



Original Research

Influence of adjuvant radiotherapy on circulating epithelial tumor cells and circulating cancer stem cells in primary non-metastatic breast cancer



Dorothea Sonja Schott^{a,*}, Monika Pizon^a, Ulrich Pachmann^a, Katharina Pachmann^a, Rainer Schobert^b, Andrea Wittig^c, Matthias Mäurer^c

^a Transfusion Center Bayreuth, Kurpromenade 2, 95448 Bayreuth, Germany

^b Organic Chemistry University of Bayreuth, Bayreuth, Germany

^c Department of Radiotherapy and Radiation Oncology, University Hospital Jena, Jena, Germany

Tytuł pracy: **”Wpływ adiuwantowej radioterapii na krążące nabłonkowe komórki nowotworowe i krążące nowotworowe komórki macierzyste w pierwotnym nieprzerzutowym raku piersi”**

**Tłumaczenie na język polski z korektą na potrzeby pacjentów -
N. Szaluś, dr hab. n. med. M. Pizon**

Wprowadzenie

U kobiet, rak piersi jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym i stanowi 30% wszystkich nowotworów [1]. Postępowanie w przypadku tego nowotworu zmieniło się znacząco w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat. Jest on często rozpoznawany we wczesnym, potencjalnie wyleczalnym stadium i skuteczniejszym leczeniu [2]. Leczenie choroby miejscowej obejmuje zabieg chirurgiczny, po którym często stosuje się radioterapię adjuwantową. Neoadiuwantowe lub adjuwantowe leczenie systemowe obejmuje chemioterapię, terapię endokrynologiczną, terapię biologiczną lub ich połączenie. Leczenie wielomodułowe opiera się na klasyfikacji TNM i stratyfikacji ryzyka obejmującej histologię, status receptora hormonalnego, receptora ludzkiego **naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2)**, stopień histologiczny i wskaźnik proliferacji. W celu określenia potencjalnej korzyści z terapii systemowej, w ostatnim czasie, oprócz wymienionych cech klinicznych i patologicznych, stosuje się charakterystykę molekularną, a w wybranych przypadkach dodatkowe oznaczenia ekspresji genów guza pierwotnego [3]. Radioterapia po oszczędzającej operacji raka piersi (BCS - breast conserving surgery) lub mastektomii jest ważnym elementem terapii, ponieważ znacząco redukuje odsetek wznów miejscowych jak również zmniejsza całkowitą śmiertelność [4-8]. W przeciwieństwie do chemioterapii,

wskazanie do radioterapii opiera się głównie na cechach klinicznych i patologicznych. Od czasu wdrożenia radioterapii tylko u 2,5% kobiet z pierwotnym rakiem piersi dochodzi do nawrotu lokoregionalnego, jednak należy zauważyć, że niezależnie od podjętego leczenia u 20% do 30% nadal dochodzi do nawrotu odległego (ale bez wcześniejszego nawrotu miejscowego) [1, 9, 10]. U kobiet we wczesnym stadium raka piersi operacja ma na celu całkowite usunięcie wykrywalnej makroskopowo choroby, jednak mikroskopowe ogniska nowotworu mogą nadal być obecne w zachowanej piersi lub w ścianie klatki piersiowej. Obecnie stosowane procedury oceny zaawansowania nowotworu oraz techniki obrazowania o wysokiej rozdzielczości nie są wystarczająco czułe, aby wykryć mikroprzerzuty lub wczesne rozsiewy komórek nowotworowych.

Komórki pochodzące z guzów pierwotnych, nawrotów lokoregionalnych lub przerzutów, które krążą we krwi obwodowej i posiadają cechy antygenowe i genetyczne specyficzne dla guza, to tzw. krążące komórki nowotworowe [11]. Mechanizm powstawania przerzutów z guza litego nie jest w pełni poznany, ale ostatnie dowody wskazują, że kluczowym momentem progresji nowotworu jest rozprzestrzenianie się komórek z guza pierwotnego już w jego wczesnym stadium [11]. Krążące komórki nowotworowe stanowią płynny składnik guza litego i wskazują na obecność choroby resztkowej. Ta minimalna choroba resztkowa może prowadzić do wznowy lokoregionalnej lub przerzutów odległych lub do obu tych zjawisk [12, 13]. W chorobie przerzutowej, zaproponowano te komórki do identyfikacji podgrupy pacjentów, którzy najprawdopodobniej odpowiedzą na daną terapię. Zaproponowano je również do badania w celu rozwoju ulepszonych terapii zindywidualizowanych [14, 15]. Wykazano, że liczba krążących komórek nowotworowych u chorych na przerzutowego raka piersi jest niezależnym prognostykiem progresji i czasu całkowitego przeżycia [16, 17]. Nawet u pacjentów z niskim ryzykiem, bez przerzutów, krążące komórki nowotworowe mogą stać się predyktorem zbliżających się przerzutów i czasu całkowitego przeżycia [18, 19]. Dzięki zastosowaniu maintrac[®], metody nierozpraszającej, pozwalającej na uniknięcie utraty komórek [20], liczba **krążących nabłonkowych komórek nowotworowych (CETC – Circulating Epithelial Tumor Cells)** może być wykorzystana jako marker odpowiedzi na leczenie (w kontekście terapii adiuwantowej, pozwalając na ciągłe ich monitorowanie w trakcie leczenia) [21]. Monitorowanie liczby krążących komórek nowotworowych jako metoda oceny odpowiedzi na różne metody terapii przewyższa konwencjonalne obrazowanie, ale nie została jeszcze zastosowana do oceny wyniku radioterapii, zwłaszcza we wczesnym raku piersi [18, 22-28]. Guzy lite składają się głównie z komórek zróżnicowanych, które mają ograniczoną lub zerową zdolność do samoodnowy. Chociaż komórki macierzyste nowotworu mogą być trudne do definitywnego zdefiniowania, coraz więcej dowodów sugeruje, że guz składa się również z małej subpopulacji niezróżnicowanych komórek w obrębie guza, które mają zdolność do klonalnego wzrostu i samoodnowy [9]. Ze względu na oporność na stosowane leczenie, są one odpowiedzialne za

inicjację guza, jego progresję, przerzuty, a przede wszystkim za nawroty po leczeniu, [9 , 29]. Również krążące komórki guza wydają się być siedliskiem subpopulacji nowotworowych komórek macierzystych, tzw. **Circulating Cancer Stem Cells (cCSCs)**, które są kluczowe dla rozprzestrzeniania się przerzutów [30, 31]. Wykazaliśmy, że również ta subpopulacja komórek (cCSC) we krwi obwodowej jest zdolna do ekspansji klonalnej i silnie koreluje z prawdopodobieństwem obecności przerzutów u chorych na raka piersi [31, 32].

Dotychczas istnieją tylko ograniczone dane [33] dotyczące monitorowania liczby CETCs i liczby cCSCs podczas radioterapii, zwłaszcza we wczesnym stadium raka piersi. W obecnej pracy u pacjentek, po operacyjnym oszczędzającym leczeniu raka piersi zbadaliśmy liczbę CETCs oraz liczbę cCSCs przed, w połowie i na końcu radioterapii adjuwantowej. Oceniono również status receptorów hormonalnych i receptora HER2 w CETCs i skorelowano je z nimi w tkance guza pierwotnego.

Metoda badania

Badanie zostało zaprojektowane jako badanie biologiczne o charakterze translacyjnym, mające na celu zbadanie możliwości identyfikacji i charakterystyki krążących komórek nabłonkowych raka, jak również krążących komórek macierzystych raka z próbek krwi pełnej. Badanie przeprowadzono metodą maintrac[®], przed radioterapią, w połowie radioterapii oraz pod koniec radioterapii

Przypis: Badania translacyjne to badania mające na celu przełożenie wyników badań podstawowych na wyniki, które bezpośrednio przynoszą korzyści ludziom.

Kryteria włączenia

W okresie od kwietnia 2016 roku do marca 2019 roku, 52 panie chore na raka piersi zostały włączone do badania. Wszystkie pacjentki leczone były w Szpitalu Uniwersyteckim w Jenie. Badanie przeprowadzono zgodnie z Deklaracją Helsińską i zostało zatwierdzone przez lokalną komisję etyczną (nr 0921-08/02) oraz zarejestrowane w niemieckim rejestrze badań klinicznych (DRKS00011840). Do badania włączano chore na raka piersi (po wyrażeniu pisemnej świadomej zgody) spełniające następujące kryteria kwalifikacji: wiek ≥ 18 lat z potwierdzonym histologicznie pierwotnym, inwazyjnym rakiem piersi, bez przerzutów odległych (stadia I-IIIa). Chirurgia zachowawcza piersi musiała zostać przeprowadzona w Szpitalu Uniwersyteckim w Jenie, przy czym należało uwzględnić leczniczą radioterapię adjuwantową piersi/ściany klatki piersiowej +/- drenaż limfatyczny.

Dopuszczalne koncepcje dawek terapeutycznych radioterapii były następujące:

- 1 hipofrakcjonowana terapia (5 × 2,66 Gy/tydzień) do całkowitej dawki pochłoniętej max. 42,56 Gy lub
- 2 normofrakcjonowana terapia (5 × 1,8 Gy lub 5 × 2,0 Gy/tydzień) do całkowitej dawki pochłoniętej 50,4 Gy lub 50,0 Gy.

W razie wskazań podawano dodatkowy boost na lożę po nowotworze - 5 × 2,0 Gy/tydzień do dawki całkowitej 16,0 Gy.

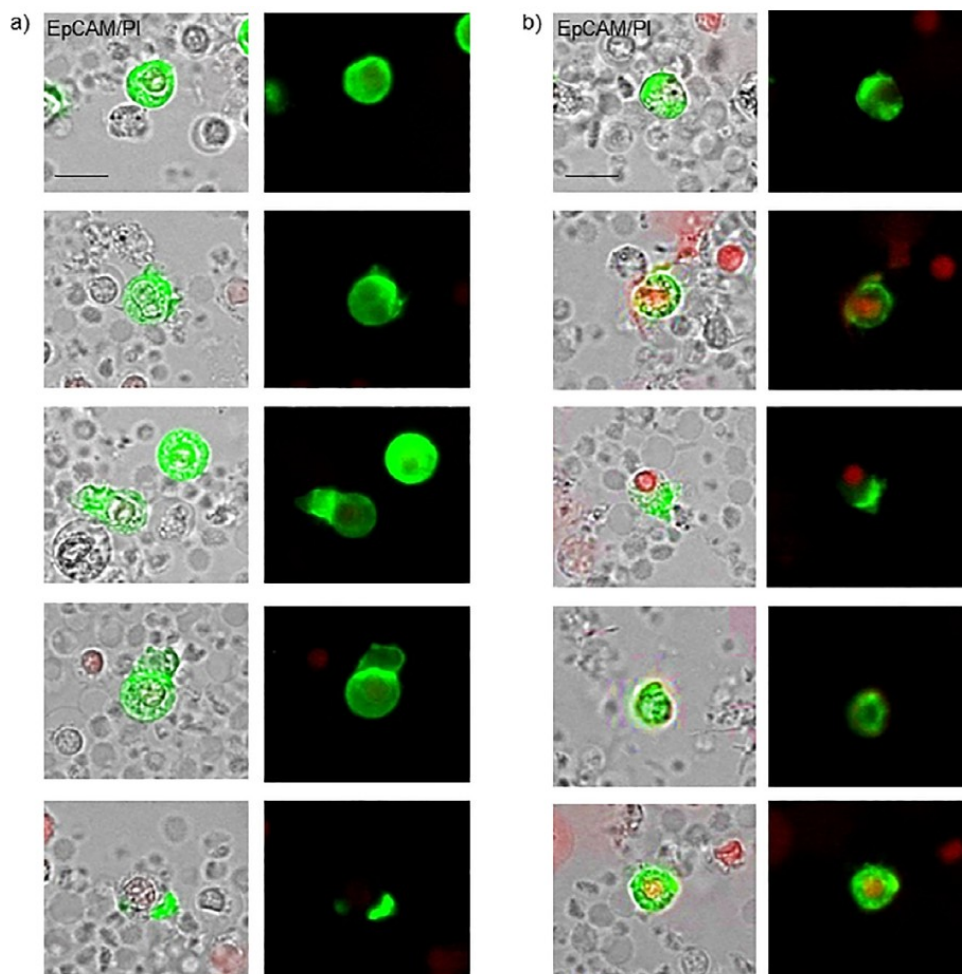
Kryteriami wyłączenia z badania były: obecność przerzutów odległych, wcześniejsze nowotwory złośliwe (w ciągu 10 lat od rozpoznania raka piersi) lub wcześniejsza radioterapia.

Metodyka badań

Do analizy CETC pobierano do probówek z EDTA (jako antykoagulant) próbki krwi obwodowej (2 × 7,5 ml) i wysyłano do laboratorium w Bayreuth. Krew pobierano od wszystkich chorych w trzech punktach czasowych: w dniu pierwszej sesji radioterapii (= pre RT), w połowie radioterapii (= mid RT - po 8 sesjach dla hipofrakcjonowanej RT i po 14 sesjach dla normofrakcjonowanej RT) oraz w ostatnim dniu radioterapii (= end RT). Oprócz pacjentek na raka piersi, w celu kontroli pobrano próbki krwi od 10 zdrowych pań w wieku 20-45 lat.

Poniższe procedury nie zostały przetłumaczone i zawarte są w pracy oryginalnej. Załączono tylko zdjęcia z tłumaczeniem

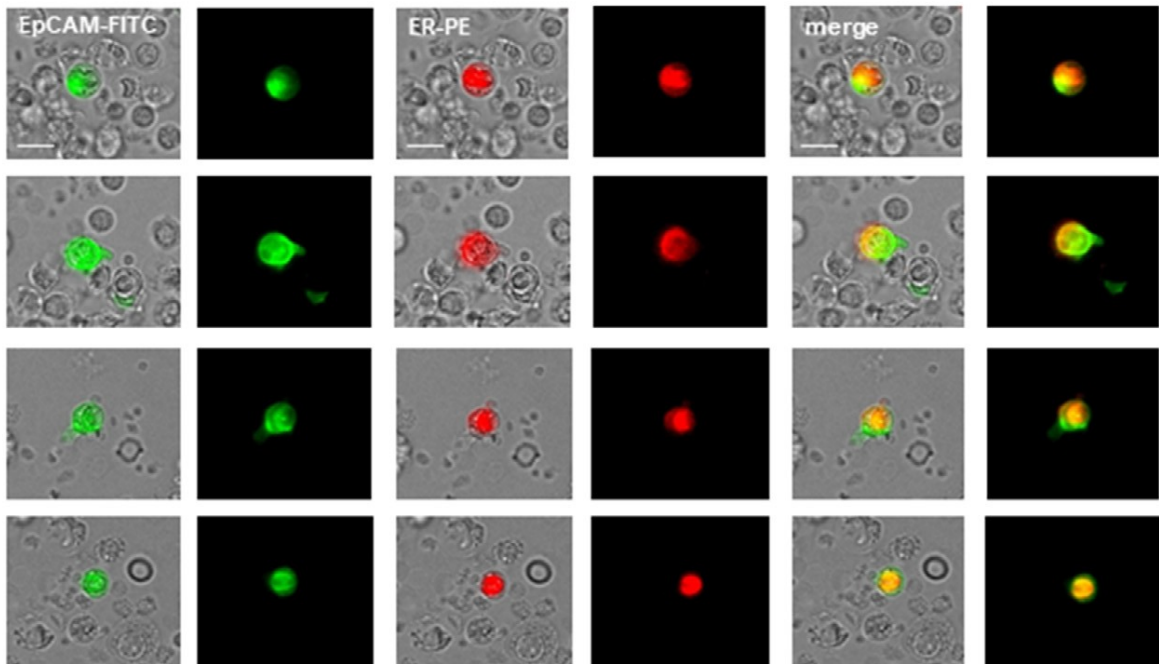
- *Immunofluorescence assay for identification of CETCs (maintrac®method)* - Test immunofluorescencyjny do identyfikacji CETC (maintrac®method). Rycina 1.



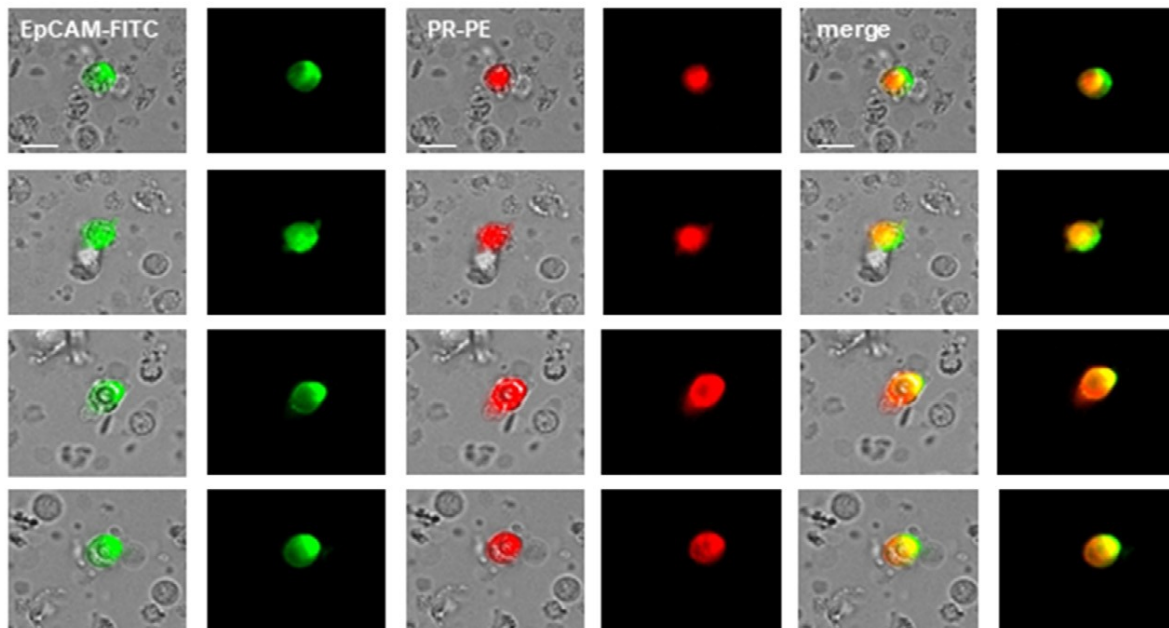
Ryc. 1. Przykładowe obrazy komórek od jednej pacjentki (a) żywych i (b) martwych CETCs. (a) żywe CETCs są pozytywne dla EpCAM (zielony) i negatywne dla PI (czerwony) z nienaruszoną morfologią. (b) martwe komórki są albo pozytywne dla EpCAM i PI lub tylko pozytywne dla EpCAM i negatywne dla PI z powodu zniszczonej błony komórkowej. PI - Propidium iodide (jodek propidyny)

➤ Secondary antibody staining - Barwienie przeciwciałami wtórnymi. Rycina 2.

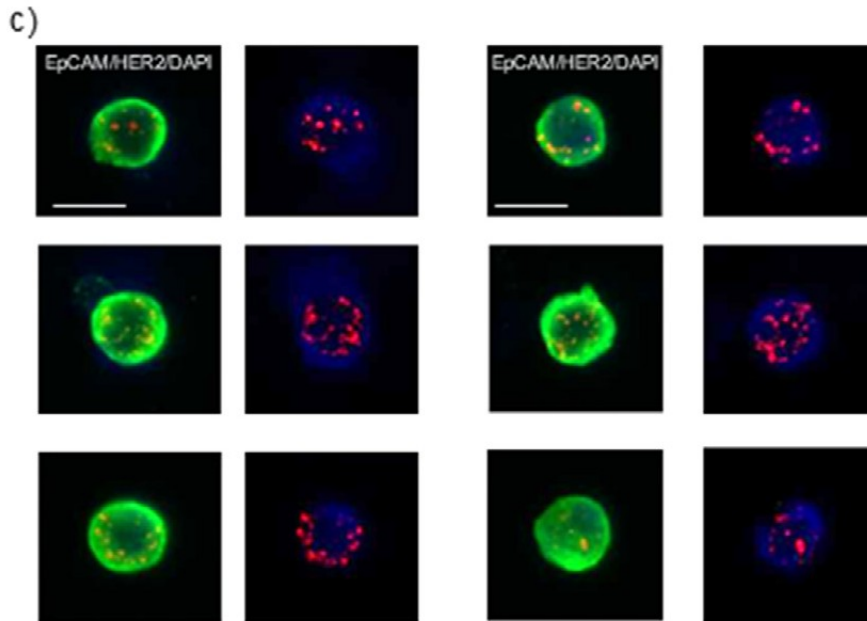
a)



b)



Ryc. 2 a i b. Typowe obrazy CETC od jednej pacjentki z podwójnym barwieniem przeciwciałami dla (a) EpCAM (zielony) i ER (czerwony) oraz (b) EpCAM (zielony) i PR (czerwony).



Ryc. 2 c. (c) Typowe obrazy komórek CETC z amplifikacją HER2 (komórki od jednej pacjentki). Komórki pozytywne dla EpCAM (zielony), i DAPI (niebieski). Komórki są amplifikowane HER2 (czerwone sygnały). DAPI - (4',6-diamidyno-2-fenylindol) barwnik fluorescencyjny

- *Fluorescence-in-situ-hybridization (FISH) of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)* - Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) receptora 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2)
- *Analysis of stem cell properties of cCSCs* - Analiza właściwości komórek macierzystych (cCSCs)

Wyniki

CETCs i ich cechy kliniczno-patologiczne

Próbki krwi obwodowej od zdrowych ochotników (n = 20) zostały użyte jako kontrola negatywna i przetwarzane analogicznie do próbek krwi od chorych pacjentek. W próbkach od zdrowych osób, nie stwierdzono obecności CETC, a podczas hodowli nie obserwowano tworzenia się sfer nowotworowych in vitro (tumorspheres). Charakterystyka wszystkich pacjentek (biorących udział w badaniu) na pierwotnego raka piersi została przedstawiona w Tabeli 1. CETCs pod względem ekspresji receptorów hormonalnych i statusu HER2 porównywano z tkanką guza pierwotnego. Status ER i PR w CETCs był możliwy do oceny u wszystkich chorych przed i po zakończeniu radioterapii. Status HER2 w CETCs oznaczono w podgrupie 20 chorych przed radioterapią.

Table 1
Patient characteristics and CETC examination results.

Clinicopathological characteristics	Number of patients	Median number of CETCs	Number of patients with decreasing CETCs during RT	Number of patients with increasing CETCs during RT
Age				
≤50 years	13	18	9	3
>50 years	39	6	13	18
Tumor size				
pT1	30	7	15	15
pT2	19	8	9	9
pT3	2	17	1	1
pT4	1	2	1	
Lymph nodes				
pN0	31	6	15	16
pN1	17	9	9	7
pN2	3	11	1	2
pN+	1	0	0	1
pN3				
Stage				
I	24	6	12	12
II	20	9	10	9
III	8	8	4	4
ER status				
Positive (>1%)	42	6	19	22
Negative (≤1%)	10	22	7	3
PR status				
Positive (>1%)	34	5	15	18
Negative (≤1%)	18	16	11	7
HER2 status				
Positive (3+)	11	10	5	6
Negative (<3+)	41	7	21	19
Grading				
G1	10	6	5	4
G2	29	10	15	14
G3	13	6	6	7
Ki-67 index				
< 13%	30	7	13	15
> 13%	22	10	12	9
Molecular subtype				
Luminal A,B	34	5	15	12
Basal like	7	21	5	2
HER2 enriched	11	10	5	6
Histology				
invasive ductal	44	9	23	21
invasive lobular	6	16	2	4
tubular	1	0	0	1
mucinous	1	2	1	0
Chemotherapy				
No	27	6	13	13
adjuvant	12	4	3	9
neoadjuvant	13	21	10	3
Endocrine therapy				
Yes	23	6	9	13
No	29	8	17	11

Większość pacjentek z dodatnią ekspresją receptorów ER (Receptor Estrogenowy), PR (Receptor Progesteronowy) lub HER2 w tkance guza pierwotnego (immunohistochemicznie > 1%), miała również dodatnie CETCs – dla ER (u 89% chorych) (Rycina 3a), PR (u 70% chorych) (Rycina 3b) i HER2 (u 100% chorych) (Rycina 3c).

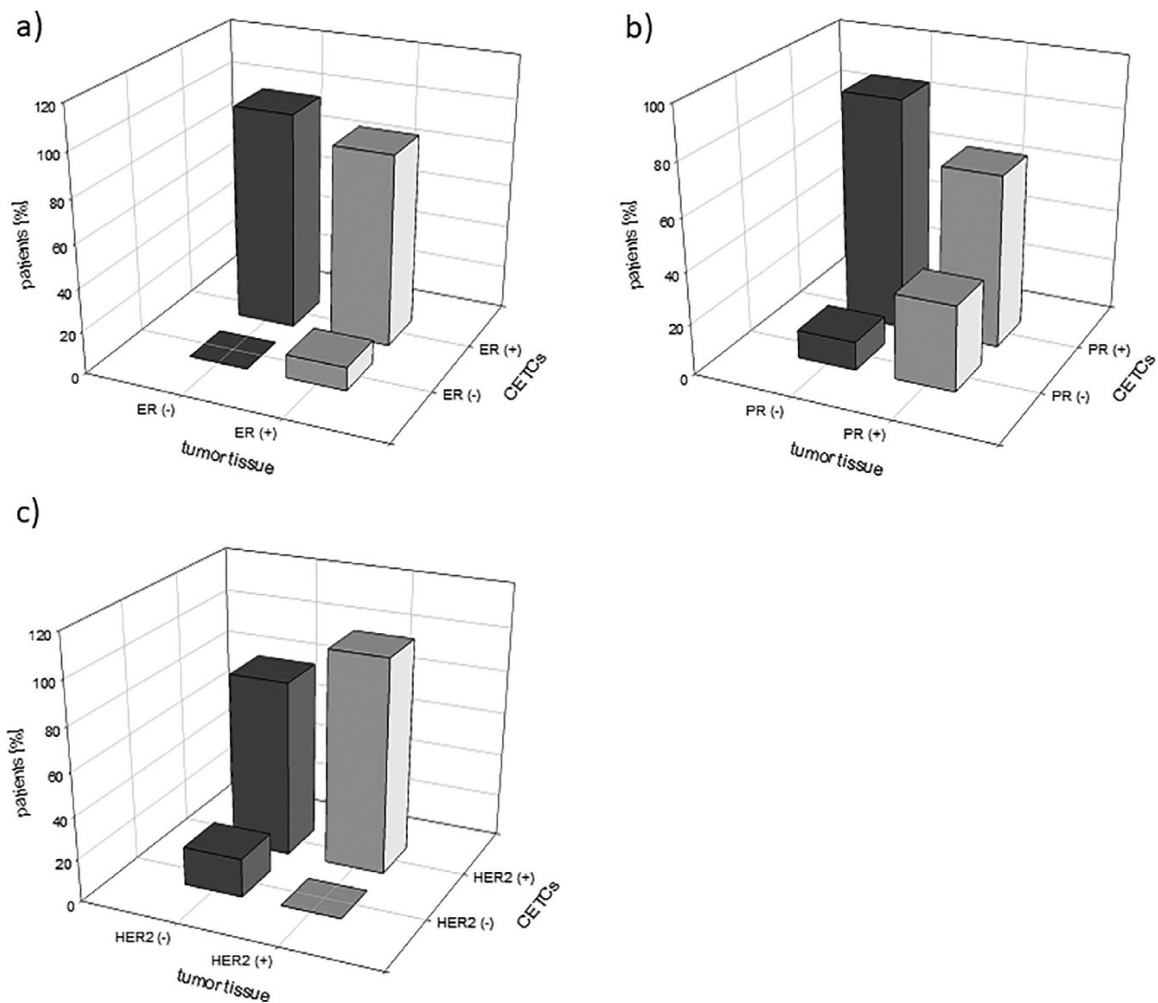


Fig. 3. Percentage of patients comparing (a) ER, (b) PR and (c) HER2 status in CETCs and tumor tissue.

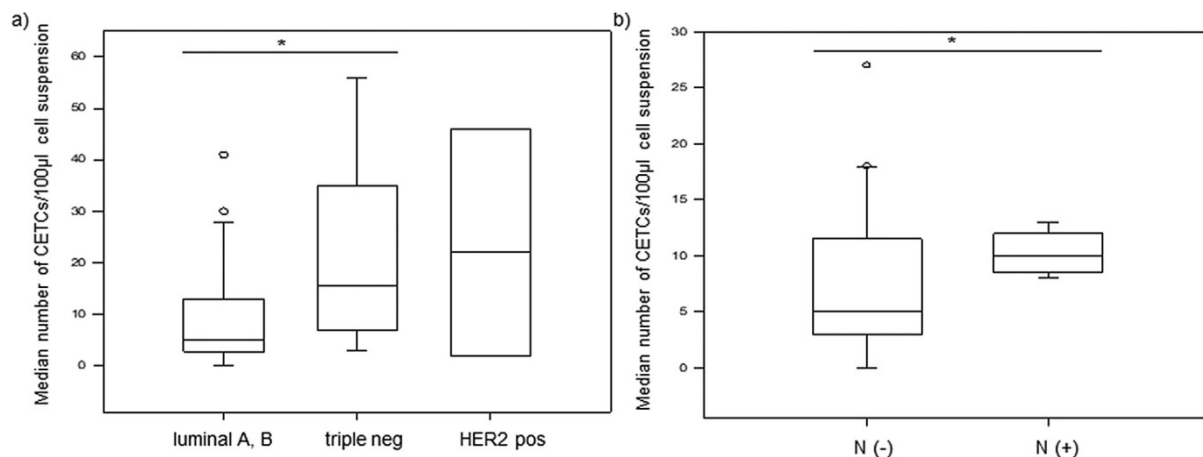
Ryc. 3. Odsetek chorych z porównaniem (a) statusu ER, (b) PR i (c) HER2 w CETCs i tkance guza.

Większość chorych z negatywnym statusem receptorów hormonalnych i/lub negatywnym statusem receptora HER2 w tkance guza pierwotnego miała co najmniej 1% CETCs z ekspresją tych receptorów (Ryc. 3).

Porównaliśmy status ER i PR w CETCs przed radioterapią (RT) ze statusem tych receptorów pod koniec radioterapii. **Porównując wartości receptorów przed i po zakończeniu RT nie stwierdzono wpływu RT na status receptorów hormonalnych w CETCs, co oznacza, że pacjentki, które były dodatnie lub ujemne dla ER lub PR przed RT, pozostają dodatnie lub ujemne po zakończeniu RT.**

Dodatkowo, przed rozpoczęciem radioterapii, zbadaliśmy liczbę CETCs w odniesieniu do różnych podtypów molekularnych raka piersi. Zgodnie z międzynarodową definicją, podtyp Luminalny A określono jako ER i/lub PR dodatni, HER2-ujemne z niskim indeksem Ki67 (n = 23; 44%), podtyp Luminalny B -- ER i/lub PR dodatnie, HER2-ujemne, wysoki indeks Ki67 (n = 11; 21%), guzy basal like (podstawno podobne) określono jako ER, PR i HER2 ujemne (potrójnie ujemne - TNBC) (n = 7; 14%), a guzy HER2-podobne określono jako HER2-dodatnie (n = 11; 21%). Porównując podtypy molekularne guzów pierwotnych względem liczby CETCs wykrytych przed RT, pacjentki z potrójnie ujemnym rakiem piersi miały istotnie

więcej CETCs w porównaniu z pacjentkami z podtypem luminalnym A lub luminalnym B (mediana 16 vs. 5 CETCs/100 μ l zawiesiny komórkowej, $p < 0,05$) (Rycina 4a). Pacjentki z nowotworami HER2 (dodatnimi) i dodatnimi/ujemnymi pod względem receptorów hormonalnych mieli najwyższą medianę CETC, ale ze względu na małą liczbę patientek w badaniu (z tym podtypem nowotworu) różnica nie była istotna statystycznie. Ponadto zajęcie węzłów chłonnych miało wpływ na liczbę CETC przed RT. Chore z zajętymi węzłami chłonnymi, które nie otrzymały jeszcze chemioterapii, miały statystycznie istotnie więcej CETCs przed rozpoczęciem RT w porównaniu z pacjentkami bez zajęcia węzłów chłonnych (mediana 10 vs. 5 CETCs/100 μ l zawiesiny komórek; $p < 0,05$) (Rycina 4b).



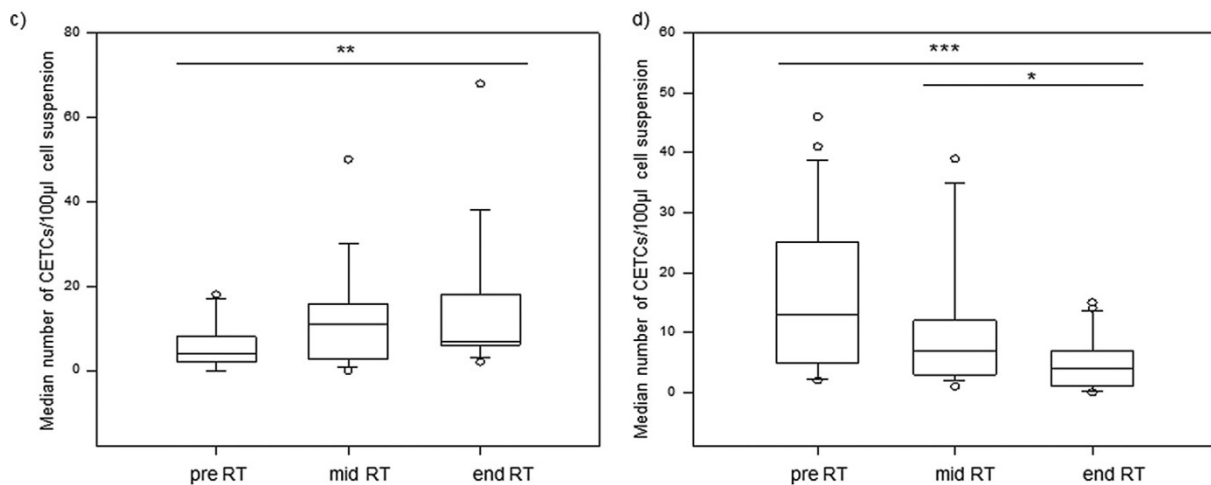
Ryc. 4. Średnia liczba CETCs w zależności od (a) różnych podtypów molekularnych raka piersi i (b) przerzutów do węzłów chłonnych. (c) średnia liczba CETC w grupie chorych z rosnącą liczbą CETC podczas RT oraz (d) w grupie chorych z malejącą liczbą CETC.

Monitorowanie liczby CETC podczas radioterapii

W trakcie analiz zaskoczył nas fakt, że radioterapia (RT) nie ma jednakowego wpływu na CETCs u wszystkich patientek. Zidentyfikowaliśmy 2 grupy patientek z antydromowym (kierunek przeciwny do występującego normalnie) zachowaniem liczby CETC podczas RT. Obie grupy były jednakowo podzielone pod względem statusu T (wielkość guza) i N (ilość zajętych węzłów chłonnych), podtypu molekularnego, histologii, stopnia złośliwości histologicznej, stopnia zaawansowania klinicznego i stosowania hormonoterapii (Tabela 1 – patrz wyżej). Jedyną zaobserwowaną różnicą między obiema grupami było, że u większej liczby chorych z rosnącą liczbą komórek zastosowano chemioterapię adiuwantową, natomiast w grupie chorych z malejącą liczbą CETC więcej chorych miało chemioterapię neoadiuwantową. **U 25 patientek liczba CETC wzrastała podczas radioterapii, podczas gdy u 27 obserwowaliśmy zmniejszanie się liczby CETC. Liczba CETC przed RT różniła się istotnie między obiema grupami (mediana 4 vs. 13 CETCs/100 μ l zawiesiny komórek; $p < 0,01$), odpowiednio (Ryc. 4c i 4d).**

W grupie patientek z rosnącą liczbą CETC, u 53% liczba komórek osiągnęła szczyt w połowie czasu trwania radioterapii. Po zakończeniu RT liczba CETC zmniejszyła się, ale średnia liczba CETC u wszystkich patientek była nadal istotnie wyższa w porównaniu

z średnią przed RT (4 vs. 7 CETCs/100 μ l zawiesiny komórek; $p < 0,01$) (Ryc. 4c). Średni wzrost liczby CETC od stanu przed radioterapią do końca radioterapii wynosił $2,91 \pm 2,09$ - krotnie.

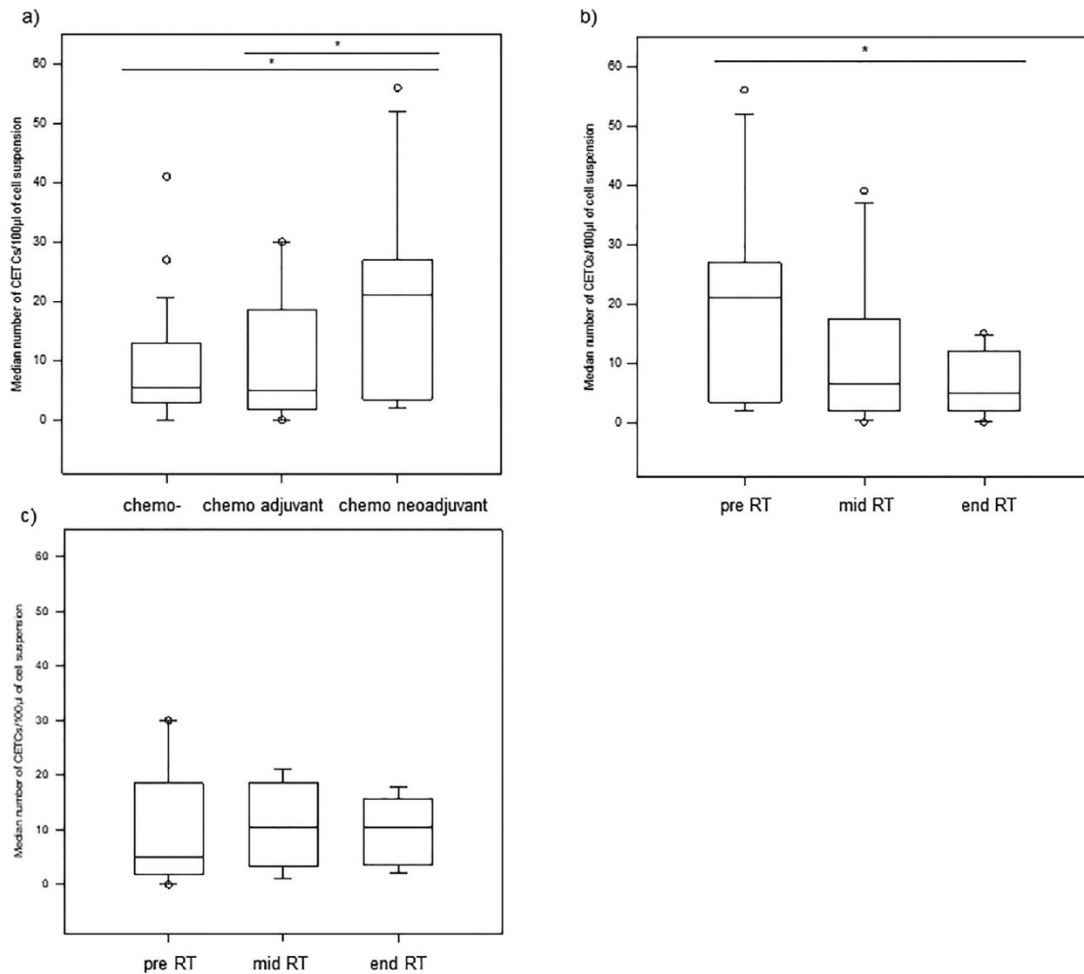


Ryc. 4. (c) średnia liczba CETCs w grupie chorych z rosnącą liczbą CETCs podczas radioterapii oraz (d) w grupie chorych z malejącą liczbą CETCs podczas RT.

W grupie pacjentek z malejącą liczbą CETC średni spadek liczby CETC wynosił $4,46 \pm 3,68$ krotnie. W tej grupie pacjentek obserwowano stały spadek liczby CETC. Różnica w liczbie CETC była statystycznie istotna pomiędzy początkiem RT a końcem RT (średnia CETCs - 13 vs. 4 /100 μ l zawiesiny komórek ; $p < 0,001$), jak również pomiędzy środkiem RT a końcem RT (mediana 7 vs. 4 CETCs/100 μ l zawiesiny komórek, $p < 0,05$) (Ryc. 4d).

Liczba CETC w kontekście wcześniejszej chemioterapii

Ponieważ chemioterapia cytostatyczna może mieć wpływ na liczbę CETC, zbadaliśmy liczbę CETC zależną od chemioterapii przed rozpoczęciem RT. 25 pacjentek było leczonych chemioterapią, z czego 13 otrzymało chemioterapię neoadiuwantową. 27 chorych nie otrzymało żadnej chemioterapii cytostatycznej. W grupie chorych leczonych chemioterapią neoadiuwantową leczenie zakończyło się uzyskaniem patologicznej całkowitej odpowiedzi (pCR) u 3 chorych (23%). Pacjentki, które otrzymały chemioterapię neoadiuwantową miały istotnie statystycznie wyższą liczbę CETC przed RT w porównaniu z pacjentkami, które otrzymały chemioterapię adiuwantową lub nie otrzymały żadnej chemioterapii (mediana odpowiednio 21, 4 i 6 CETCs/100 μ l zawiesiny komórek, $p < 0,05$) (Ryc. 5a). Chore, które otrzymały chemioterapię adiuwantową, miały nieco niższe wartości CETC przed RT w porównaniu z chorymi, które nie otrzymały żadnej chemioterapii cytotoksycznej przed radioterapią. U pacjentek, które otrzymały chemioterapię neoadiuwantową, liczba CETCs zmniejszyła się znacząco pod koniec RT z 21 (przed RT) do 5 (pod koniec RT) CETCs/100 μ l zawiesiny komórek (Ryc. 5b). Pacjentki, które otrzymały chemioterapię adiuwantową, miały tendencję do zwiększania mediany liczby CETC podczas RT (mediana 4, 11 i 11 CETCs/100 μ l zawiesiny komórek, odpowiednio przed RT, w połowie i pod koniec RT) (Ryc. 5c). U chorych, które nie otrzymały chemioterapii, wystąpiła jedynie marginalna, nieistotna zmiana liczby CETC podczas RT. W przeciwieństwie do chemioterapii, leczenie endokrynologiczne nie miało wpływu na medianę liczby CETCs (dane niezamieszczone).

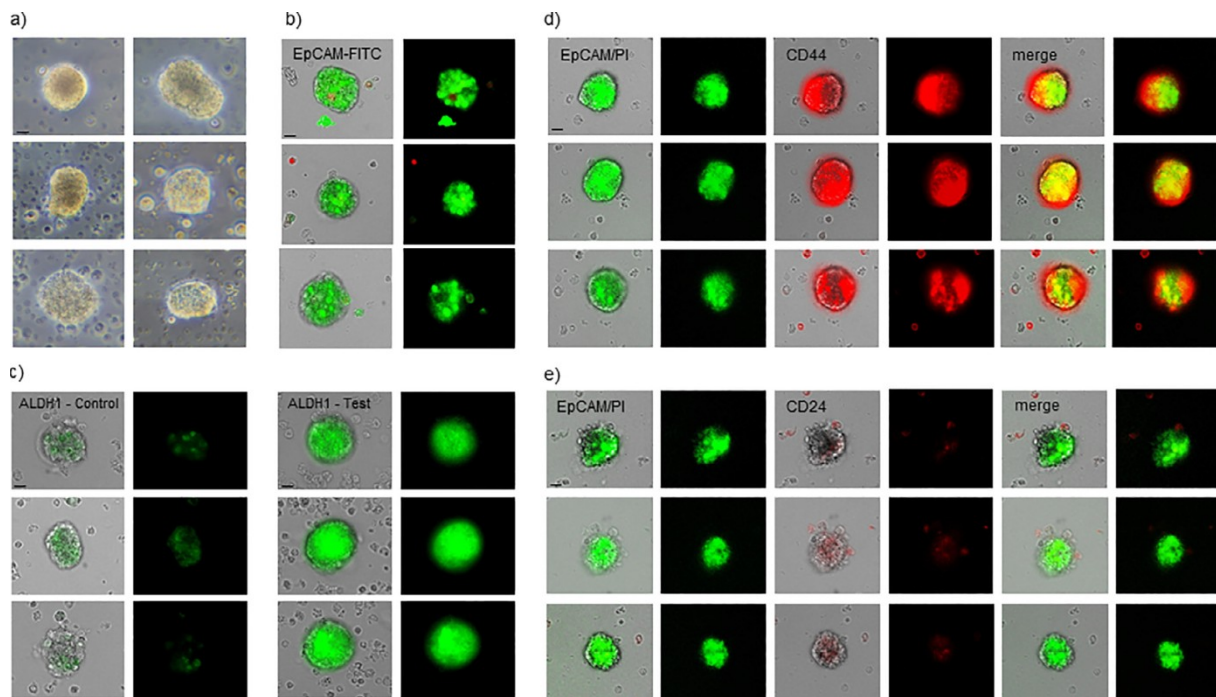


Ryc. 5. (a) Średnia liczba CETCs przed RT w odniesieniu do chemioterapii. (b) średnia liczba CETCs podczas RT u chorych, które otrzymały chemioterapię neoadiuwantową oraz (c) średnia liczba CETCs podczas RT u chorych, które otrzymały chemioterapię adiuwantową.

Charakterystyka krążących nowotworowych komórek macierzystych (cCSCs - Circulating Cancer Stem Sells)

Hodowla komórek w celu identyfikacji cCSCs była prowadzona u każdej pacjentki a tworzenie się tumorspheres (sfery nowotworowe = zespół krążących nowotworowych komórek macierzystych) z cCSCs in vitro było kontrolowane co 7 dni (kontrola pod mikroskopem świetlnym). Po 18-21 dniach hodowli tumorspheres, oceniano je i policzono. Jak pokazano na rycinie 6a, sfery nowotworowe wyhodowane z cCSCs były bardzo zwarte. Były dodatnie dla EpCAM i osiągnęły średnicę 50-90 µm. Barwienie EpCAM było bardzo heterogenne w poszczególnych komórkach w obrębie pojedynczych sferach nowotworowych (Ryc. 6b). Tumorspheres miały typowe cechy komórek macierzystych dla raka piersi będąc dodatnimi dla ALDH1, jak pokazano na (Ryc. 6c). U jednej pacjentki pozytywna ekspresja ALDH1 była silnie zróżnicowana pomiędzy poszczególnymi tumorspheres i wahała się w granicach 60%-90%. Ponadto były one dodatnie dla EpCAM, dodatnie dla CD44 (Ryc. 6d) i ujemne lub marginalnie dodatnie dla CD24 (Ryc. 6e). Barwienie

CD44 pomiędzy poszczególnymi komórkami w jednej pojedynczej sferze nowotworowej było silnie zróżnicowane.



Ryc. 6. Przykład acjentyki z rakiem piersi. Typowe obrazy tumorspheres (sfer nowotworowych) hodowanych in vitro z cCSCs (a) z kolumny hodowlanej i (b) fluorescencyjny mikroskop skaningowy. (c) Aktywność ALDH1 w tumorspheres. (d) obrazy sfer nowotworowych pozytywnych dla EpCAM i CD44 oraz (e) obrazy sfer nowotworowych negatywnych lub marginalnie pozytywnych dla CD24. Pasek skali: 10 μ m.

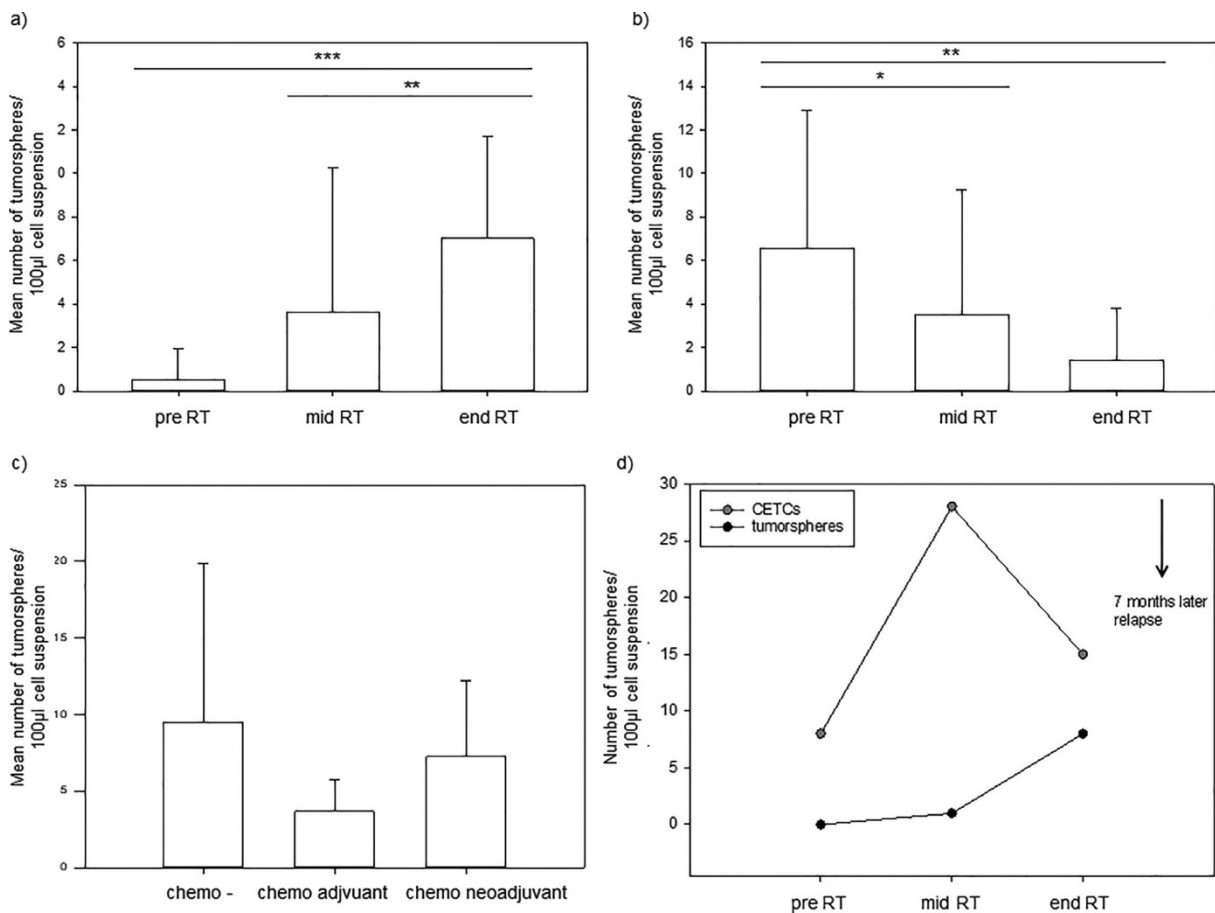
Monitorowanie liczby cCSCs podczas radioterapii

Co najmniej w jednym punkcie pomiarowym, niezależnie od molekularnego podtypu nowotworu, tworzenie się tumorspheres (sfery nowotworowe) in vitro obserwowano u 29/52 chorych. Przed rozpoczęciem radioterapii sfery nowotworowe zostały wykryte u 31% chorych pań, w połowie RT u 25% chorych i pod koniec RT u 41% pacjentek. U 44% pacjentek w żadnym punkcie pomiarowym nie zaobserwowano tworzenia się tumorspheres.

W trakcie radioterapii, u 15 pacjentek odnotowano wzrost, a 14 pacjentek spadek liczby sfer nowotworowych. Średni wzrost, w grupie pacjentek z rosnącą liczbą sfer nowotworowych wynosił 6 ± 5 razy. Stwierdzono istotne różnice między liczbą tumorspheres przed i pod koniec RT (śr. 1 vs. 7 tumorspheres/100 μ l zawiesiny komórek, $p < 0,001$), a także między połową RT i końcem RT (śr. 4 vs. 7 tumorspheres/100 μ l zawiesiny komórek, $p < 0,05$) (Rycina. 7a). Średni spadek w grupie chorych z malejącą liczbą tumorspheres wynosił 5 ± 7 razy. Różnice w liczbie tumorspheres pomiędzy początkiem RT a połową RT wyniosły odpowiednio (śr. 7 vs. 4 tumorspheres/100 μ l zawiesiny komórek, $p < 0,05$), jak również pomiędzy początkiem RT a końcem RT wyniosły (śr. 7 vs. 1 tumorspheres/100 μ l zawiesiny komórek, $p < 0,01$). Różnice te były istotne statystycznie (Ryc. 7b).

Chemioterapia miała wpływ na liczbę sfer nowotworowych wyhodowanych in vitro przed RT, jednak nie był on istotny statystycznie. Porównywalnie do liczby CETCs przed RT,

liczba tumorspheres in vitro była wyższa w grupie chorych po chemioterapii neoadiuwantowej w porównaniu z chorymi, które otrzymały chemioterapię adiuwantową (średnio 7 vs 4 tumorspheres/100μl zawiesiny komórek (Ryc. 7c).



Ryc. 7. Średnia zmienność liczby tumorspheres podczas radioterapii w grupie chorych z (a) rosnącą liczbą tumorspheres i (b) malejącą liczbą tumorspheres; (c) Średnie liczby tumorspheres przed RT w odniesieniu do chemioterapii. (d) Przebieg CETC i liczby tumorspheres podczas RT u jednej chorej na raka piersi po chemioterapii neoadiuwantowej i adiuwantowej.

Największą liczbę tumorspheres obserwowano u chorych, które nie otrzymały chemioterapii przed radioterapią (średnio 10 tumorspheres/100μl zawiesiny komórek).

U 22 spośród 29 pacjentek (76%) liczba CETC i tumorspheres rozwijała się równolegle: u 14 pacjentek zarówno liczba CETC, jak i liczba tumorspheres zmniejszyła się w trakcie RT, natomiast u 8 pacjentek liczba komórek nowotworowych (CETC) i liczba tumorspheres wzrosła. W grupie chorych pań po chemioterapii neoadiuwantowej, jak również w grupie pacjentek, które nie otrzymały chemioterapii, zaobserwowano odwrotny trend zmian liczby tumorspheres i CETC: większość chorych w tej grupie miała rosnącą liczbę tumorspheres, ale malejącą liczbę CETC podczas RT.

Dyskusja

Pomimo, że obecnie rak piersi jest często diagnozowany we wczesnym stadium, nadal jest wiodącą przyczyną śmiertelności z powodu wszystkich nowotworów [3]. Ze względu na

heterogenność wewnątrz- i międzynowotworową, ale przede wszystkim ze względu na potencjalne zmiany właściwości komórek nowotworowych w trakcie choroby (mogącymi być spowodowane efektami leczenia) analiza krążących komórek nowotworowych pokazuje pełniejsze zrozumienie złożonych procesów leżących u podstaw odpowiedzi na leczenie lub nawrotu choroby [3]. Biomarkery z guza pierwotnego mogą pomóc w identyfikacji pacjentów o niskim i wysokim ryzyku, ale preferowana byłaby analiza faktycznie rozsiaanych komórek nowotworowych [3]. Szczególnie we wczesnym stadium, w którym oczekuje się, że leczenie będzie radykalne (= i intencją wyleczenia), monitorowanie krążących komórek nowotworowych może być czynnikiem przewidującym wczesne nawroty choroby jak również czas całkowitego przeżycia [20, 36].

Wykazano, że charakterystyka komórek uwolnionych z guza pierwotnego może zmieniać się w trakcie progresji choroby, prowadząc w przypadku braku odpowiedniego markera do nieskutecznego leczenia, na co wskazuje rozbieżność w statusie receptora hormonalnego i HER2 pomiędzy guzem pierwotnym a zmianami przerzutowymi (występuje to u jednej trzeciej chorych na raka piersi z przerzutami) [37]. Nasze badanie pokazuje, że ekspresja receptorów hormonalnych i amplifikacja HER2 w CETCs początkowo odzwierciedlają status receptorów hormonalnych i HER2 guza pierwotnego i były one zgodne w 70% dla ER, 46% dla PR i 55% dla ekspresji HER2 wskazując, że te komórki są z dużym prawdopodobieństwem komórkami nowotworowymi rozsianymi z guza pierwotnego. Wyniki te pozostają w zgodzie z badaniami Kalinsky'ego i wsp. którzy zaobserwowali we wczesnym stadium raka piersi 68% zgodność w statusie ER/PR pomiędzy guzem pierwotnym a krążącymi komórkami nowotworowymi [38] oraz Zhang'a i wsp. stwierdzili zgodność pomiędzy statusem HER2 w guzie pierwotnym a krążącymi komórkami nowotworowymi u 38% chorych [39]. Podczas kolejnych RT nie obserwowano prawie żadnych zmian w statusie receptorów hormonalnych, co sugeruje, że RT nie wpływa selektywnie na ich ekspresję i nie eliminuje selektywnie populacji tych komórek.

Zdodnie z Xu i wsp. przed rozpoczęciem RT obserwowaliśmy wyższą liczbę CETC u pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi jak również u HER2 pozytywnych, w porównaniu z podtypami luminalnymi A/B, wskazując, że pacjentki z chorobą o wysokiej agresywności mają zwiększoną liczbę CETC i wyższe ryzyko tworzenia przerzutów [40]. Obecnie leczenie chorych na potrójnie ujemnego raka piersi stanowi największe wyzwanie w terapii tych nowotworów. We wczesnych stadiach standardem postępowania jest zastosowanie chemioterapii neoadjuwantowej, a uzyskanie pCR (całkowitej patologicznej odpowiedzi) po chemioterapii neoadjuwantowej koreluje z poprawą wyników całkowitego przeżycia [41]. W naszej krótkiej, 7-miesięcznej obserwacji zaobserwowaliśmy jeden nawrót u pacjentki z potrójnie ujemnym rakiem piersi. Chora chorowała na raka piersi w II stopniu zaawansowania (T2N1M0) i była leczona chemioterapią neoadjuwantową. Ponieważ nie uzyskała pCR była dodatkowo leczona chemioterapią adjuwantową (Ryc. 7d). U tej pacjentki CETCs i tumorspheres, wyhodowanych in vitro z cCSCs, wzrosła podczas RT, po czym nastąpił

nawrót choroby 7 miesięcy po zakończeniu RT. Jeśli ta obserwacja zostanie potwierdzona u większej liczby chorych, monitorowanie CETCs w trakcie RT mogłoby pomóc w podejmowaniu decyzji o dalszych interwencjach diagnostycznych i terapeutycznych w celu wczesnego wykrycia nawrotu, zwłaszcza w tej agresywnej podgrupie raka piersi.

Ponadto, zgodnie z innymi badaniami [12, 36] liczba CETCs była pozytywnie skorelowana z zajęciem węzłów chłonnych. Zajęte (dodatnie) węzły chłonne pachowe są prognostykiem zwiększonego ryzyka nawrotu miejscowego i odległego oraz bezpośrednio korelują z przeżyciem całkowitym [42]. Goodman i wsp. wykazali, że pacjentki, u których można wykryć krążące komórki nowotworowe (24% wszystkich chorych z co najmniej 1 komórką/20 ml krwi) lepiej rokują po radioterapii po BCS (breast conserving surgery) niż pacjentki bez zastosowania RT. RT wydaje się zmniejszać ryzyko nawrotu i zgonu z powodu raka piersi, co sugeruje eliminację mikroskopijnych ognisk nowotworu [33], które to mogłyby rozsiać komórki do krążenia. W badanej populacji zabieg oszczędzający piersi (BCS) wykonano u 90% chorych. Od rozpoczęcia RT do jej zakończenia wzrost liczby CETC obserwowano u 40% pacjentek, a spadek liczby CETC u 44% chorych. W odniesieniu do cech kliniczno-patologicznych, wieku i terapii endokrynologicznej nie stwierdzono różnic w grupach z rosnącą i malejącą liczbą komórek. Jedyna różnica polega na tym, że w grupie chorych pacjentek z malejącą liczbą komórek, prawie wszystkie pacjentki (80%) były leczone chemioterapią neoadjuwantową i że te chore po chemioterapii neoadjuwantowej miały statystycznie istotnie więcej CETC przed RT niż chore po chemioterapii adjuwantowej lub bez chemioterapii. Podczas gdy terapia neoadjuwantowa umożliwia zmniejszenie rozmiaru guza w przed BCS poprzez dezintegrację tkanki nowotworowej, ocenę odpowiedzi in vivo na terapię dostarcza informacji prognostycznych na podstawie odpowiedzi patologicznej [2] a zmniejszenie rozmiaru guza i zniszczenie tkanki nowotworowej może prowadzić do mobilizacji i uwolnienia komórek nowotworowych do krwiobiegu. Monitorowanie CETCs podczas chemioterapii neoadjuwantowej u chorych na wczesnego raka piersi [22] wykazało, że początkowy spadek liczby CETCs korelował ze zmniejszeniem wielkości guza. Porównywalne obserwacje podczas RT stwierdzono u chorych na NSCLC, gdzie wykryto zwiększoną liczbę krążących komórek nowotworowych w trakcie neoadjuwantowej RT z nieuszkodzonych guzów do krążenia (= wynik mobilizacji żywych komórek nowotworowych) [43]. Grupa pacjentek z rosnącą liczbą CETC podczas RT obejmowała głównie pacjentki, które nie otrzymywały chemioterapii lub otrzymywały chemioterapię adjuwantową. W tej grupie, u połowy chorych obserwowaliśmy szczyt liczby CETC w połowie czasu trwania RT, po którym następował ich spadek.

Nie jest łatwo odróżnić uśpione krążące komórki nowotworowe od tych o zdolności proliferacyjnej inicjujących nowe guzy w odległych miejscach [3]. **Przyjmuje się, że tylko niewielka subpopulacja krążących komórek nowotworowych, tzw. krążące nowotworowe komórki macierzyste, może rozrastać się w przerzuty. Posiadają one właściwości macierzystości i stanowią najbardziej agresywną frakcję komórek** [44]. Dostępne są różne

podejścia do identyfikacji nowotworowych komórek macierzystych z guza pierwotnego, jednym z nich jest test funkcjonalny, test formowania sfery [45] i jest on powszechnie stosowany do badania właściwości komórek macierzystych (CSCs). W obecnym badaniu wykorzystaliśmy opracowany przez nas test do tworzenia sfer nowotworowych (tumorspheres), aby wyhodować krążące nowotworowe komórki macierzyste z krwi obwodowej chorych osób. Według naszej wiedzy jest to pierwsze badanie, w którym monitorowano liczbę krążących nowotworowych komórek macierzystych podczas RT u pacjentek chorych na raka piersi. U około połowy chorych można było zaobserwować tworzenie się sfery nowotworowej in vitro przynajmniej w jednym punkcie pomiarowym. Wykazywały one ekspresję typowych dla raka piersi markerów komórek macierzystych. Ponownie były to dwie grupy pacjentek, jedna z rosnącą, a druga z malejącą liczbą tumorspheres in vitro podczas RT. **W grupie o wzrastającej liczbie tumorspheres in vitro znalazły się głównie chore z niekorzystnym statusem receptorów hormonalnych i wyższym indeksem Ki-67. Ponadto w tej grupie pacjentek wiele z nich nie otrzymywało chemioterapii.** Tak więc, jak podano wcześniej [31], liczba tumorspheres korelowała z niekorzystnymi cechami guza pierwotnego. U chorych, które otrzymały chemioterapię neoadjuwantową, częściej w warunkach in vitro obserwowano tworzenie się sfer nowotworowych w porównaniu z chorymi, które otrzymały chemioterapię adjuwantową lub nie otrzymały chemioterapii. Po chemioterapii neoadjuwantowej wzrost liczby tumorspheres podczas RT stwierdzono u 63% pacjentek i u 69% pacjentek, które nie otrzymały żadnej chemioterapii. Podobnie jak CETCs komórki o właściwościach nowotworowych komórek macierzystych mogą zostać uwolnione z guza pierwotnego podczas chemioterapii neoadjuwantowej. W grupie chorych po chemioterapii neoadjuwantowej częściej niż u pozostałych pacjentek obserwowaliśmy antydromowy spadek liczby CETCs w stosunku do wzrostu liczby tumorspheres wyhodowanych z cCSCs in vitro, co wskazuje, że komórki macierzyste nowotworu mogą być odporne na radioterapię.

Uzyskane przez nas wyniki zmniejszenia liczby pojedynczych CETC podczas RT i zwiększenia liczby tumorspheres po leczeniu neoadjuwantowym mogą również wspierać hipotezę, że w warunkach stresu wywołanego promieniowaniem, komórki nowotworowe mogą ulegać odróżnicowaniu w kierunku nowotworowych komórek macierzystych. Komórki te mogą następnie uzyskać fenotypy i funkcje CSCs, w tym radiooporność, co wskazuje, że radioterapia może bezpośrednio powodować generowanie nowych CSCs z nie-macierzystych komórek nowotworowych [46]. Zmiany w liczbie CETCs, ale przede wszystkim zmiany w liczbie tumorspheres wyhodowanych z cCSCs in vitro, mogą mieć znaczenie dla nawrotu choroby nowotworowej.

Wnioski

Udało się wykazać, że CETCs przed RT mają takie same właściwości molekularne jak komórki w guzie pierwotnym, co z kolei wskazuje, że wykryte komórki są komórkami

nowotworowymi. Ponadto udało nam się zidentyfikować subpopulację CETCs, które były zdolne do klonalnego wzrostu in vitro w tzw. tumorspheres i posiadały właściwości komórek macierzystych. **Nasze wstępne wyniki wskazują, że zmiany w liczbie CETCs, ale przede wszystkim zmiany w liczbie tumorspheres wyhodowanych in vitro z cCSCs podczas radioterapii adjuwantowej mogłyby odzwierciedlać aktywność choroby resztkowej po operacji oszczędzającej piersi.** Mogłoby to pomóc w identyfikacji chorych ze zwiększonym ryzykiem wznowy miejscowej.