cancer undergoing curative surgery. *Annals of Surgery*, 2007, 256(6), 1040 – 1046.
71. Uen Y., Lu Ch., Tsai H., et al. Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. *Annals of Surgical Oncology*, 2008, 15(8), 2120 – 2128.
72. Allen-Mersh T.G., McCullough T., Patel H., et al. Role of circulating tumor cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. *British Journal of Surgery*, 2007, 94, 96 – 105.
73. Sadahiro S., Suzuki T., Maeda Y., et al. Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA-expressing cells in peripheral blood 7 days after curative surgery is a novel prognostic factor in colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 2007, 14(3), 1092 - 1098.
74. Peto R., Boreham J., Clarke M., Davies C., Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet*, 2000 May 20, 355(9217), 1822.
75. Zehentner B.K., Secrist H., Hayes D.C., Zhang X., Ostenson R.C., Loop S., Goodman G., Houghton R.L., Persing D.H. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of breast cancer patients during or after therapy using a multigene real-time RT-PCR assay. *Mol Diagn Ther*, 2006, 10(1), 41 - 7.
76. Kurosumi M., Takei H. Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *Breast Cancer*, 2007, 14(4), 342 - 9.
77. Gimbergues P., Dauplat M.M., Cayre A., Durando X., Le Bouedec G., Finat-Duclos F., Portefaix G., Kwiatkowski F., Dauplat J., Penault-Llorca F., Tchirkov A. Correlation between molecular metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients and St Gallen risk category. *Eur J Surg Oncol*, 2007 Feb, 33(1), 16 - 22.
78. Benoy I.H., Elst H., Philips M., Wuyts H., Van Dam P., Scharpé S., Van Marck E., Vermeulen P.B., Dirix L.Y. 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 Mar 13, 94(5), 672 - 80.
79. Braun S., Pantel K. Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *Oncologist*, 2001, 6, 125 - 32.
80. Gebauer G., Fehm T., Merkle E., Beck E.P., Lang N., Jäger W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 2001 Aug 15, 19(16), 3669 – 74.
81. Funke I., Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol*, 1998 Feb, 16(2), 557 - 66.

82. Janku F., Kleibl Z., Novotny J., Tesarova P., Petruzelka L., Matous B. Mammaglobin A, a novel marker of minimal residual disease in early stages breast cancer. *Neoplasma*, 2004, 51, 204 - 8.
83. Jung Y.S., Lee K.J., Kim H.J., Yim H.E., Park J.S., Soh E.Y., Kim M.W., Park H.B. Clinical significance of bone marrow micrometastasis detected by nested rt-PCR for keratin-19 in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*, 2003 Apr, 33(4), 167 - 72.
84. Pantel K., Schlimok G., Angstwurm M., Weckermann C., Schmaus W., Gath H., et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumour cells in bone marrow. *J Hematother*, 1994, 3, 165 - 73.
85. Klein C.A., Blankenstein T.J., Schimdt-Kittler O., et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet*, 2002, 360, 683 – 689.
86. Yamaguchi K., Takagi Y., Aoki S., et al. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg*, 2000, 232, 58 – 65.
87. Patel H., Marer N.L., Wharton R.Q., et al. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann Surg*, 2002, 235, 226 – 231.
88. Tsouma A., Aggeli Ch., Pissimissis N., et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection methods and clinical significance. *Anticancer Research*, 2008, 28, 3945 – 3960.
89. Racila E., Euhus D., Weiss A.J., et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95, 4589 – 4594.
90. Conzelmann M., Linnemann U., Berger M.R. Molecular detection of clinical colorectal cancer metastasis: how should multiple markers be put to use? *Int J Colorectal Dis*, 2005, 20, 137 – 146.
91. Soeth E., Vogel I., Röder Ch., et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Reserch*, 1997, 57, 3106 – 3110.
92. Wolfrum F., Vogel I., Fändrich F., et al. Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *Langenbecks Arch Surg*, 2005, 390, 430 – 441.
93. 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.
94. Guadagni F., Kantor J., Aloe S., et al. Detection of bloodborne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res*, 2001, 61, 2523 – 2532.
95. Miura M., Ichikawa Y., Tanaka K., et al. Real-time PCR (TaqMan PCR) quantification of carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Anticancer Res*, 2003, 23, 1271 – 1276.
96. Iinuma H., Okinaga K., Egami H., et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol*, 2006, 28, 297 – 306.
97. Zhang X.W., Yang H.Y., Fan P., et al. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2005, 11, 436 – 438.
98. Silva J.M., Rodriguez R., Garcia J.M., et al. Detection of epithelial tumour mRNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut*, 2002, 50, 530 – 534.

99. Piva M.G., Navaglia F., Basso D., et al. *CEA* mRNA identification in peripheral blood is feasible for colorectal, but not for gastric or pancreatic cancer staging. *Oncology*, 2000, 59, 323 – 328.
100. Katsumata K., Sumi T., Mori Y., et al. Detection and evaluation of epithelial cells in the blood of colon cancer patients using RT-PCR. *Int J Clin Oncol*, 2003, 129, 192 – 198.
101. Schuster R., Max N., Mann B., et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer*, 2004, 108, 219 – 227.
102. Gerhard M., Juhl H., Kalthoff H., Schreiber H.W., Wagener C., Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen- expressing tumour cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*, 1994, 12, 725 - 29.
103. Zhong X.Y., Kaul S., Thompson J., Eichler A., Bastert G. Evaluation of the reverse transcriptase/polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen for the detection of breast cancer dissemination in bone marrow and peripheral blood. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1999, 125, 669 - 74.
104. Berois N., Varangot M., Sonora C., Zarantonelli L., Pressa C., Lavina R., et al. Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RTPCR assay of MUC5B mRNA. *Int J Cancer*, 2003, 103, 550 - 5.
105. Braun S., Vogl F.D., Pantel K. Disseminated tumour cells (DTC) in bone marrow (BM) and clinical outcome: Final results of pooled analysis on 10-year survival of 4703 breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 2005, 23, No 16S (June 1 Supplement): #502.
106. Van Zee K.J., Manasseh D.M., Bevilacqua J.L., et al. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10(10), 1140 – 50.
107. Alran et al. Validation and limitations of use of a breast cancer nomogram predicting the likelihood of non-sentinel node involvement after positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(7), 2195 - 201.
108. Gillanders, W.E., et al. Molecular Detection of Micrometastatic Breast Cancer in Histopathology-Negative Axillary Lymph Nodes Correlates With Traditional Predictors of Prognosis *Annals of Surgery*, 2004, 239, 828 – 840.
110. Trudeau W., Shivers S., Stall A., et al. Detection of metastases in the sentinel lymph nodes of breast cancer patients by mammaglobin and carcinoembryonic antigen RT-PCR. *Eur J Nucl Med*, 1999, 26, 55.

7. Přehled publikací autora

7.1 Původní a přehledové práce

1. DZIECHCIARKOVÁ, M. – BERKOVCOVÁ, J. – TROJANEC, R. – SROVNAL, J. – BOUCHALOVÁ, K. – HAJDÚCH, M. Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz. (The utilization of laser capture microdissection for construction of specific samplex from cancer tissue, in order to microgenomic analyse). *Klinická onkologie*, 2006, vol. 19, Supplement, s. 355-360. ISSN: 0862-495X Bez IF. DEDIKACE: MŠMT 6198959216, NR/9076, 1H-PK45.
2. SLABÝ, O. – GARAJOVÁ, I. – SVOBODA, M. – FABIÁN, P. – SVOBODA, M. – SROVNAL, J. – ŠMERDOVÁ, T. – KOCÁKOVÁ, I. – ŠEFR, R. – JECH, Z. – HOCH, J. – VYZULA, R. Pilotní studie identifikace prognostických markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem analýzou profilů genové exprese. (Identification of colorectal cancer prognostic markers by gene expression profiles analysis: pilot study). *Klinická onkologie*, 2006, vol. 19, Supplement, s. 402-406. ISSN: 0862-495X Bez IF. DEDIKACE: IGA NR/9076-4, MSM 6198959216.
3. JANKŮ, F. – SROVNAL, J. – KOŘÍNKOVÁ, G. – PETRUŽELKA, L. – MATOUŠ, B. – HAJDÚCH, M. Detekce minimální residuální choroby v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu technikou kvantitativní RT-PCR v reálném čase pro karcinoembryonální antigen. (Detection of minimal residual disease in the bone marrow of early breast cancer patients using quantitative Real-Time RT-PCR for carcinoembryonic antigen. *Klinická Onkologie*, 2006, vol. 19., no. 1, p. 15-18. ISSN: 0862-495X Bez IF. DEDIKACE: IGA MZCR NR7804, MSM0021620808, MSM 6198959216.
4. DUDA, M. – VYSLOUŽIL, K. – SKALICKÝ, P. – KLEMENTA, I. – STARÝ, L. – HAJDÚCH, M. – SROVNAL, J. – KOŘÍNKOVÁ, G. Minimální reziduální nádorová choroba u kolorektálního karcinomu – nový prognostický marker v onkochirurgii. *Slovenská chirurgia*, 2006, 3, 16 – 22. Bez IF. DEDIKACE: IGA MZCR NR7804
5. DUDA, M. – VYSLOUŽIL, K. – SKALICKÝ, P. – KLEMENTA, I. – STARÝ, L. – DLOUHÝ, M. – CWIERTKA, K. – SROVNAL, J. – KOŘÍNKOVÁ, G. - HAJDÚCH, M. Aktivní přístup k léčbě jaterních metastáz u kolorektálního karcinomu. *Slovenská chirurgia*, 2006, 3, 4 - 7. Bez IF. DEDIKACE: IGA MZCR NR7804
6. KRYŠTOF, V. – CANKAŘ, P. – FRYŠOVÁ, I. – SLOUKA, J. – KONTOPIDIS, G. – DŽUBÁK, P. – HAJDÚCH, M. – SROVNAL, J. – de AZAVEDO, W. F.jr. – ORSÁG, M. – PAPRSKÁŘOVÁ, M. – ROLČÍK, J. – LÁTR, A. – FISCHER, P. M. – STRNAD, M. 4-Arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK Inhibitors: SAR Study, Crystal Structure in Complex with CDK2, Selectivity, and Cellular Effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, vol. 49, no. 22, p. 6500-6509. ISSN: 0022-2623 IF(2005): 4.926. DEDIKACE: GACR Grant 204/03/D231, MSMT Grant 6198959216, FAPESP 01/07532-0.
7. TURASHVILI, G. – BOUCHAL, J. – BAUMFORTH, K. – WEI, W. – DZIECHCIARKOVÁ, M. – HERMANN, J. – KLEIN, J. – FRIDMAN, E. –

- ŠKARDA, J. – SROVNAL, J. – HAJDÚCH, M. – MURRAY, P. – KOLÁŘ, Z.: Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer*, 2007, vol. 7, s. 55. ISSN: 1471-2407 (electronic) IF(2006): 2.359. DEDIKACE: NR 7844-3, NR 8425-3, MSM 6198959216.
8. DZIECHCIARKOVA, M. - BERKOVCOVA, J. - TROJANEC, R. - SROVNAL, P. - BOUCHALOVA, K. - HAJDUCH, M. Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz (Application of laser capture microdissection in preparation of complex malignant tissue samples for microgenomic analyses). *Klinická onkologie* 2007, vol. 20, s. 323-9. ISSN: 0862-495X. BEZ IF
9. JANKU, F. – SROVNAL, J. – KORINKOVA, G. – NOVOTNY, J. – PETRUZELKA, L. – POWER, D. – MATOUS, B. – HAJDUCH, M. Molecular detection of disseminated breast cancer cells in the bone marrow of early breast cancer patients using quantitative RT PCR for CEA. *Neoplasma*, 2008, vol. 55, no. 4, s. 321 – 326. ISSN: 0028-2685. IF(2007): 1.208. DEDIKACE: NR7804, MPO1H-PK45, MSM0021620808, MSM6198959216.
10. HRABÁLEK, L. – KALITA, O. – EHRMANN, J. – SROVNAL, J. – HAJDÚCH, M. Spinal Cord Metastasis of Adenocarcinoma - Case Report. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2008, vol. 71, no. 5, s. 583-587. ISSN: 1210-7859. IF (2007): 0.037. DEDIKACE: LC07017, MSM 6198959216, MPO 1H-PK/45.

7.2 Publikovaná abstrakta

1. SROVNAL, J. - KESSELOVA, M. - VYSLOUZIL, K. - SKALICKY, P. - STRAZNICKA, J. - SRAMEK, V. - CWIERTKA, K. - RUZKOVA, V. - RADOVA, L. - HAJDUCH, M. The minimal residual disease an independent negative prognostic factor in colorectal cancer patients. In Sborník abstraktů a přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 24-26.5.2009, Hustopeče, 2009, s. 24.
2. RESUTÍKOVÁ, L. – KESSELOVÁ, M. – SROVNAL, J. – HAVLÍK, R. – KLOS, D. – RŮŽKOVÁ, V. – RADOVÁ, L. – HAJDÚCH, M. Telomeráza (hTERT) a její možnosti jako prognostického markeru pro posouzení minimální reziduální choroby u pacientů s karcinomem pankreatu. In Edukační sborník, XXXIII. Brněnské onkologické dny, 16.-18. dubna 2009, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2009, s. 37. (ISBN: 978-80-86793-12-2).
3. SROVNAL, J. – KESSELOVÁ, M. – VYSLOUŽIL, K. – SKALICKÝ, P. – STARÝ, L. – KLEMENTA, I. – DUDA, M. – STRÁŽNICKÁ, J. – ŠRÁMEK, V. – CWIERTKA, K. – BÍLKOVÁ, R. – RŮŽKOVÁ, V. – RADOVÁ, L. – HAJDÚCH, M. Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů operovaných pro kolorektální karcinom – výsledky tříletého sledování. In Edukační sborník, XXXIII. Brněnské onkologické dny, 16.-18. dubna 2009, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2009, s. 272. (ISBN: 978-80-86793-12-2).
4. KESSELOVÁ, M. – SROVNAL, J. – RESUTÍKOVÁ, L. – HAVLÍK, R. – KLOS, D. – RŮŽKOVÁ, V. – RADOVÁ, L. – HAJDÚCH, M. Minimal residual disease as a new prognostic factor in pancreatic carcinoma patients. In Programme and abstract book. The 5th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry. The 92nd Olomouc Slide Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology Congress of Histology Laboratory Technicians, 24.-25. dubna 2009, Olomouc: Regionální centrum a Ústav patologie LF UP, 2009, s. 28. (ISBN: 978-80-87327-07-4).
5. SROVNAL, J., - KESSELOVÁ, M., - KOŘÍNKOVÁ, G., - VYSLOUŽIL, K., - SKALICKÝ, P., - STARÝ, L., - KLEMENTA, I., - DUDA, M., - STRÁŽNICKÁ, J., - ŠRÁMEK, V., - CWIERTKA, K., - BÍLKOVÁ, R., - RŮŽKOVÁ, V., - RADOVÁ, L., - HAJDÚCH, M. Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů operovaných pro kolorektální karcinom – výsledky tříletého sledování. In Onkologie abstrakta - IV. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. I. Symposium o cílené biologické léčbě, 26.-28. listopadu 2008, Laboratoř experimentální medicíny LF UP při Dětské klinice FN Olomouc, 2008, p. 21-22. (ISSN: 1803-5922).
6. KESSELOVÁ, M., - SROVNAL, J., - VYSLOUŽIL, K., - SKALICKÝ, P., - STRÁŽNICKÁ, J., - ŠRÁMEK, V., - CWIERTKA, K., - BÍLKOVÁ, R., - RŮŽKOVÁ, V., - HAJDÚCH, M. Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů operovaných pro kolorektální karcinom – výsledky tříletého sledování. XXXII. Brněnské onkologické dny, 17. - 19. 4. 2008, Brno, 2008, s. 256-257. (ISBN: 978-9780-86793-11-5).
7. SROVNAL, J., - KESSELOVÁ, M., - KOŘÍNKOVÁ, G., - ŠVACH, I., - ZLÁMALOVÁ, N., - NEORAL, Č, ŠVÉBIŠOVÁ, H., - BENEŠ, P., - CWIERTKA,

- K., - BÍLKOVÁ, R., - RŮŽKOVÁ, V., - HAJDÚCH, M. Prognostický význam mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu – výsledky tříletého sledování. XXXII. Brněnské onkologické dny, 17. - 19. 4. 2008, Brno, 2008, s. 309-310. (ISBN: 978-9780-86793-11-5).
8. KESSELOVÁ, M., - SROVNAL, J., - VYSLOUŽIL, K., - SKALICKÝ, P., - STRÁŽNICKÁ, J., - ŠRÁMEK, V., - CWIERTKA, K., - BÍLKOVÁ, R., - RŮŽKOVÁ, V., - HAJDÚCH, M. Prognostic value of minimal residual disease in colorectal cancer patients - results of three years follow-up. Seminář Výzkumného záměru, 22. – 24. 5. 2008, Karlov pod Pradědem, 2008, s. 4.
 9. SROVNAL, J., - KESSELOVÁ, M., - KOŘÍNKOVÁ, G., - ŠVACH, I., - ZLÁMALOVÁ, N., - NEORAL, Č., - ŠVÉBIŠOVÁ, H., - BENEŠ, P., - CWIERTKA, K., - BÍLKOVÁ, R., - RŮŽKOVÁ, V., - HAJDÚCH, M. Prognostic value of micrometastatic involvement of sentinel lymph nodes in breast cancer patients – three years follow-up. Seminář Výzkumného záměru, 22. – 24. 5. 2008, Karlov pod Pradědem, 2008, s. 5.
 10. KESSELOVÁ, M. – SROVNAL, J. – KOŘÍNKOVÁ, G. – VYSLOUŽIL, K. – DUDA, M. – SKALICKÝ, P. – CWIERTKA, K. – ŠVÉBIŠOVÁ, H. – GAJOVÁ, B. – HAJDÚCH, M. CEA vs. EGFR1 vs. CK 20 - který marker je nejvhodnější pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s kolorektálním karcinomem? In III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 28-30 listopad 2007, 2007 Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Lékařská fakulta. Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 2007. s. 43. (ISBN: 978-80-244-1824-7).
 11. SROVNAL, J. - KESSELOVA, M. - KORINKOVA, G. - VYSLOUŽIL, K. - DUDA, M. - SKALICKY, P. - CWIERTKA, K. - HAJDUCH, M. CORELation of CEA and Ca 19-9 serum levels with CEA expression and clinical characteristics of colorectal cancer patients. In Book of Abstracts, International Conference Analytical Cytometry IV 23-26 června, 2007 Brno, ČR. Brno: Czech Society for Analytical Cytology, 2007. s. 75. (ISBN: 978-80-239-9591-6)
 12. KESSELOVA, M.; - SROVNAL, J.; - KORINKOVA, G.; - VYSLOUZIL, K.; - DUDA, M.; - SKALICKY, P.; - CWIERTKA, K.; - HAJDUCH, M. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using Real-time RT-PCR method. In Book of Abstracts, International Conference Analytical Cytometry IV 23-26 června, 2007 Brno, ČR. Brno: Czech Society for Analytical Cytology, 2007. s. 47. (ISBN: 978-80-239-9591-6)
 13. SROVNAL, J. – KESSELOVA, M. – KOLEK, V. - CWIERTKA, K. – HAJDUCH, M. Thyroid Transcription factor 1 in lung cancer patients. In Sborník abstraktů přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 10-12 May, 2007, Karlov p. Pradědem, ČR. s. 35.
 14. KESSELOVA, M. – SROVNAL, J. – KOŘÍNKOVA, G. – CWIERTKA, K. – HAJDUCH, M. Comparison of EGFR and EGFRVIII gene expression in most common tumors. In Sborník abstraktů přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 10-12 May, 2007, Karlov p. Pradědem, ČR. s. 34.

15. SROVNAL, J.; - KESSELOVÁ, M.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - KOLEK, V.; - GRYGÁRKOVÁ, I.; - CWIERTKA, K.; - ŠVĚBIŠOVÁ, H.; - GAJOVÁ, B.; - HAJDÚCH, M. Thyreoid transcription factor 1 u karcinomu plic: diagnostický marker minimální residuální choroby. In Edukační sborník, XXXI. Brněnské onkologické dny, 23.-25. dubna 2007, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007, p. 77. (ISBN: 978-9780-86793-09-2)
16. KESSELOVÁ, M.; - SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ G.; - , K.; - DUDA, M.; - SKALICKÝ P.; - CWIERTKA, K.; - ŠVĚBIŠOVÁ, H.; - GAJOVÁ, B.; - HAJDÚCH, M. EGFR a CEA jako markery minimální residuální choroby u kolorektálního karcinomu. In Edukační sborník, XXXI. Brněnské onkologické dny, 23.-25. dubna 2007, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007, p. 73. (ISBN: 978-9780-86793-09-2)
17. SROVNAL, J.; - KESSELOVÁ, M.; - KOŘÍNKOVÁ G.; - VYSLOUŽIL, K.; - DUDA, M.; - SKALICKÝ P.; - CWIERTKA, K.; - ŠVĚBIŠOVÁ, H.; - GAJOVÁ, B.; - HAJDÚCH, M. Korelace sérových hladin CEA a CA 19-9 s expresí CEA a klinickopatologickými charakteristikami nemoci u kolorektálního karcinomu. In Edukační sborník, XXXI. Brněnské onkologické dny, 23.-25. dubna 2007, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007, p. 70. (ISBN: 978-9780-86793-09-2)
18. KESSELOVÁ, M.; - SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - VYSLOUŽIL, K.; - DUDA, M.; - SKALICKÝ, P.; - CWIERTKA, K.; - ŠVĚBIŠOVÁ, H.; - GAJOVÁ, B.; - HAJDÚCH, M. EGFR a CEA jako markery minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu. In Sborník abstraktů a přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 18.-20.12.2006, Olomouc, p. 23.
19. SROVNAL, J.; - KESSELOVÁ, M.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - VYSLOUŽIL, K.; - DUDA, M.; - SKALICKÝ, P.; - CWIERTKA, K.; - ŠVĚBIŠOVÁ, H.; - GAJOVÁ, B.; - HAJDÚCH, M. Korelace sérových hladin CEA a CA 19-9 s expresí CEA a klinickopatologickými charakteristikami nemocí u kolorektálního karcinomu. In Sborník abstraktů a přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 18.-20.12.2006, Olomouc, p. 22.
20. SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - VYSLOUŽIL, K.; - DUDA, M.; - KLEMENTA, I.; - SKALICKÝ, P.; - ZLÁMALOVÁ, N.; - ŠVACH, I.; - ŠVĚBIŠOVÁ, H.; - CWIERTKA, K.; - MINAŘÍK, J.; - HAJDÚCH, M. Minimální reziduální choroba u solidních nádorů. In Konference vědeckých prací studentů DSP abstrakta, 11.-12.10.2006, Olomouc: Univerzita Palackého, 2006, p. 37. (ISBN: 80-244-1447-3)
21. SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - ŠVĚBIŠOVÁ, H.; - CWIERTKA, K.; - MINAŘÍK, J.; - ZLÁMALOVÁ, N.; - ŠVACH I.; - STEHLÍK, D.; - HAJDÚCH, M. Detekce mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR. In Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 152. (ISBN: 80-86793-06-0)
22. VYSLOUŽIL, K.; - DUDA, M.; - KLEMENTA, I.; - SKALICKÝ, P.; - STARÝ, L.; - ZBOŘIL, P.; - CWIERTKA, K.; - SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - HAJDÚCH, M. Opakované operace a derivační výkony u karcinomu rekta. In Edukační sborník,

XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 175. (ISBN: 80-86793-06-0)

23. DUDA, M.; - VYSLOUŽIL, K.; - SKALICKÝ, P.; - KLEMENTA, I.; - DLOUHÝ, M.; - ZBOŘIL, P.; - CWIERTKA, K.; - SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - HAJDÚCH, M. Opakované operace jaterních metastáz u kolorektálního karcinomu. In Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 177. (ISBN: 80-86793-06-0)
24. SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - BÍLKOVÁ, R.; - RŮŽKOVÁ, V.; - CWIERTKA, K.; - ŠVÉBIŠOVÁ, H.; - VYSLOUŽIL, K.; - KLEIN, J.; - ŠVACH, I.; - PILKA, R.; - KALA, M.; - HAJDÚCH, M. Přínos molekulárního vyšetření při objasnění histogeneze metastáz nádorů neznámého origa. In Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 239. (ISBN: 80-86793-06-0)
25. SKALICKÝ, P.; - VYSLOUŽIL, K.; - DUDA, M.; - KLEMENTA, I.; - STARÝ, L.; - HAJDÚCH, M.; - SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G. Chirurgické aspekty minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu. In Abstrakta: Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 9.-10. prosince 2005, Olomouc: Solen, 2005, p. 24. (ISBN: 80-239-6302-3)
26. SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - VYSLOUŽIL, K.; - DUDA, M.; - SKALICKÝ, P.; - CWIERTKA, K.; - ŠVÉBIŠOVÁ, H.; - GAJOVÁ, B.; - HAJDÚCH, M. Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci. In Abstrakta: Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 9.-10. prosince 2005, Olomouc: Solen, 2005, p. 24. (ISBN: 80-239-6302-3)
27. KOŘÍNKOVÁ, G.; - SROVNAL, J.; - HAJDÚCH, M.; - ŠVACH, I.; - ZLÁMALOVÁ, N.; - ŠVÉBIŠOVÁ, H.; - CWIERTKA, K.; - MINAŘÍK, J. Detekce minimální reziduální choroby technikou PCR v reálném čase v sentinelových uzlinách u karcinomu prsu. In Abstrakta: Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 9.-10. prosince 2005, Olomouc: Solen, 2005, p. 31. (ISBN: 80-239-6302-3)
28. JANKŮ, F.; - SROVNAL, J.; - KOŘÍNKOVÁ, G.; - HAJDÚCH, M. Molekulární detekce okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu pomocí kvantitativní RT PCR pro CEA. In Abstrakta: Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 9.-10. prosince 2005, Olomouc: Solen, 2005, p. 32. (ISBN: 80-239-6302-3)
29. SROVNAL, J., - KOŘÍNKOVÁ, G., - VYSLOUŽIL, K., - DUDA, M., - SKALICKÝ, P., - CWIERTKA, K., - ŠVÉBIŠOVÁ, H., - GAJOVÁ, B., - HAJDÚCH, M.: Vyšetření minimální reziduální choroby u solidních nádorů. Sborník abstraktů. Analytická cytometrie III, s. 69-70, 2005 (ISBN: 80-239-5155-6)
30. JANKŮ, F., - SROVNAL, J., - KOŘÍNKOVÁ, G., - NOVOTNÝ, J., - PETRUŽELKA, L., - HAJDÚCH, M.: Molekulární detekce okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časnými stádii karcinomu prsu. Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, s.224-229, 2005 (ISBN: 80-86793-05-2)

31. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVĚBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Předběžné výsledky vyšetření minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemocí. Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, s.168, 2005. (ISBN: 80-86793-05-2)
32. SKALICKÝ P., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - KLEMENTA I., - STARÝ L., - HAJDÚCH M., - SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G.: Chirurgické aspekty detekce minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu. Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, s.167, 2005 (ISBN: 80-86793-05-2)
33. JANKŮ F., - KOŘÍNKOVÁ G., - SROVNAL J., - KLEIBL Z., - NOVOTNÝ J., - PETRUŽELKA L., - MATOUŠ B., - HAJDÚCH M.: Detection of breast cancer cells in the bone marrow of early breast cancer patients using quantitative RT PCR for CEA. *Journal of Clinical Oncology* 23 (16S), June 1, 870s, ASCO Annual Meeting Proceedings, 2005 (ISSN: 0732-183X)
34. KOŘÍNKOVÁ G., - SROVNAL J., - JANOŠTÁKOVÁ A., - RŮŽKOVÁ V., - DŽUBÁK P., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - CWIERTKA K., - BENEŠ P., - HAJDÚCH M.: Možnosti detekce minimální reziduální choroby u nemocných s epiteliálními nádory. (Possibilities of minimal residual disease detection for patients with epithelial tumors). Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny, s.57, 2004 (ISBN: 80-86793-01-X)
35. STAŇKOVÁ, M. – BERKOVCOVÁ, J. – SROVNAL, J. – HAHNNOVÁ, A. – HAJDÚCH, M. Minimální reziduální choroba a detekce mutací v onkogenu K-ras u pacientů s kolorektálním karcinomem. In Edukační sborník, XXXIII. Brněnské onkologické dny, 16.-18. dubna 2009, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2009, s. 276. (ISBN: 978-80-86793-12-2).
36. ŠKARDA, J., - SROVNAL, J., - RADOVÁ, L., - HAJDÚCH, M., - KLEIN, J., - KOLEK, V., - AMARIGLIO, N., - REHAVI, G. Sledování frekvence RNA editingu v kódovacích sekvencích transkriptů p53, BRCA1, CYFIP2, FLNA a BLCAP u různých typů plicních nádorů. In *Onkologie abstrakta - IV. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. I. Symposium o cílené biologické léčbě*, 26.-28. listopadu 2008, Laboratoř experimentální medicíny LF UP při Dětské klinice FN Olomouc, 2008, p. 18. (ISSN: 1803-5922).
37. HAJDÚCH, M., - DRÁBEK, J., - BERKOVCOVÁ, J., - DZIECHCIARKOVÁ, M., - SROVNAL, J., - STAŇKOVÁ, M. Mutace genu KRAS – klinické konsekvence u nádorových onemocnění. In *Onkologie abstrakta - IV. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. I. Symposium o cílené biologické léčbě*, 26.-28. listopadu 2008, Laboratoř experimentální medicíny LF UP při Dětské klinice FN Olomouc, 2008, p. 10. (ISSN: 1803-5922).
38. STAŇKOVÁ, M., - BERKOVCOVÁ, J., - SROVNAL, J., - DRÁBEK, J., - HAHNNOVÁ, A., - BÍLKOVÁ, R., - RŮŽKOVÁ, V., - KOLEK, V., - HAJDÚCH, M. Možnosti detekce mutací v genu k-ras. *Konference vědeckých prací studentů DSP 2008*. In *Abstrakta. Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Olomouc*, 3.-4. září 2008, s. 33.

39. SROVNAL, J., - BERKOVCOVÁ, J., - KESSELOVÁ, M., - VYSLOUŽIL, K., - SKALICKÝ, P., - CWIERTKA, K., - BÍLKOVÁ, R., - RŮŽKOVÁ, V., - HAJDÚCH, M. Detekce mikrosatelitní instability u pacientů s kolorektálním karcinomem. XXXII. Brněnské onkologické dny, 17. - 19. 4. 2008, Brno, 2008, s. 84. (ISBN: 978-9780-86793-11-5).
40. STAŇKOVÁ, M. – BERKOVCOVÁ, J. – SROVNAL, J. – DRÁBEK, J. – HAHNOVÁ, A. – BÍLKOVÁ, R. – RŮŽKOVÁ, V. – KOLEK, V. – HAJDÚCH, M. Možnosti detekce mutací v onkogenu k-ras. In III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 28-30 listopad 2007, 2007 Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Lékařská fakulta. Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 2007. s.38-39. (ISBN: 978-80-244-1824-7).
41. SROVNAL, J. – BERKOVCOVÁ, J. – KESSELOVÁ, M. – WIECEK, S. – STAŇKOVÁ, M. – BÍLKOVÁ, R. – RŮŽKOVÁ, V. – HAJDÚCH, M. Detekce mutací genu k-ras metodou High Resolution Melting Curve Analysis: Vzájemné srovnání metod a přístrojů na souboru 153 pacientů. In III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 28-30 listopad 2007, 2007 Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Lékařská fakulta. Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 2007. s. 39. (ISBN: 978-80-244-1824-7).
42. SLABÝ, O. – BARANOVÁ, I. – SVOBODA, M. – FABIAN, P. – BERKOVCOVÁ, J. – SROVNAL, J. – ŠMERDOVÁ, T. – SOBKOVÁ, K. – KUKULENKA, P. – VYZULA, R. Moderní molekulárně-biologické přístupy ke stanovení prognózy u pacientů s kolorektálním karcinomem. In III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 28-30 listopad 2007, 2007 Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Lékařská fakulta. Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 2007. s. 25. (ISBN: 978-80-244-1824-7).
43. TURASHVILI, G. - BOUCHAL, J. - BAUMFORTH, K. - WEI, W. - DZIECHCIARKOVA, M. - EHRMANN, J. - KLEIN, J. - FRIDMAN, E. - SKARDA, J. - SROVNAL, J. - HAJDUCH, M. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive Brest carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. In Sborník abstraktů přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 10-12 May, 2007, Karlov p.Pradědem,ČR. s.43. (ISBN: 978-80-244-1677-9)
44. DŽUBÁK, P.; - KRYŠTOF, V.; - MANKAŘ, P.; - Fryšová, I.; - SLOUKA, J.; - Kontopidis, G.; - VYDRA, D.; - SROVNAL, J.; - Azevedo, W. F.; - ORSÁG, M.; - PAPRSKÁŘOVÁ, M.; - Rolčík, J.; - Látr, A.; - Fischer, P.; - STRNAD, M.; - HAJDÚCH, M. 4-Arylazo-3,5-diamino 1H pyrazolové CDK Inhibitory: analýzy in vitro a in vivo protinádorové aktivity. In Edukační sborník, XXXI. Brněnské onkologické dny, 23.-25. dubna 2007, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007, p. 383. (ISBN: 978-9780-86793-09-2)
45. DZIECHCIARKOVÁ, M.; - BERKOVCOVÁ, J.; - TROJANEC, R.; - SROVNAL, J.; - BOUCHALOVÁ, K.; - HAJDÚCH, M. Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz. In Edukační sborník, XXXI. Brněnské onkologické dny, 23.-25. dubna 2007, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007, p. 343. (ISBN: 978-9780-86793-09-2)

46. SLABÝ, O.; - BARANOVÁ, I.; - SVOBODA, M.; - FABIAN, P.; - SVOBODA, M.; - SROVNAL, J.; - VYZULA, R. Využití profilů genové exprese primárních kolorektálních karcinomů k predikci jejich progresu a metastatického fenotypu. In Abstrakta: II. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 7.-9. prosince 2006, Olomouc: Solen, 2006, p. 46. (ISBN: 80-239-8240-0)
47. CWIERTKA, K.; - LIPERT, J.; - SROVNAL, J.; - PILKA, R.; - ŠVÉBIŠOVÁ, H.; - KUDELA, M.; - NOSKOVÁ, V.; - DŽUBÁK, P.; - TROJANEC, R.; - HAJDÚCH, M. Ovariální karcinom – ideální model pro ověření možnosti predikce odpovědi na chemoterapii stanovením rezistence na cytostatika in vitro pomocí MTT testu? In Abstrakta: Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 9.-10. prosince 2005, Olomouc: Solen, 2005, p. 20. (ISBN: 80-239-6302-3)

7.3 Seznam přednášek přednesených autorem na veřejných odborných fórech

1. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - HAJDÚCH M.: Detekce minimální reziduální choroby u solidních tumorů se zvláštním zřetelem na kolorektální karcinom. Krajský seminář Onkologické kliniky a Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 14.12.2004, Olomouc.
2. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu a její možnosti v monitorování adjuvantní terapie. X. dny profesora Vladimíra Staška, 4.-5.3. 2005, Praha.
3. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu. Doktorandské přednášky LF UP Olomouc, 24. 3. 2005, Olomouc.
4. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Předběžné výsledky vyšetření minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci. Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, s.168, 2005 (ISBN: 80-86793-05-2).
5. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Vyšetření minimální reziduální choroby u solidních nádorů. Sborník abstraktů. Analytická cytometrie III, s. 69-70, 2005 (ISBN: 80-239-5155-6).
6. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci. Seminář výzkumného záměru MSM6198959216, 2. 12. 2005, Olomouc.
7. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci. In Abstrakta: Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 9.-10. prosince 2005, Olomouc: Solen, 2005, p. 24. (ISBN: 80-239-6302-3).
8. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - HAJDÚCH M., - ŠVACH I., - ZLÁMALOVÁ N., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - MINAŘÍK J.: Detekce minimální reziduální choroby technikou PCR v reálném čase v sentinelových uzlinách u karcinomu prsu. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 9. - 10. 12. 2005, Olomouc.
9. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Metodické a

klinické aspekty detekce minimální reziduální choroby u solidních nádorů metodou real-time RT-PCR. Novinky v PCR, 19.4.2006, České Budějovice.

10. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - MINAŘÍK J., - ZLÁMALOVÁ N., - ŠVACH I., - STEHLÍK D., - HAJDÚCH M.: Detekce mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR. Krajský seminář Onkologické kliniky a Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 9. 5. 2006, Olomouc.
11. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - MINAŘÍK J., - ZLÁMALOVÁ N., - ŠVACH I., - STEHLÍK D., - HAJDÚCH M.: Detekce mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR. In Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 152. (ISBN: 80-86793-06-0).
12. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - VYSLOUŽIL K., - KLEIN J., - ŠVACH I., - PILKA R., - KALA M., - HAJDÚCH M.: Přínos molekulárního vyšetření při objasnění histogeneze metastáz nádorů neznámého origa. XXX. Brněnské onkologické dny, 11. – 13. 5. 2006, Brno.
13. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - VYSLOUŽIL K., - KLEIN J., - ŠVACH I., - PILKA R., - KALA M., - HAJDÚCH M.: Přínos molekulárního vyšetření při objasnění histogeneze metastáz nádorů neznámého origa. Seminář Sepetná 2006, 18. –20. 5. 2006, Ostravice.
14. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - KLEMENTA I., - SKALICKÝ P., - ZLÁMALOVÁ N., - ŠVACH I., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - MINAŘÍK J., - HAJDÚCH M.: Minimální reziduální choroba u solidních nádorů. In Konference vědeckých prací studentů DSP abstrakta, 11.-12.10.2006, Olomouc: Univerzita Palackého, 2006, p. 37. (ISBN: 80-244-1447-3).
15. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOLEK V., - CWIERTKA K., - HAJDÚCH M.: Thyroid transcription factor 1 u bronchogenního karcinomu. Odborný seminář Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy „Novinky v pneumoonkologii II“, 29. 11. 2006, Olomouc.
16. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - MINAŘÍK J., - ZLÁMALOVÁ N., - ŠVACH I., - STEHLÍK D., - HAJDÚCH M.: Detekce mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR. Pracovní seminář Bařova nemocnice Zlín, 30. 11. 2006, Zlín.
17. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Korelace sérových hladin CEA a CA 19-9 s expresí CEA a klinickopatologickými charakteristikami nemocí u kolorektálního karcinomu. In Sborník abstraktů a přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 18.-20.12.2006, Olomouc, p. 22.

18. SROVNAL J., - KOŘÍNKOVÁ G., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - CWIERTKA K., - ŠVĚBIŠOVÁ H., - VYSLOUŽIL K., - KLEIN J., - ŠVACH I., - PILKA R., - KALA M., - HAJDÚCH M.: Přínos molekulárního vyšetření při objasnění histogeneze metastáz nádorů neznámého origa. In Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 239. (ISBN: 80-86793-06-0).
19. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - ŠVĚBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Korelace sérových hladin CEA a CA 19-9 s expresí CEA a klinickopatologickými charakteristikami nemoci u kolorektálního karcinomu. In Edukační sborník, XXXI. Brněnské onkologické dny, 23.-25. dubna 2007, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007, p. 70. (ISBN: 978-9780-86793-09-2).
20. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - KOLEK V., - GRYGÁRKOVÁ I., - CWIERTKA K., - ŠVĚBIŠOVÁ H., - GAJOVÁ B., - HAJDÚCH M.: Thyroid transcription factor 1 u karcinomu plic: diagnostický marker minimální residuální choroby. In Edukační sborník, XXXI. Brněnské onkologické dny, 23.-25. dubna 2007, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2007, p. 77. (ISBN: 978-9780-86793-09-2).
21. SROVNAL J., - KESSELOVA M., - KOLEK V., - CWIERTKA K., - HAJDUCH M.: Thyroid Transcription factor 1 in lung cancer patients. In Sborník abstraktů přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 10. – 12. 5. 2007, Karlov pod Pradědem, ČR. s. 35.
22. SROVNAL J., - KESSELOVA M., - KORINKOVA G., - CWIERTKA K., - HAJDUCH M.: Comparison of EGFR and EGFRvIII Gene Expression In Most Common Tumors. Seminář Výzkumného záměru, 10. – 12. 5. 2007, Karlov pod Pradědem, ČR.
23. SROVNAL J., - HAJDÚCH M.: Expresní profilování solidních nádorů technikou Real-Time RT-PCR pro diferenční diagnostiku a vyšetření minimální residuální choroby. Biotechnika 2007, 22. 5. 2007, Praha.
24. SROVNAL J., - KESSELOVA M., - KORINKOVA G., - VYSLOUŽIL K., - DUDA M., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - HAJDUCH M.: Correlation of CEA and CA 19-9 serum levels with CEA expression and clinical characteristics of colorectal cancer patients. In Book of Abstracts, International Conference Analytical Cytometry IV 23-26 června, 2007 Brno, ČR. Brno: Czech Society for Analytical Cytology, 2007. s. 75. (ISBN: 978-80-239-9591-6).
25. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVĚBIŠOVÁ H., - CWIERTKA K., - VYSLOUŽIL K., - KLEIN J., - ŠVACH I., - PILKA R., - KALA M., - HAJDÚCH M.: Molekulární diagnostika tumorů neznámého původu. Klinický seminář Onkologické kliniky a Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 6. 11. 2007, Olomouc.
27. SROVNAL J., - BERKOVCOVÁ J., - KESSELOVÁ M., - WIECEK S., - STAŇKOVÁ M., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - HAJDÚCH M.: Detekce mutací genu k-ras metodou High Resolution Melting Curve Analysis: Vzájemné

srovnání metod a přístrojů na souboru 153 pacientů. In III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 28-30 listopad 2007, 2007 Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Lékařská fakulta. Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 2007. s. 39. (ISBN: 978-80-244-1824-7).

28. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - VYSLOUŽIL K., - SKALICKÝ P., - STRÁŽNICKÁ J., - CWIERTKA K., - HAJDÚCH M.: Aktuální výsledky projektu „Detekce minimální reziduální choroby u pacientů s kolorektálním karcinomem – co je nového?“ Klinický seminář Onkologické kliniky a Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 8. 4. 2008, Olomouc.
29. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVACH I., - ZLÁMALOVÁ N., - NEORAL Č., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - BENEŠ P., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - HAJDÚCH M.: Prognostický význam mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu – výsledky tříletého sledování. Přednáškový večer Spolku lékařů českých, LF UP Olomouc, 16. 4. 2008, Olomouc.
30. SROVNAL J., - BERKOVCOVÁ J., - KESSELOVÁ M., - VYSLOUŽIL K., - SKALICKÝ P., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - HAJDÚCH M.: Detekce mikrosatelitní instability u pacientů s kolorektálním karcinomem. XXXII. Brněnské onkologické dny, 17. - 19. 4. 2008, Brno, 2008, s. 84. (ISBN: 978-9780-86793-11-5).
31. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVACH I., - ZLÁMALOVÁ N., - NEORAL Č., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - BENEŠ P., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - HAJDÚCH M.: Prognostický význam mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu – výsledky tříletého sledování. XXXII. Brněnské onkologické dny, 17. - 19. 4. 2008, Brno, 2008, s. 309-310. (ISBN: 978-9780-86793-11-5).
32. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVACH I., - ZLÁMALOVÁ N., - NEORAL Č., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - BENEŠ P., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - HAJDÚCH M.: Prognostic value of micrometastatic involvement of sentinel lymph nodes in breast cancer patients – three years follow-up. Seminář Výzkumného záměru, 22. – 24. 5. 2008, Karlov pod Pradědem, 2008, s. 5.
33. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - ŠVACH I., - ZLÁMALOVÁ N., - NEORAL Č., - ŠVÉBIŠOVÁ H., - BENEŠ P., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - HAJDÚCH M.: Význam mikrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin v chirurgii pacientek s karcinomem prsu – výsledky tříletého sledování. XXII. Petřivalského – Rapantův den, 19. 9. 2008, Regionální centrum Olomouc.
34. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - KOŘÍNKOVÁ G., - VYSLOUŽIL K., - SKALICKÝ P., - STARÝ L., - KLEMENTA I., - DUDA M., - STRÁŽNICKÁ J., - ŠRÁMEK V., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - RADOVÁ L., - HAJDÚCH M.: Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů

- operovaných pro kolorektální karcinom –výsledky tříletého sledování. In Onkologie abstrakta - IV. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. I. Symposium o cílené biologické léčbě, 26.-28. listopadu 2008, Laboratoř experimentální medicíny LF UP při Dětské klinice FN Olomouc, 2008, p. 21-22. (ISSN: 1803-5922).
35. SROVNAL J., - POSPÍŠILOVÁ D., - MIHÁL V., - HYJÁNEK J., - NOVÁK J.: Leukemia cutis. Seminář Dětské kliniky FN a LF UP v Olomouci, 21. 1. 2009, Olomouc.
36. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - VYSLOUŽIL K., - SKALICKÝ P., - STARÝ L., - KLEMENTA I., - DUDA M., - STRÁŽNICKÁ J., - ŠRÁMEK V., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - RADOVÁ L., - HAJDÚCH M.: Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů se solidními tumory – výsledky tříletého sledování. Seminář Onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci, 17. 2. 2009, Olomouc.
38. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - VYSLOUŽIL K., - SKALICKÝ P., - STARÝ L., - KLEMENTA I., - DUDA M., - STRÁŽNICKÁ J., - ŠRÁMEK V., - CWIERTKA K., - BÍLKOVÁ R., - RŮŽKOVÁ V., - RADOVÁ L., - HAJDÚCH M.: Prognostický význam minimální reziduální choroby u pacientů operovaných pro kolorektální karcinom-výsledky tříletého sledování. In Edukační sborník, XXXIII. Brněnské onkologické dny, 16.-18. dubna 2009, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2009, s. 272. (ISBN: 978-80-86793-12-2). DEDIKACE: MSM6198959216, LC07017, NR/9076-4.
39. SROVNAL J., - KESSELOVÁ M., - VYSLOUŽIL K., - SKALICKÝ P., - STRÁŽNICKÁ J., - ŠRÁMEK V., - CWIERTKA K., - RŮŽKOVÁ V., - RADOVÁ L., - HAJDÚCH M.: The minimal residual disease an independent negative prognostic factor in colorectal cancer patients. In Sborník abstraktů a přednášek Výzkumného záměru MŠM 6198959216, 24-26.5.2009, Hustopeče, 2009, s. 24. DEDIKACE: MSM 6198959216, IGA MZCR NR/7804-5, 1H-PK/45.