

maintrac® – monitorowanie choroby nowotworowej

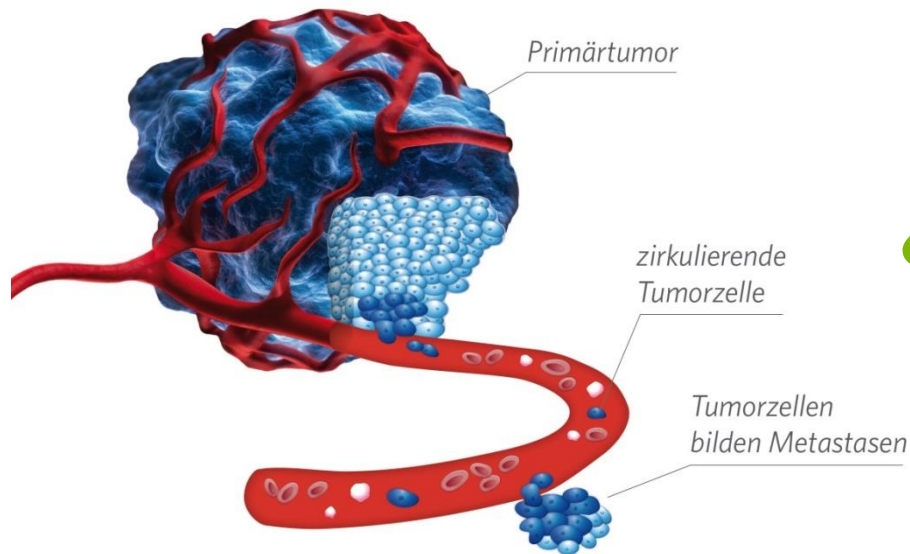
Warszawa, 17 listopad 2016

Dr. med. Monika Pizon

Transfusion Center Bayreuth, Germany

Krążące komórki nowotworowe

Powstawanie przerzutów nowotworowych



- Carcinoma = rak-synonim nowotworów złośliwych **po pochodzenia nabłonkowego**

- Nowotwory złośliwe **uwalniają** komórki nabłonkowe

⇒ **CETCs** (circulating **epithelial** tumor cells)

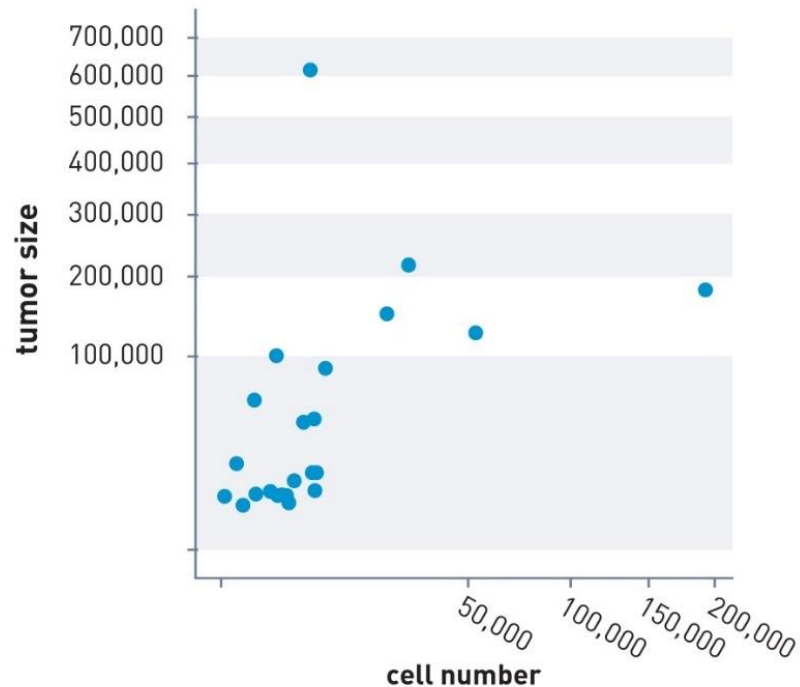
Częstość występowania krążących komórek nowotworowych

Składniki komórkowe krwi	w 1 ml krwi
erytrocyty	4,5 – 5,5 Mrd.
leukocyty	4 – 11 Mio.
neutrofile	2,5 – 7,5 Mio.
eozynofile	40.000 – 400.000
bazofile	10.000 – 100.000
limfocyty	1,5 – 3,5 Mrd.
monocyty	200 – 800 Mio.
trombocyty	300 Mio.

krążące komórki nowotworowe	10 – 100.000
------------------------------------	---------------------

Zależność pomiędzy ilością krążących komórek nowotworowych i wielkością guza pierwotnego

Correlation between CETCs and tumor size?



correlation = 0.621

Znaczenie oznaczania CETCs

Stadium wczesne

- ▶ pomoc w diagnostyce nowotworów złośliwych
- ▶ ocena rokowania i ryzyka powstania przerzutów
- ▶ monitorowanie odpowiedzi na zastosowane leczenie

Stadium zaawansowane

- ▶ ocena rokowania i wczesne wykrycie progresji choroby
- ▶ monitorowanie odpowiedzi na zastosowane leczenie

maintrac-metoda

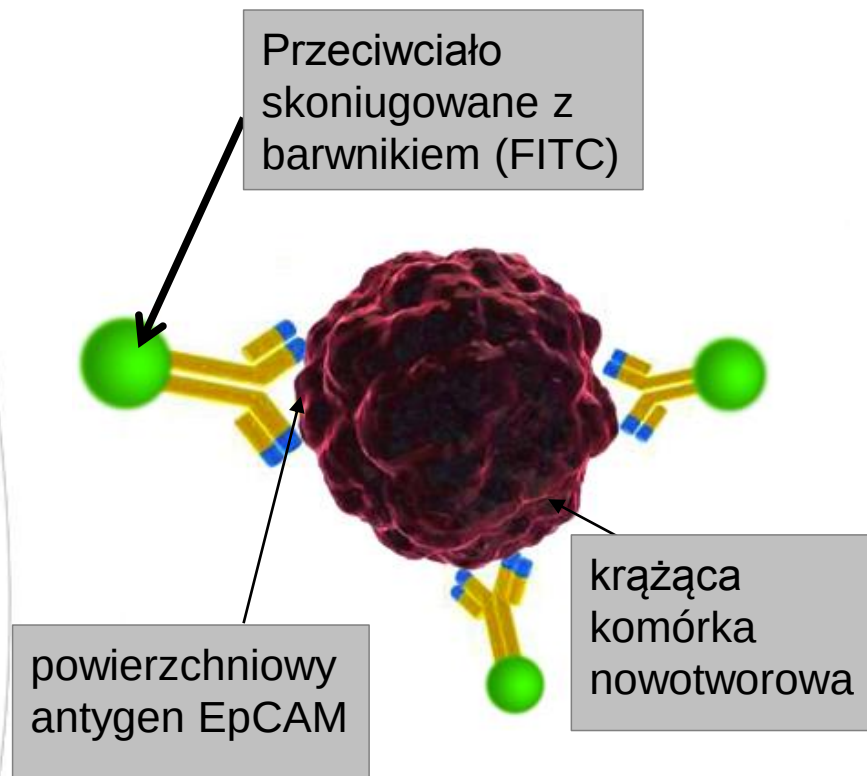
Oznaczanie ilości krążących komórek nowotworowych



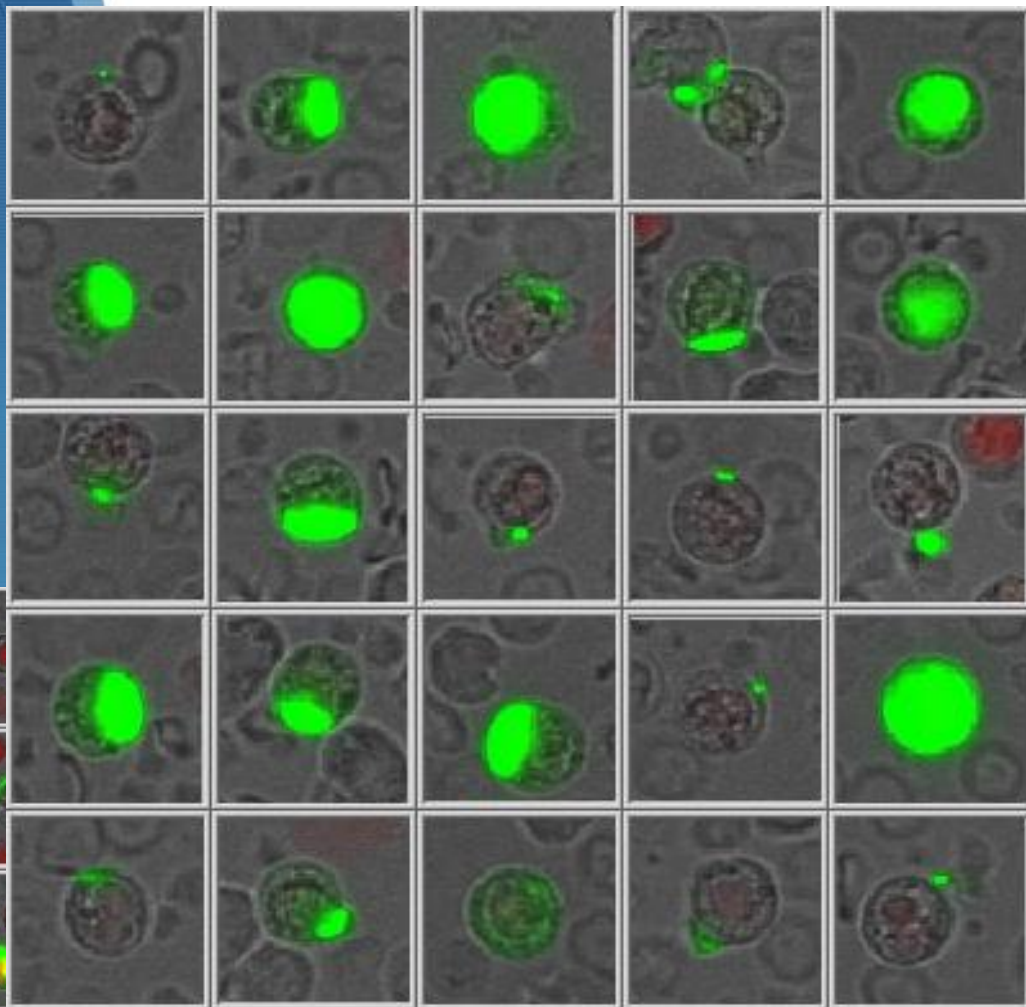
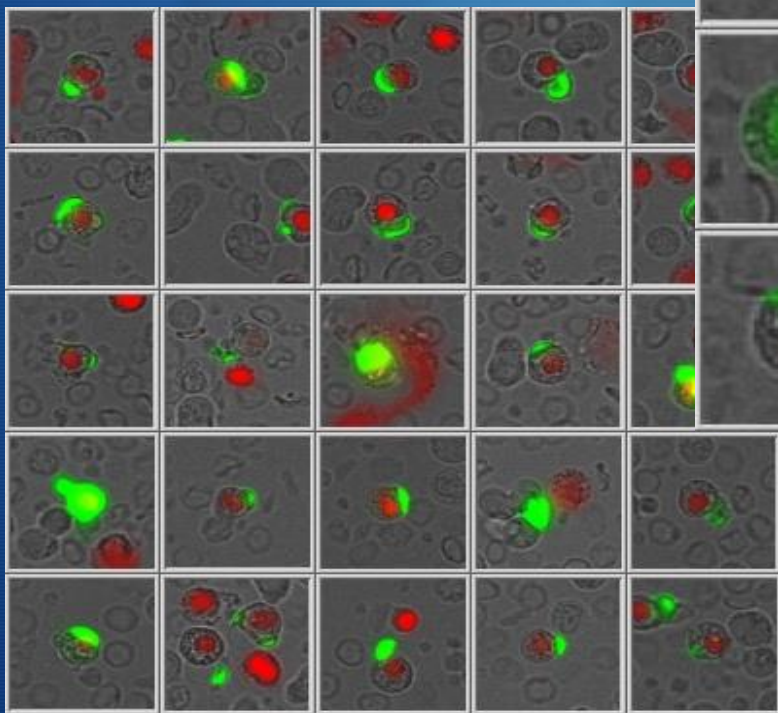
- ocena **EpCAM** (cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych) $\Rightarrow$ fizjologicznie nie występuje na komórkach krążących we krwi
- możliwe** w każdym rodzaju nowotworu nabłonkowego
- niemożliwe** w przypadku chłoniaków i białaczek
- 50 000** badań wykonano w Bayreuth
- 650** pacjentów w badaniu klinicznym

maintrac®

- posiada akredytację **DIN EN ISO 15189**
- Płynna biopsja umożliwiającą **ilościową** detekcję **żywych** krążących komórek nowotworowych
- brak** utrwalania !
- brak** izolacji !
- brak** ekstrakcji !

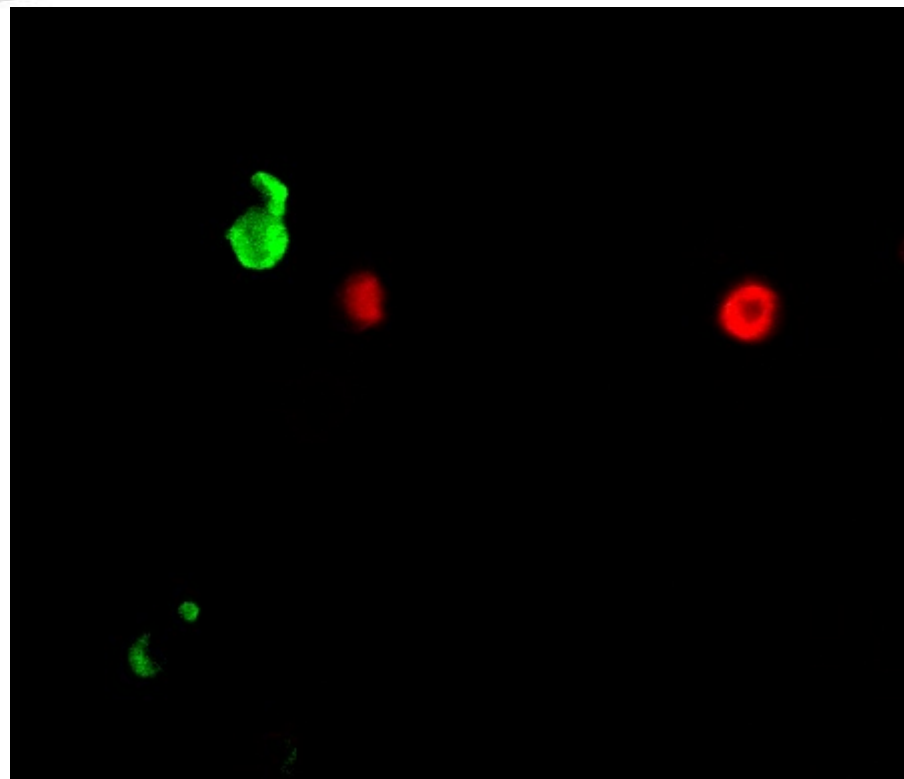
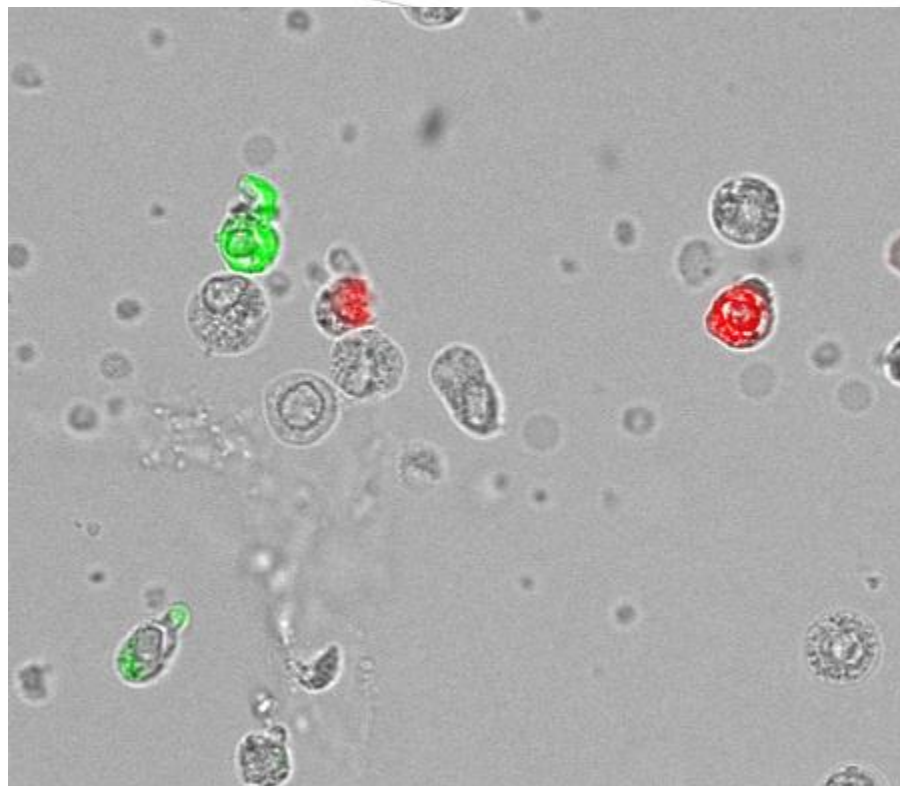


Krażące komórki nowotworowe

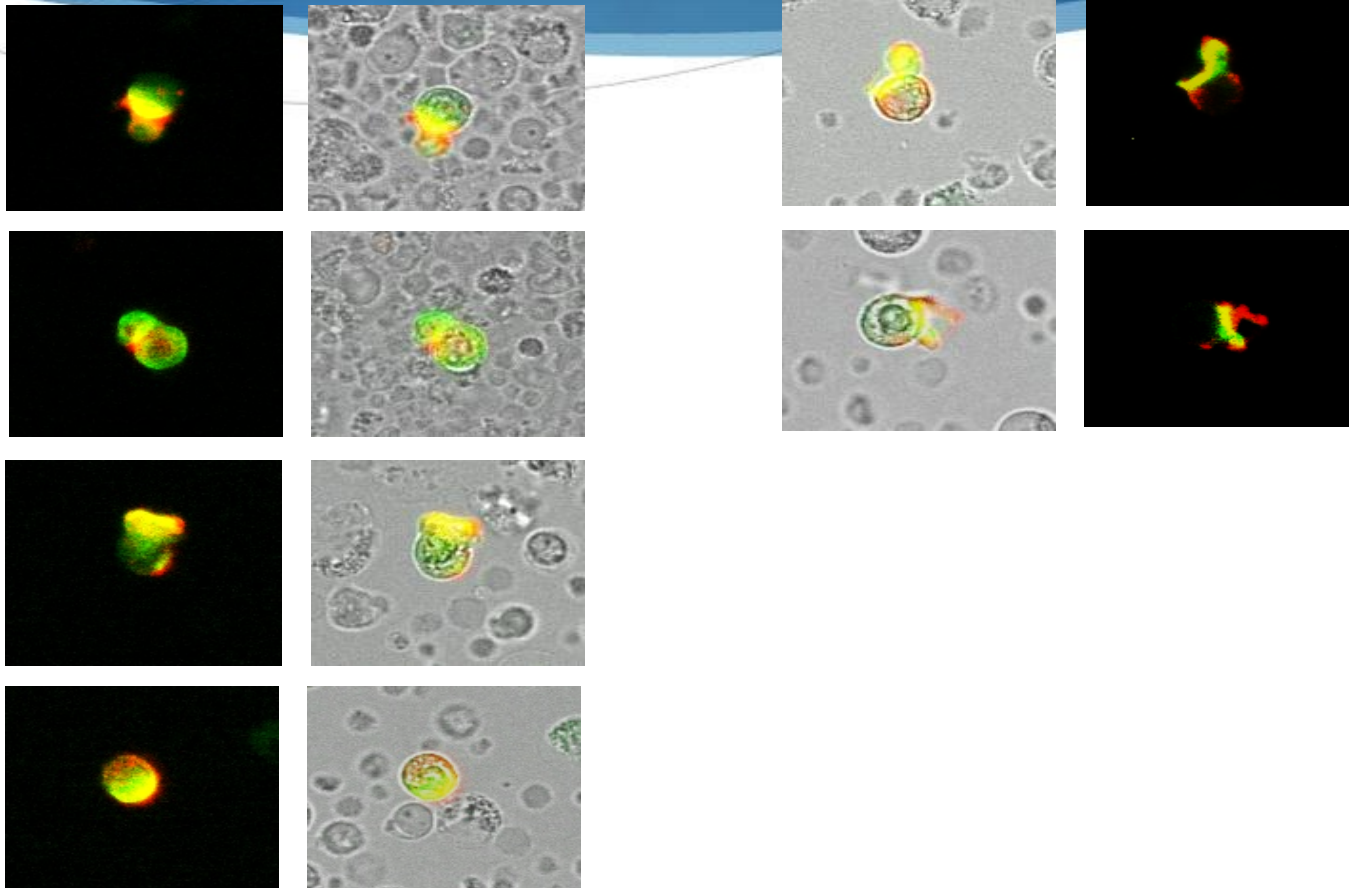


czzerwone jądro
komórkowe
= martwa komórka

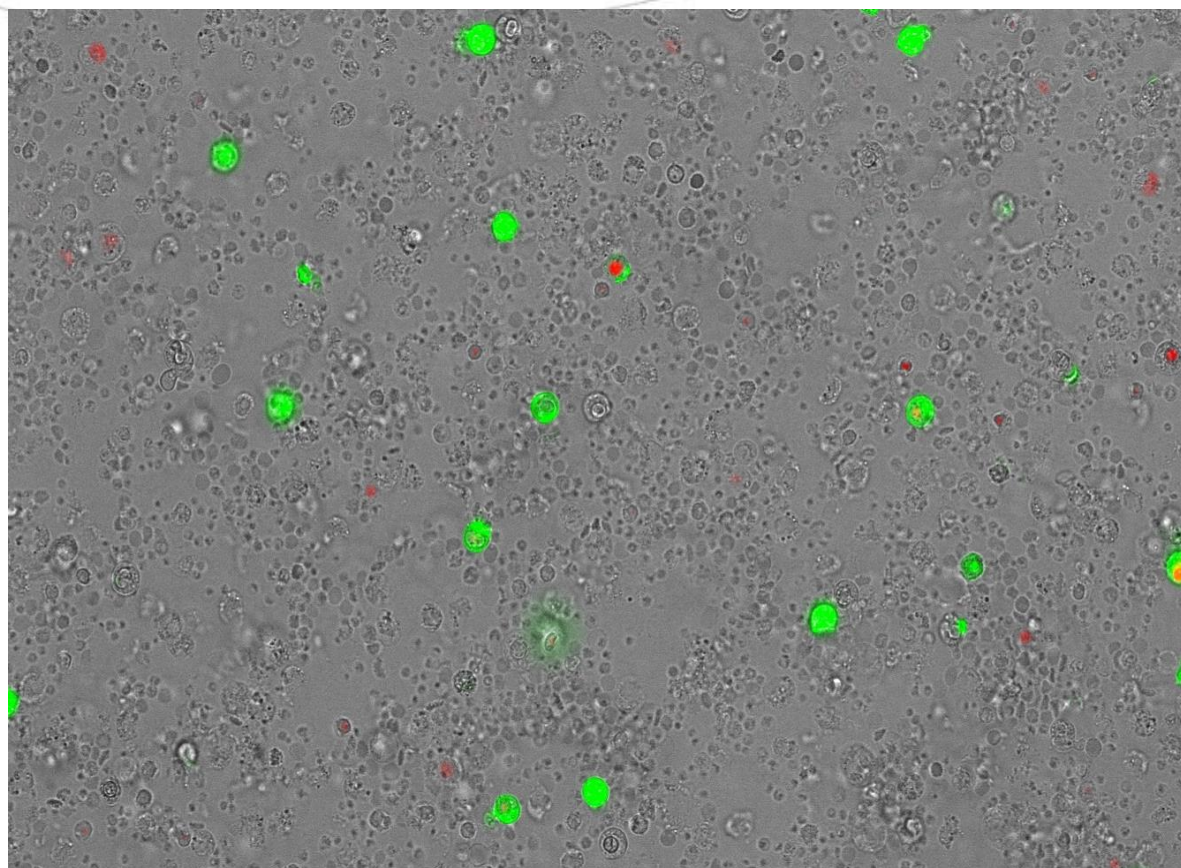
CD45/EpCAM barwienie podwójne



Cytokeratyna/EpCAM barwienie podwójne

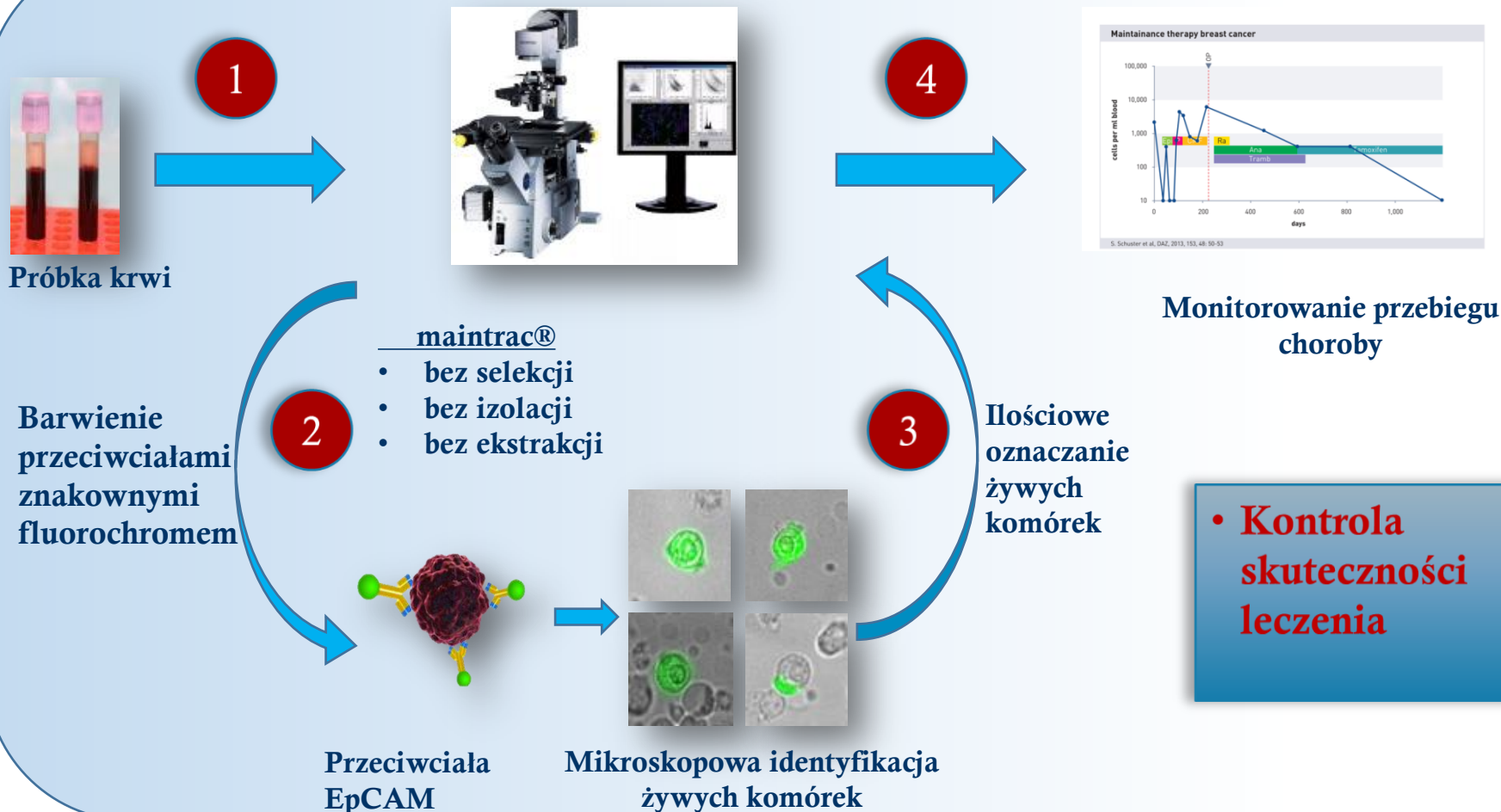


Krew pacjenta z dużą ilością krążących komórek nowotworowych



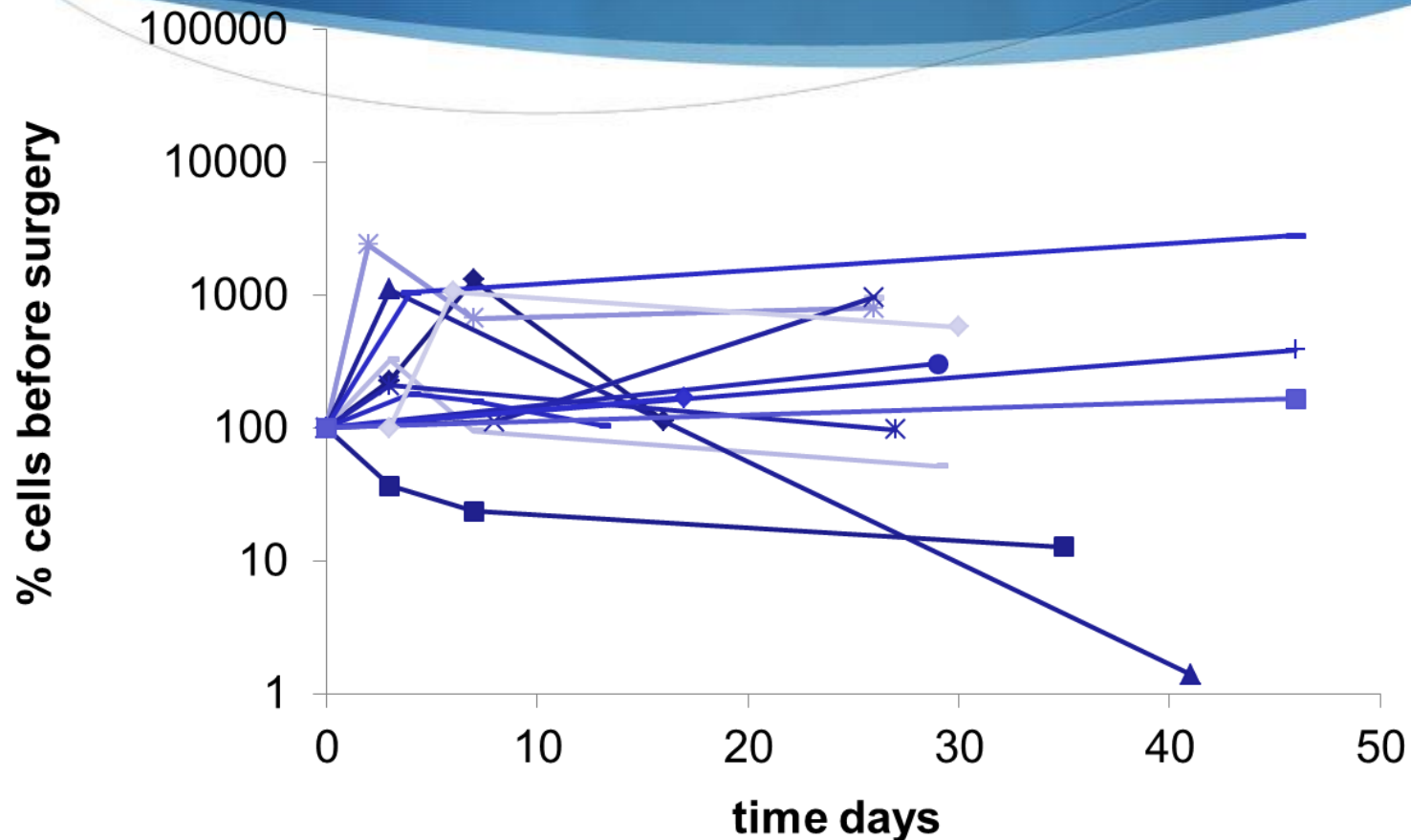
Powiększenie x 200

Workflow



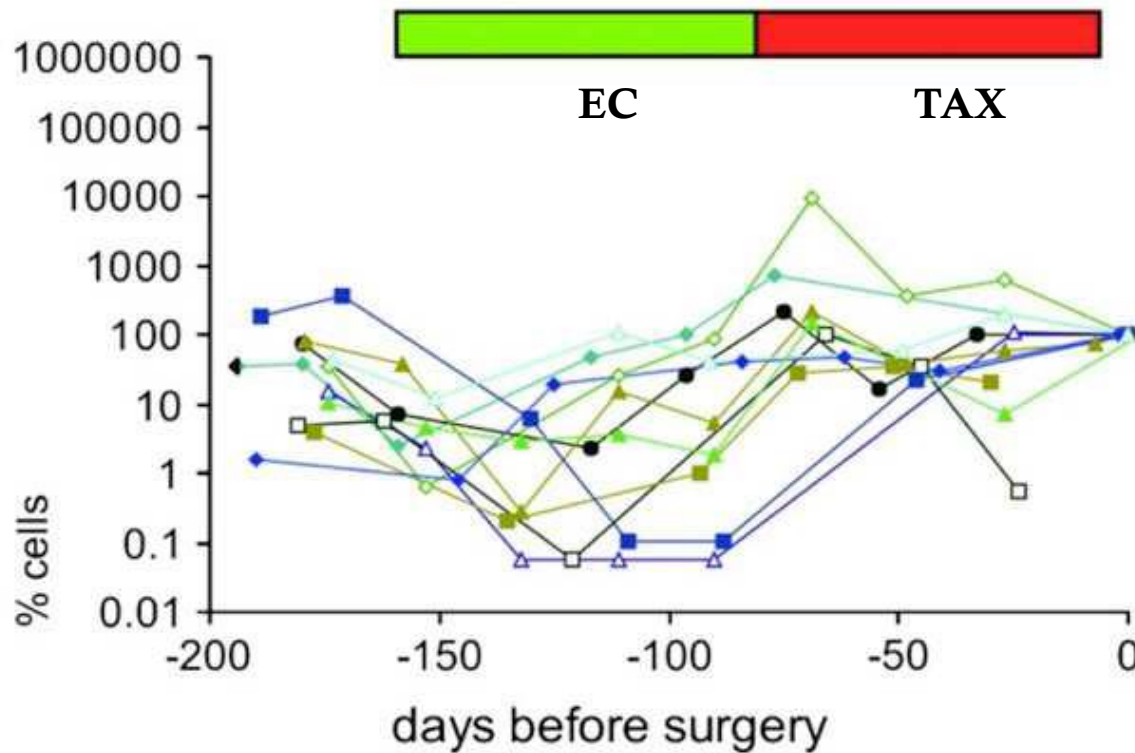
Monitorowanie terapii

Wpływ zabiegu operacyjnego na ilość krążących komórek nowotworowych



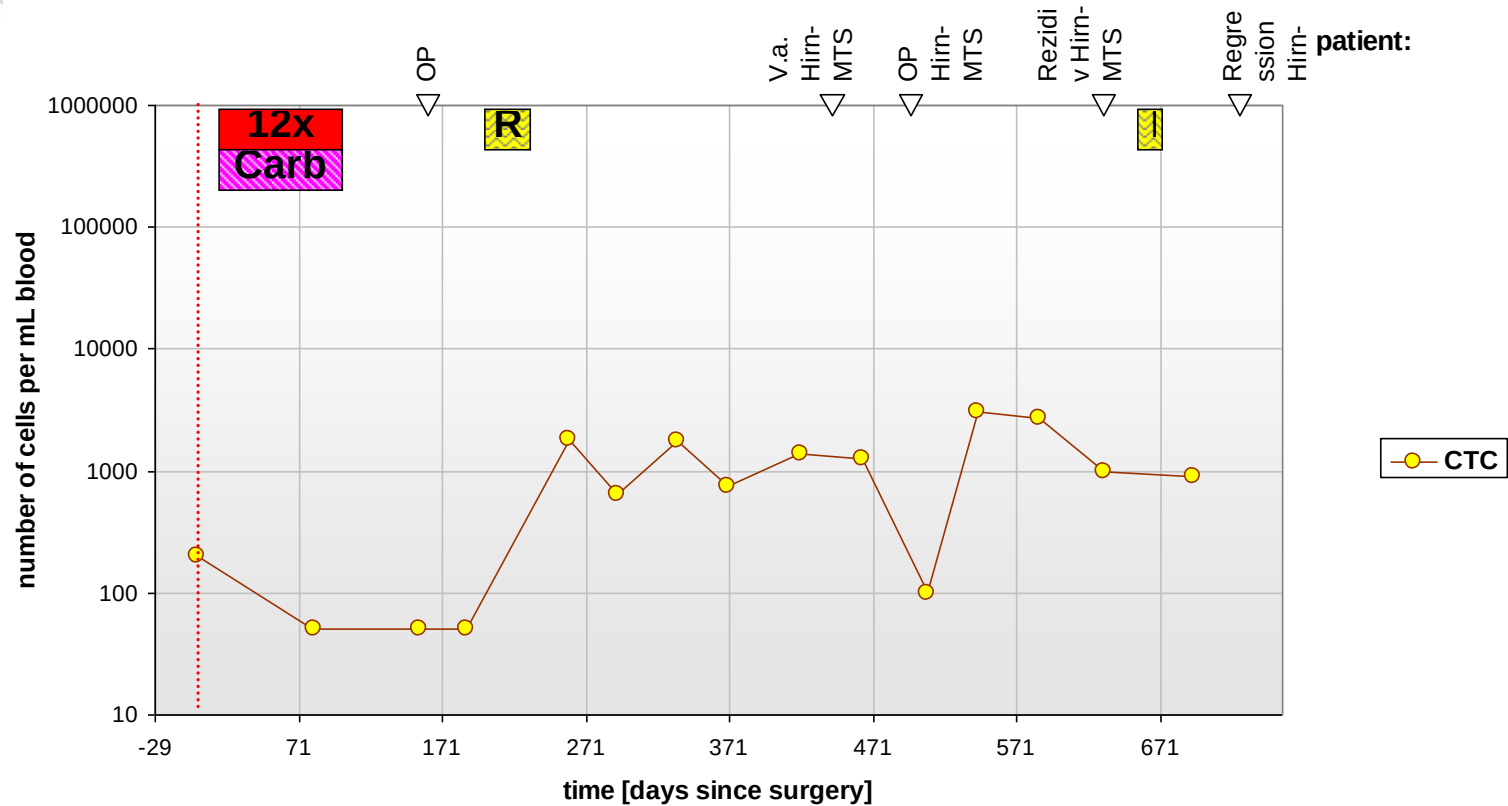
Terapia neoadjuwantowa (indukcyjna)

Terapia neoadjuwantowa



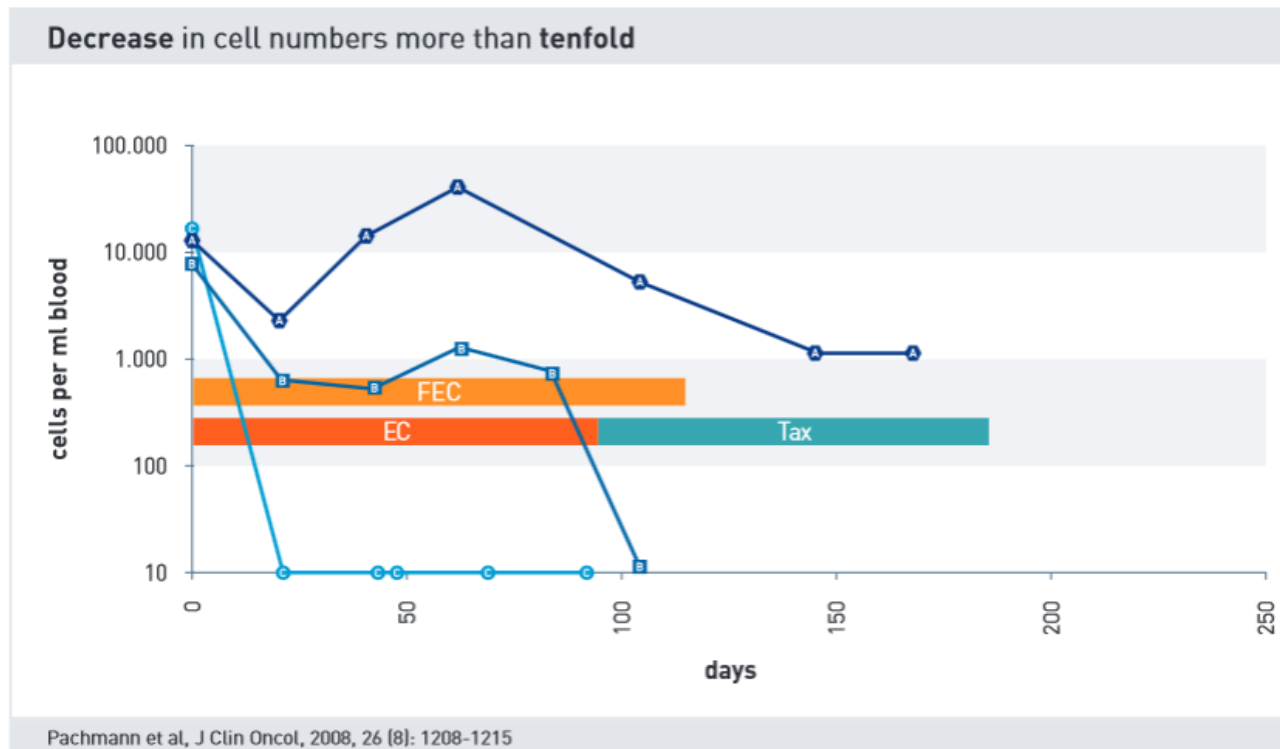
u prawie wszystkich pacjentek zaobserwowano **wzrost** ilości **CETCs** pod koniec terapii neoadjuwantowej

Opis przypadku



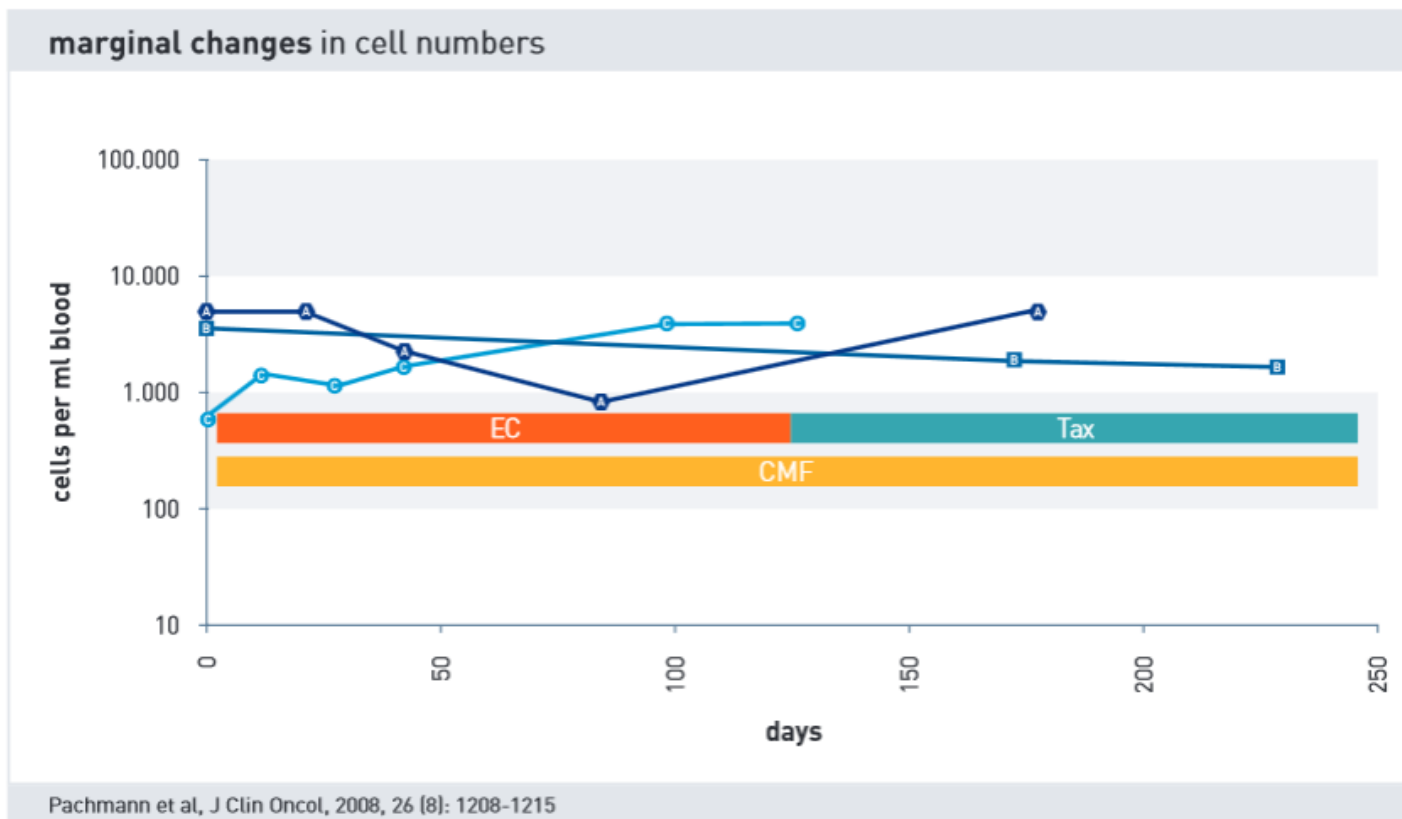
Terapia adjuwantowa (uzupełniająca)

Terapia adjuwantowa spadek ilości CETCs

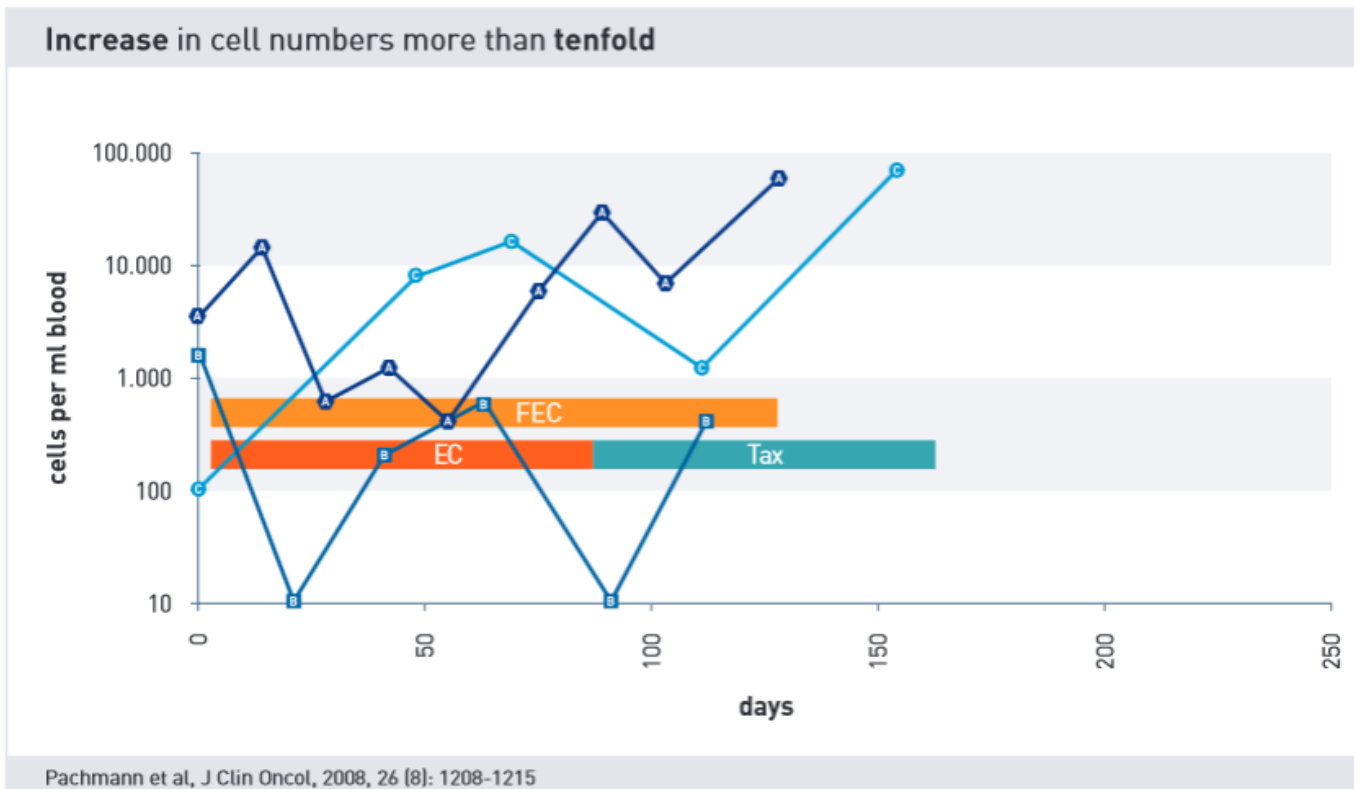


Terapia adjuwantowa

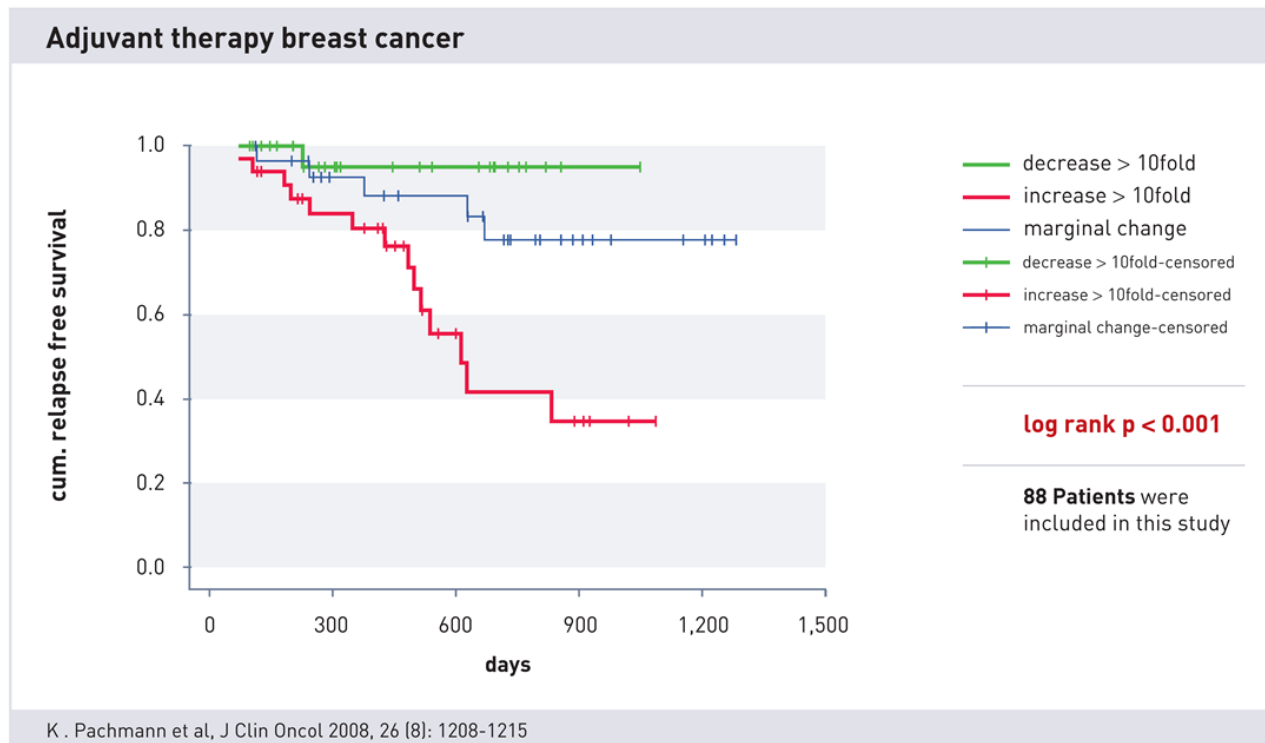
CETCs utrzymują się na stałym poziomie



Terapia adjuwantowa wzrost liczby CETCs



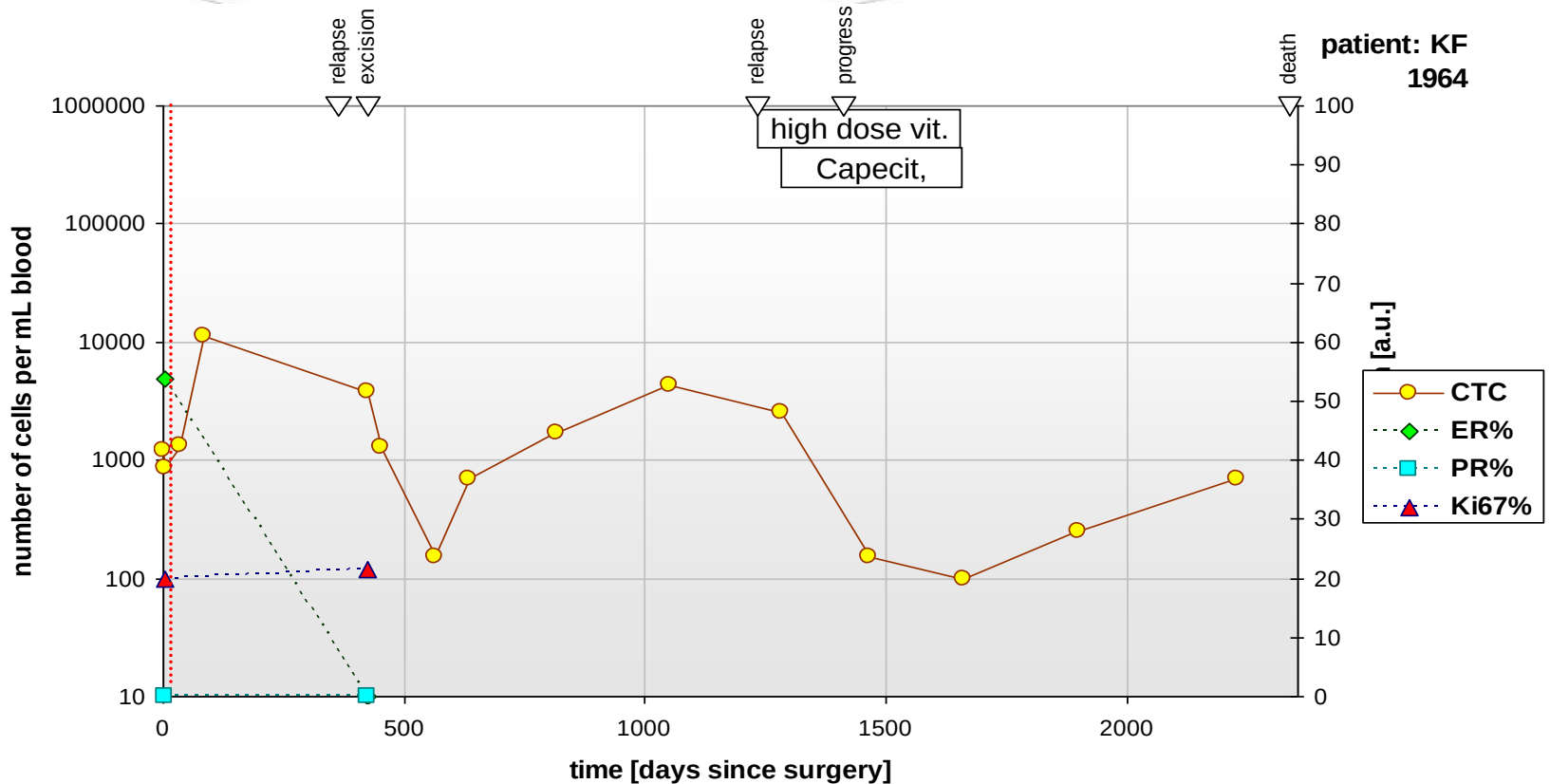
Terapia adjuwantowa



🟢 **Wzrost**
ilości krążących
komórek
nowotworowych
ściśle koreluje ze
złą prognozą

Pacjenci z przerzutami odległymi

Opis przypadku – rak piersi z przerzutami



Problematyka monitorowania pacjentów z przerzutami odległymi

- ◆ Chemioterapia działa na komórki nowotworowe obecne we krwi, jednak stężenie cytostatyków w guzie i/lub przerzutach jest niewystarczająco wysokie
- ◆ Komórki nowotworowe przestają się różnicować, zmniejszając na swojej powierzchni ilość antygenów EpCAM przez co, stają się „niewidzialne“ dla naszej metody. **Możliwość oznaczania krążących macierzystych komórek nowotworowych.**
- ◆ Komórki nowotworowe obecne we krwi przemieszczają się do obecnych metastaz (recyrkulacja) przez co ich ilość we krwi zmniejsza się do poziomu nieoznaczalnego

Wzrost CETCs - czy
możemy zrobić coś
więcej ?

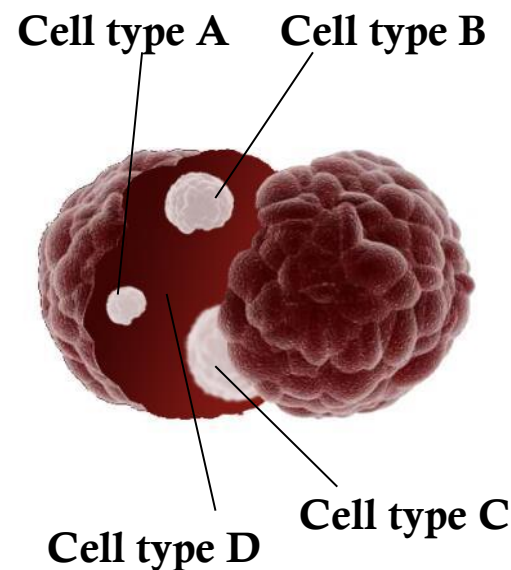
oznaczanie
chemowrażliwości

Badanie chemowrażliwości

- określenie wpływu różnych leków na **redukcję żywotności komórek nowotworowych**
- ustalenie jaki lek będzie najbardziej efektywny w leczeniu choroby nowotworowej u **konkretnego Pacjenta**
- zasada podobna do antybiogramu wykonywanego rutynowo w infekcjach bakteryjnych

Trudności z oznaczaniem chemowrażliwości z tkanki nowotworowej

- 🟢 **dostępność** materiału
- 🟢 **heterogeniczność** guza pierwotnego
- 🟢 **heterogeniczność** pomiędzy guzem pierwotnym i przerzutami
- 🟢 **zanieczyszczenie** próbki komórkami nienowotworowymi
- 🟢 **Skomplikowane, czasochłonne i kosztowne procedury**

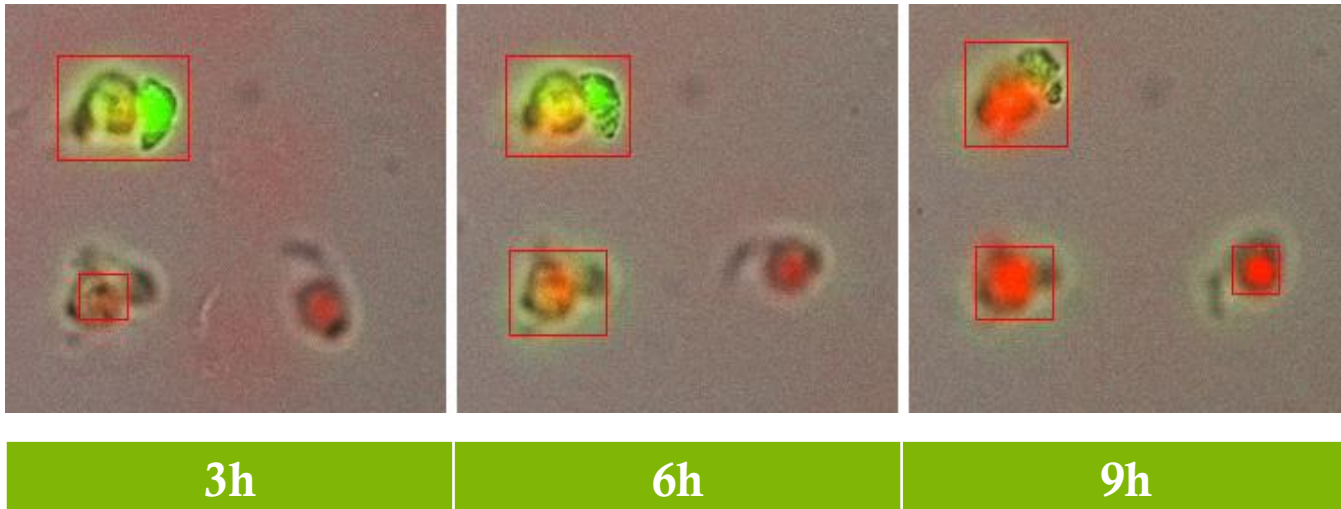


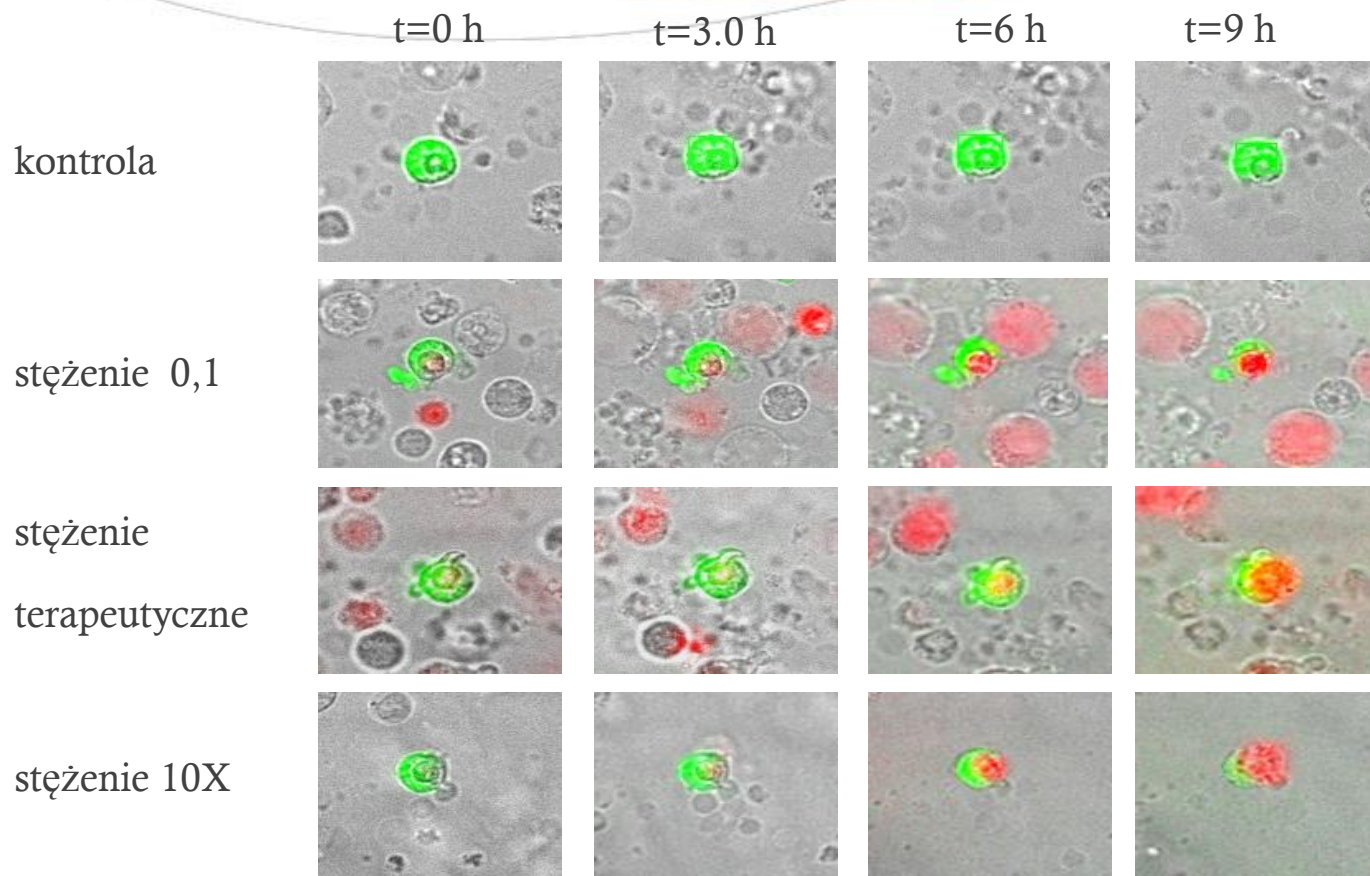
Ocena chemowrażliwości krążących komórek nowotworowych



- **Ocena ilości martwych krążących komórek nowotworowych pod wpływem działania leków cytotoksycznych**

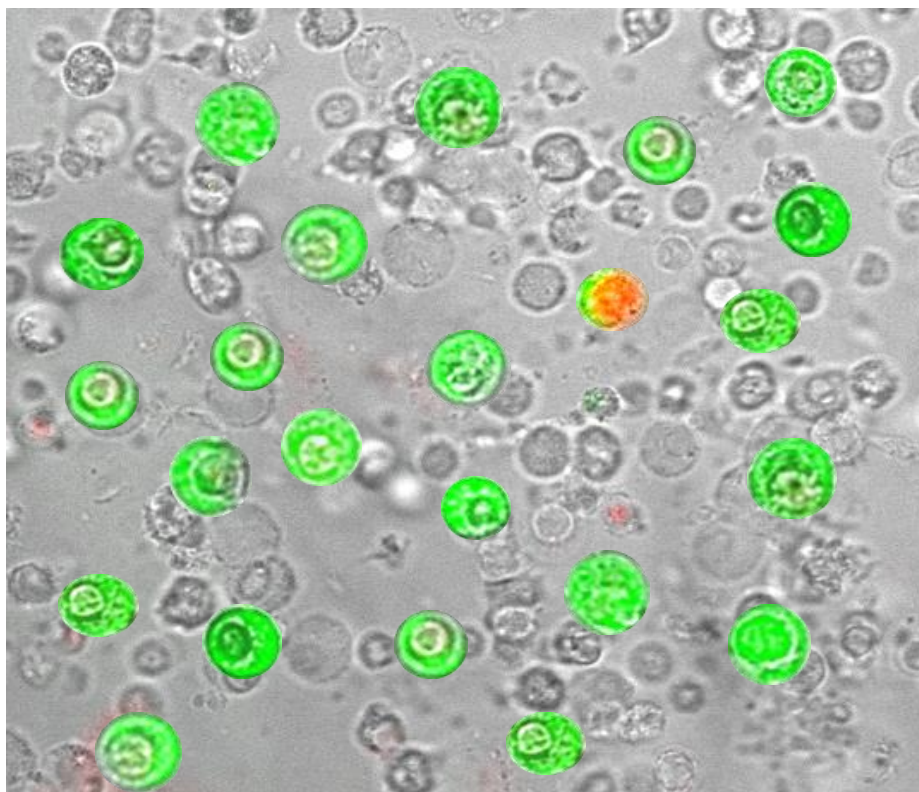
% obumarłych CETCs mierzony jest po 3, 6, 9 godzinnej inkubacji z lekami cytotoksycznymi



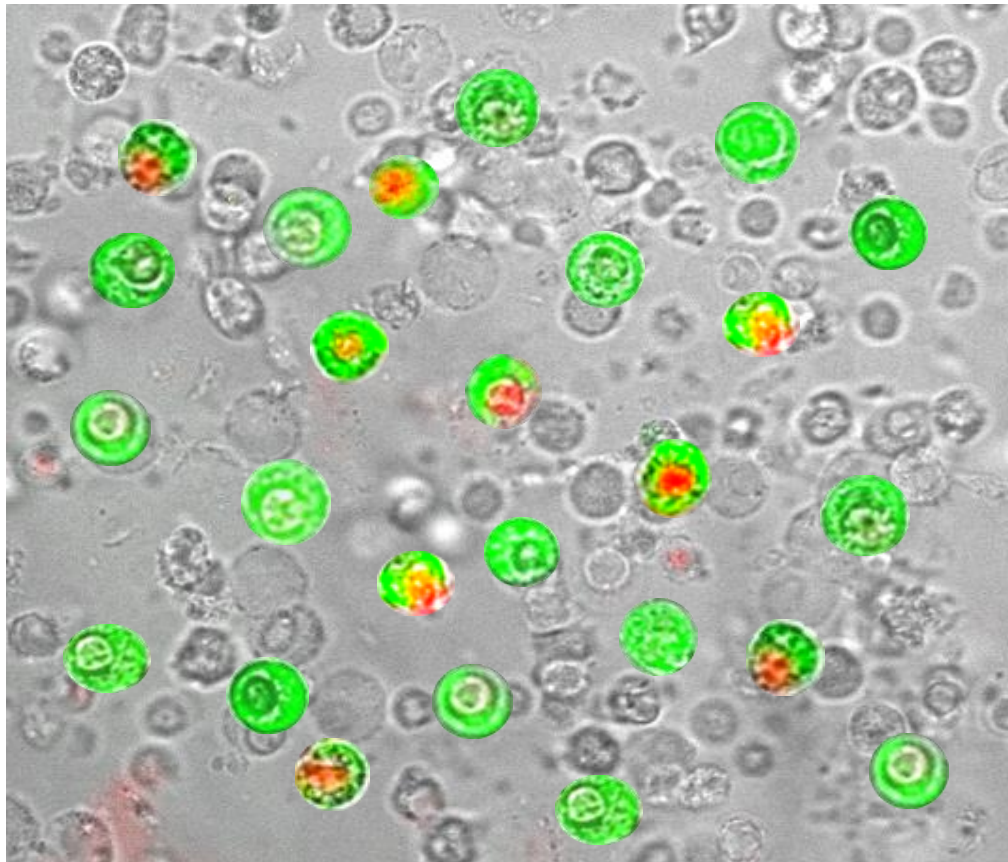


Pomiar ilości obumarłych krążących komórek nowotworowych
w obecności danego leku

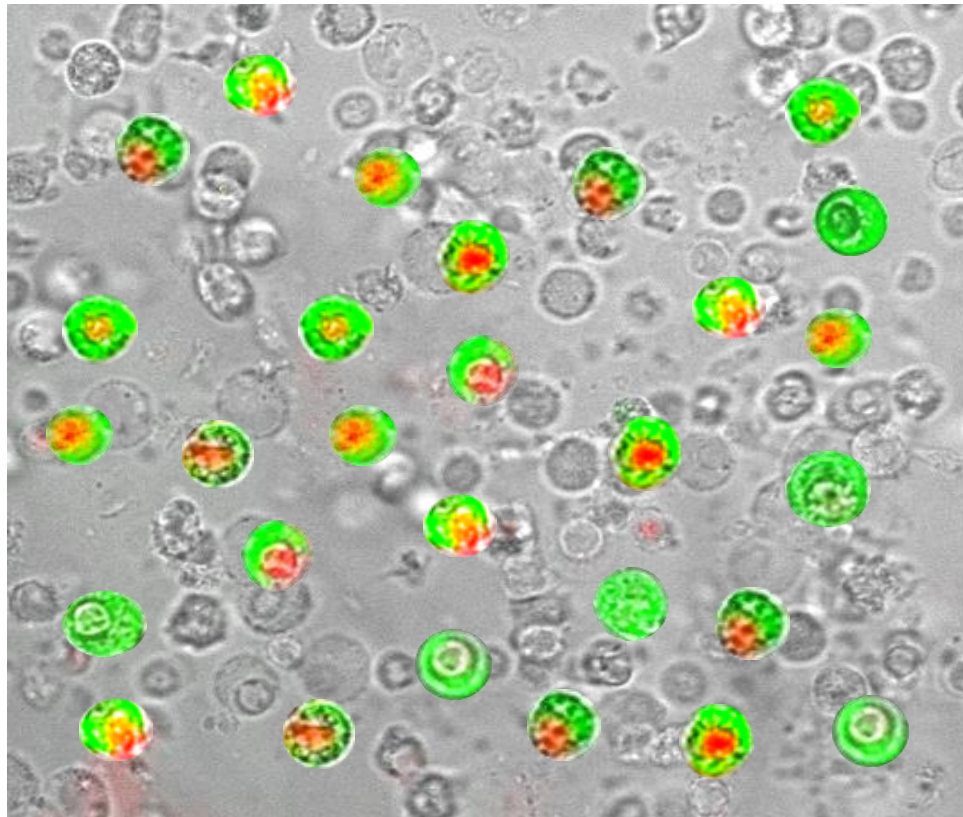
krążące komórki nowotworowe **oporne** na działanie
leku cytotoksycznego



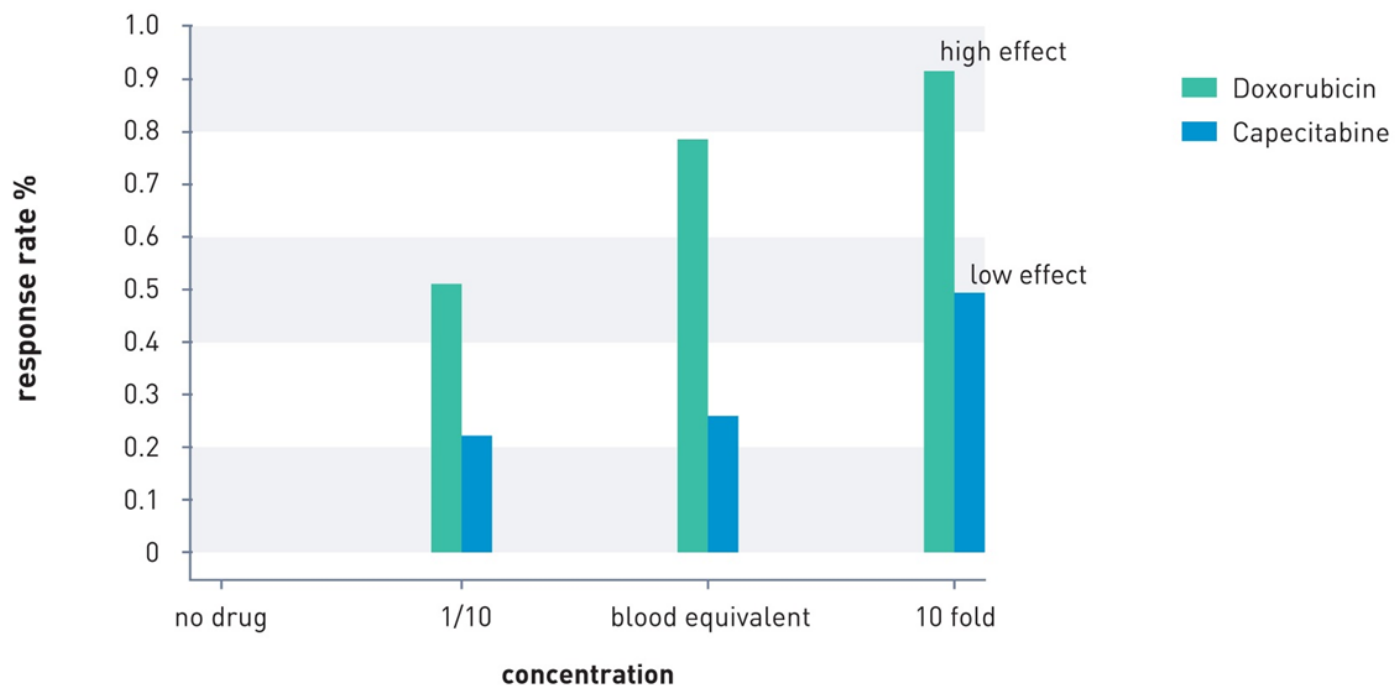
krążące komórki nowotworowe **częściowo wrażliwych** na
działanie leku cytotoksycznego



krążące komórki nowotworowe **wrażliwe** na działanie
leku cytotoksycznego



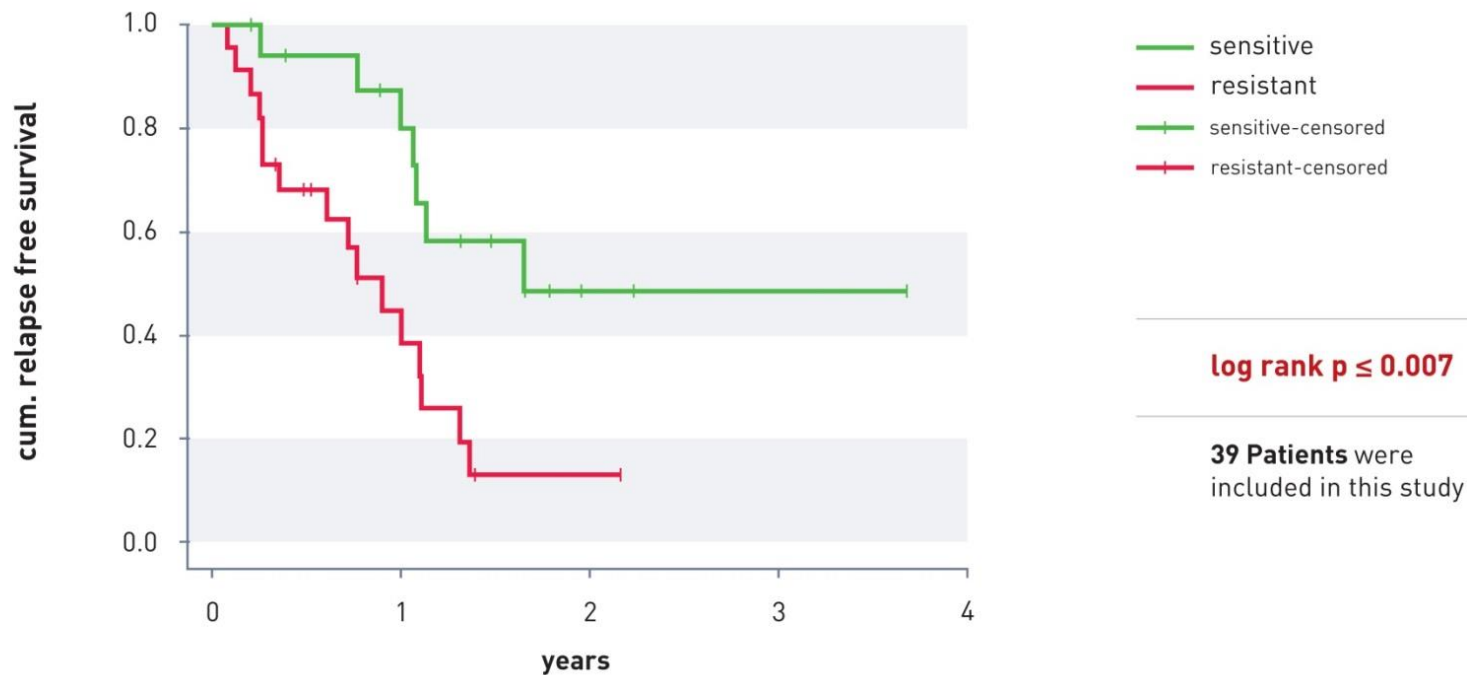
Doxorubicin vs Capecitabine 3h



N. Rüdiger et al., J Cancer Therapy 2013, 4, 597-605

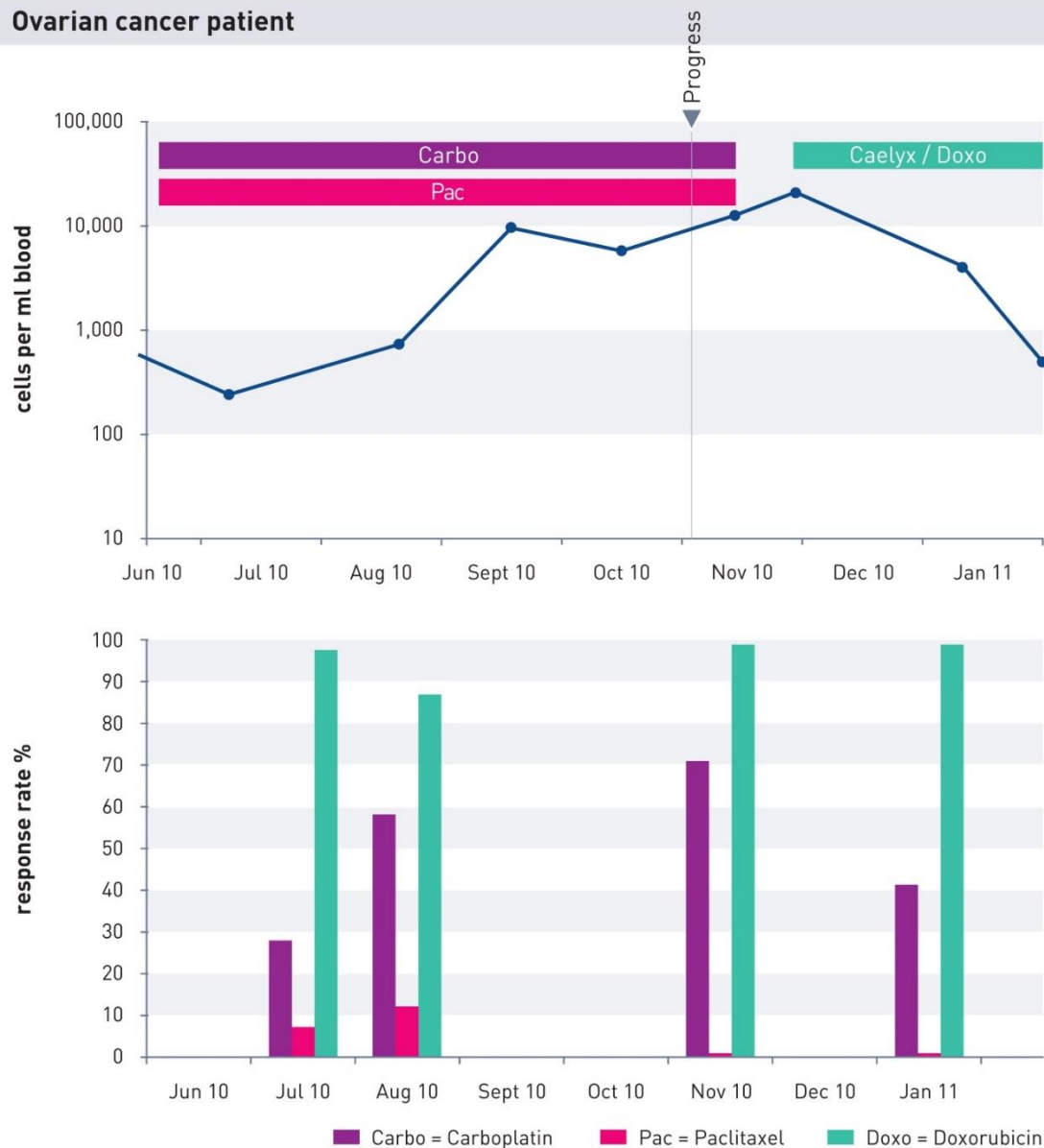
Znaczenie testu chemowrażliwości

Chemosensitivity ovarian cancer: sensitive vs. resistant tumor cells



N. Rüdiger et al, J Cancer Therapy, 2013, 4, 597-605

Ovarian cancer patient



C. Weigl et al., J Onko, 2014

Breast cancer patient



N. Rüdiger et al., J Cancer Therapy, 2013, 4, 597-605

Antyhormonalna terapia podtrzymująca

Antyhormonalna terapia podtrzymująca

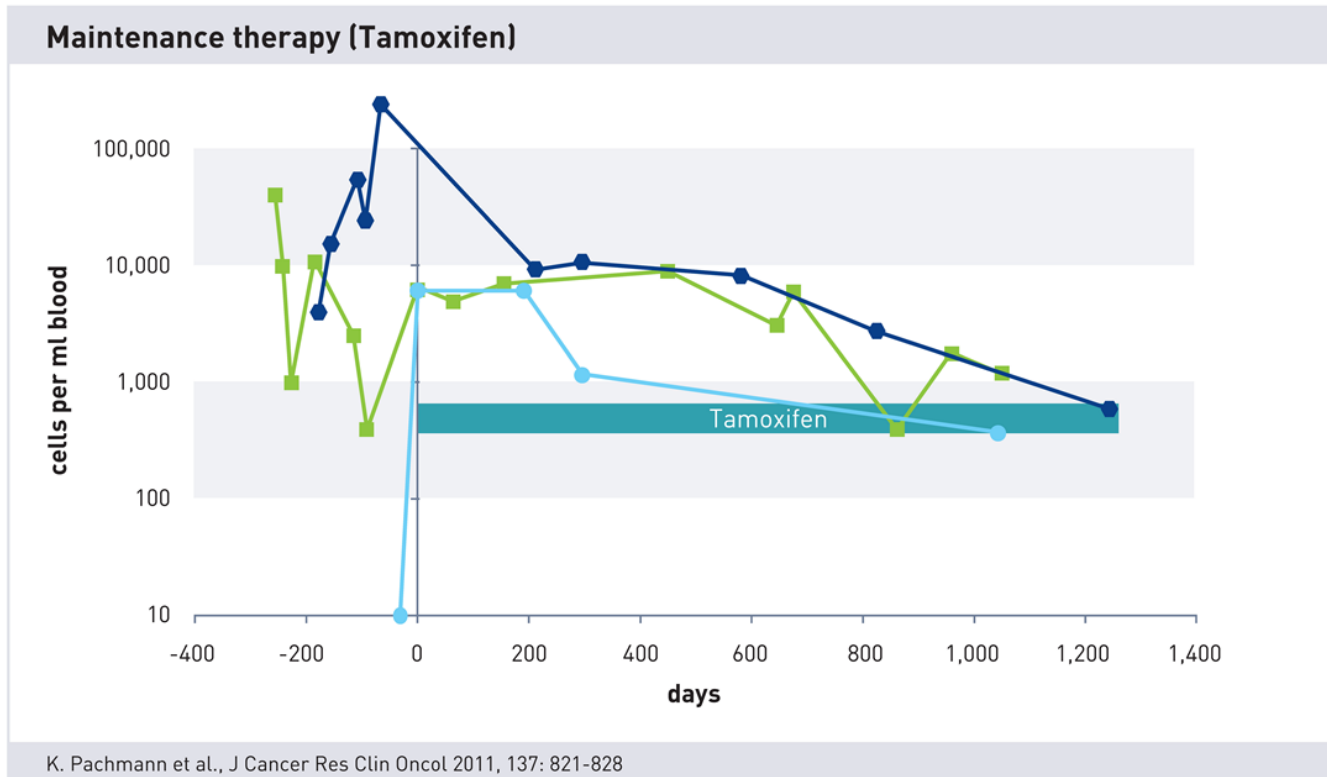
- Ca. **80%** nowotworów złośliwych piersi wykazuje ekspresję **receptora estrogenowego**, co wiąże się z **korzystniejszym rokowaniem** i możliwością **leczenia antyhormonalnego**
→ Tamoxifen lub inhibitory aromatazy
- u **10-15%** pacjentek dochodzi do **progresji** choroby w czasie terapii antyhormonalnej, a po jej zakończeniu u kolejnych **20%**

Badania kontrolne po zakończeniu leczenia onkologicznego

- 💧 Samokontrola co miesiąc
- 💧 Badanie przedmiotowe:
 - co 3 miesiące przez pierwsze 2 lata
 - co 6 miesięcy do 5 lat
 - następnie co 12 miesięcy
- 💧 Mammografia: co 12 miesięcy po leczeniu oszczędzającym
- 💧 Badania obrazowe i laboratoryjne: tylko ze wskazań klinicznych

CEL → wczesne wykrycie progresji choroby

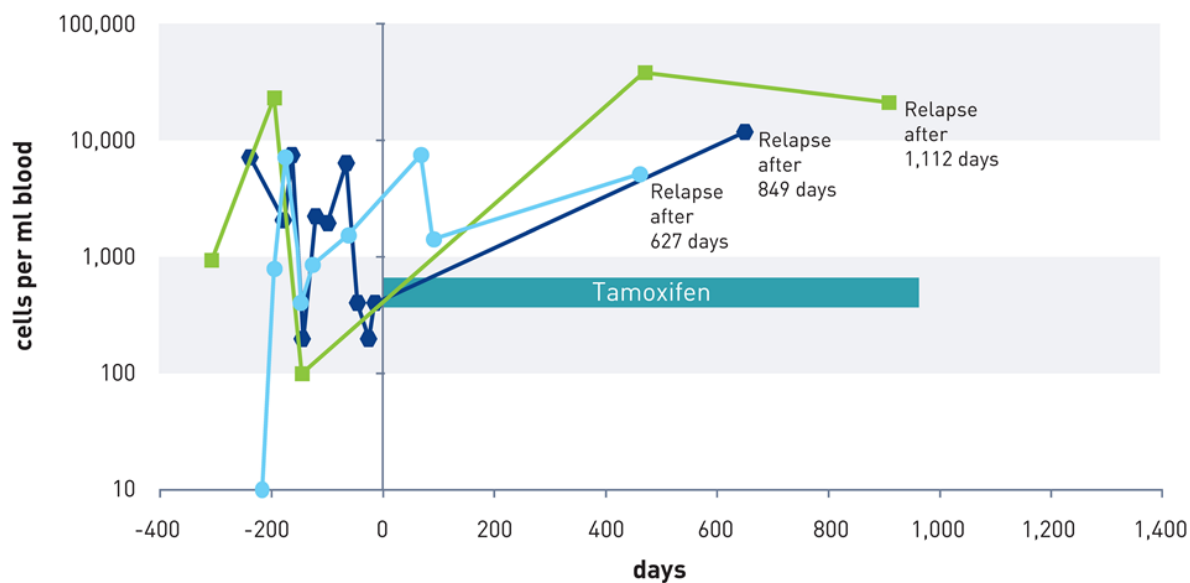
Terapia antyhormonalna



Terapia antyhormonalna

Permanentny
wzrost CTCs
podczas terapii
Tamoxifenem
często prowadzi do
progresji

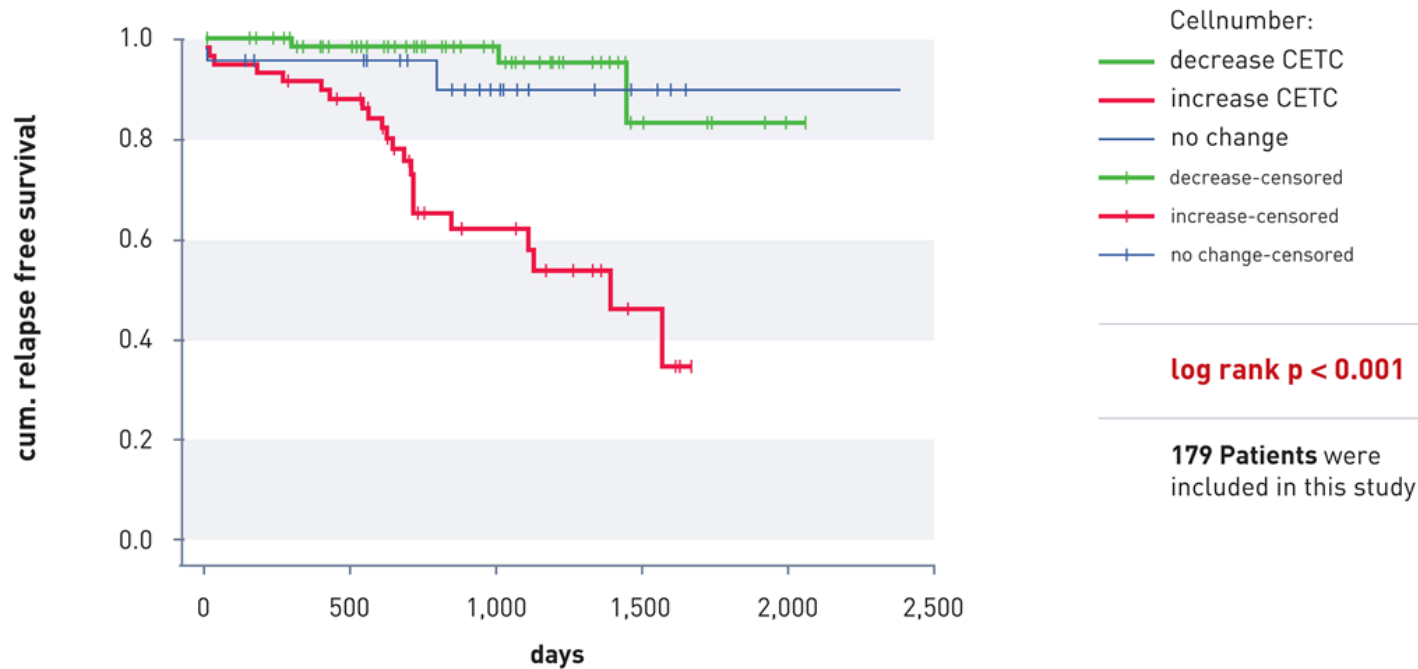
Maintenance therapy (Tamoxifen)



K. Pachmann et al., J Cancer Res Clin Oncol 2011, 137: 821-828

Terapia antyhormonalna

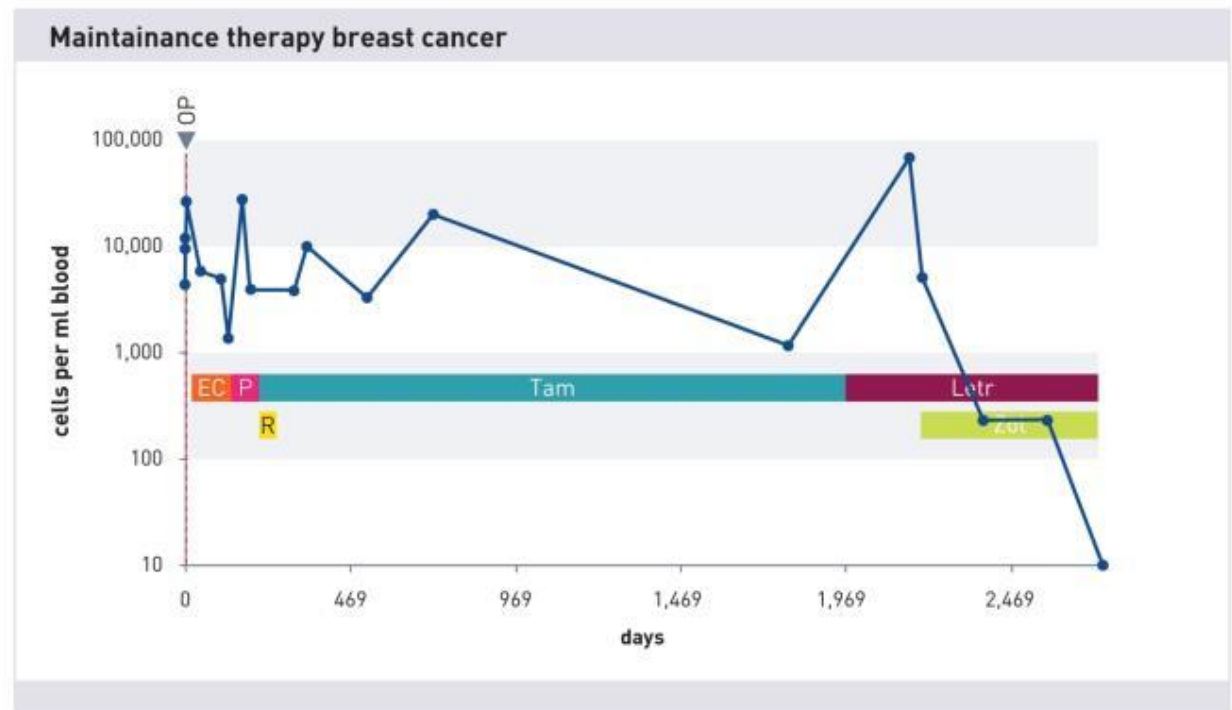
Maintenance therapy (Tamoxifen)



K. Pachmann et al, J Cancer Res Clin Oncol 2011, 137: 821-828

Optimalizacja leczenia antyhormonalnego

Zmiana preparatu na inhibitor aromatazy prowadzi do redukcji CETCs



Terapia
antyhormonal
na

Liczenie CETCs co 3-6
miesięcy

Wzrost CETC

Spadek/stabilne
CETC

Zmiana
leczenia

Kontynuowanie
leczenia

Kontrola CETC
po 3
miesiącach

Kontrola CETC
po 6
miesiącach

Wzrost CETCs



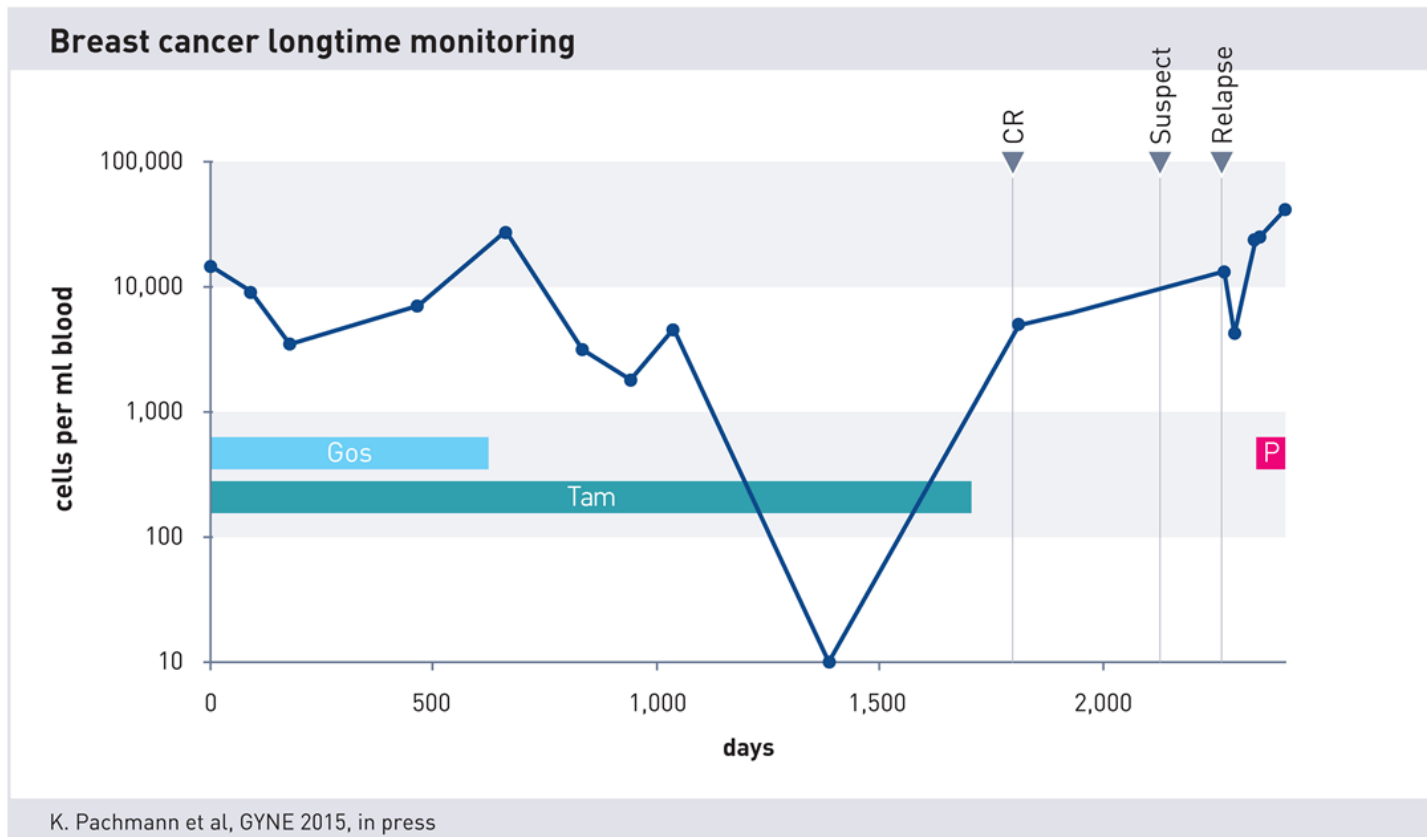
zmiana leczenia i
monitorowanie ilości co
3-6 miesięcy

Zakończenie terapii antyhormonalnej

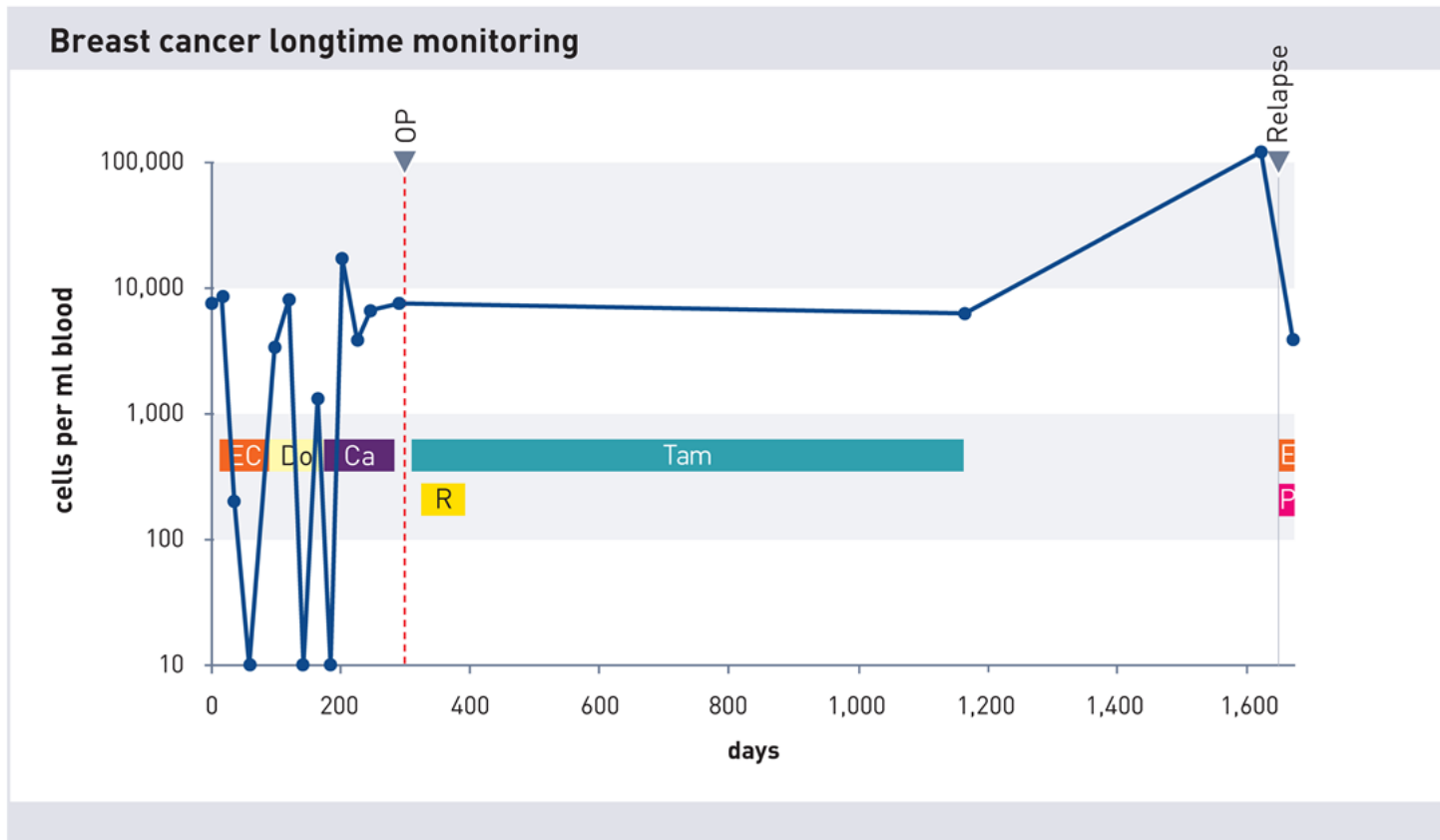
Tamoxifen/inhibitory aromatazy 5 lat czy dłużej ?

- 💧 Przedłużenie terapii **tamoxifenem** o kolejne 5 lat **redukuje** ryzyko wznowy o **25%**
- 💧 Przedłużenie terapii **inhibitorami aromatazy** **redukuje** ryzyko wznowy o **35%**

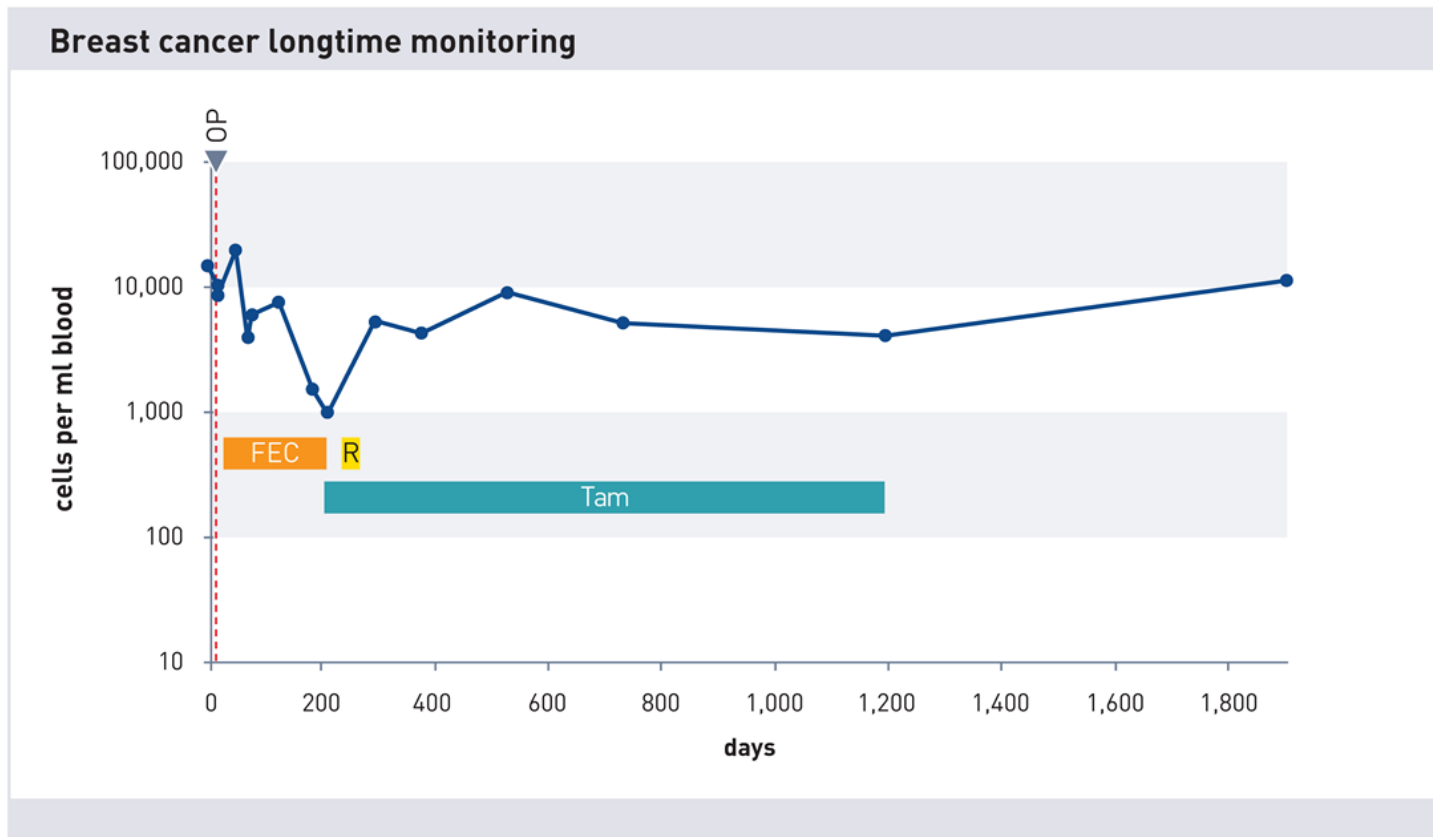
Tamoxifen 5 lat czy dłużej ?



Tamoxifen 5 lat czy dłużej ?

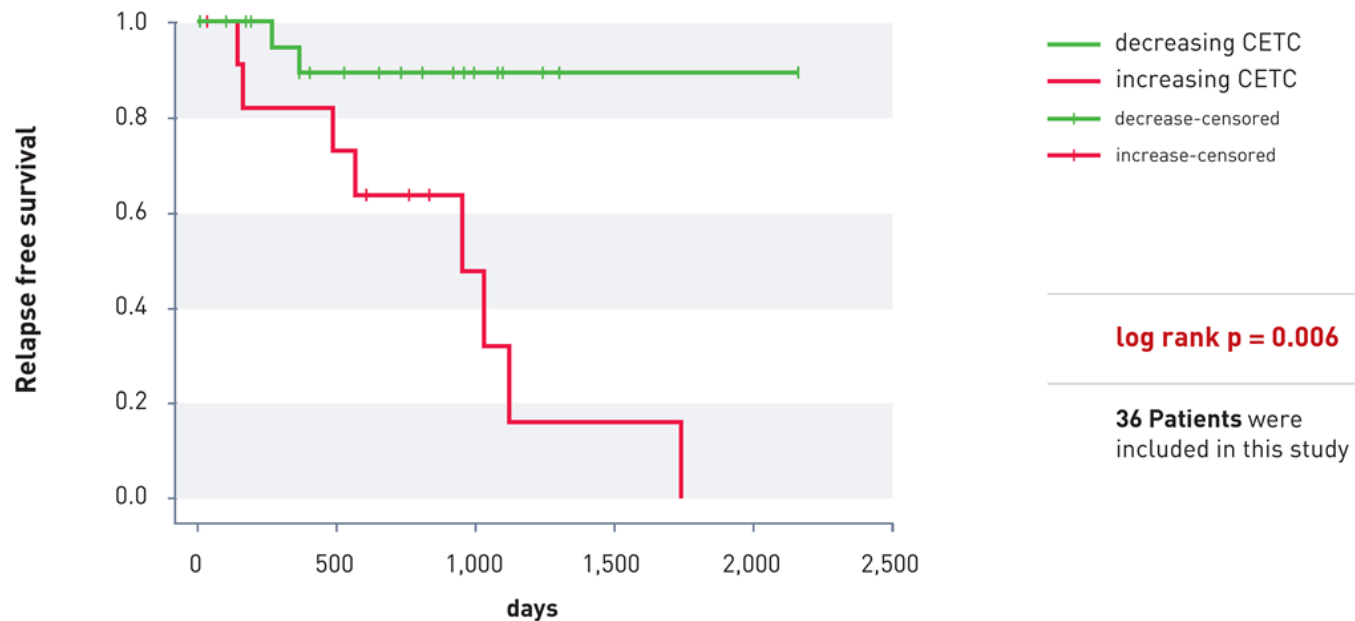


Tamoxifen 5 lat czy dłużej ?



Tamoxifen 5 lat czy dłużej ?

After tamoxifen therapy: CETC



K. Pachmann et al., GYNE 2015, in press

Zakończenie
terapii
antyhormonalnej

Oznaczanie CETC podczas
terapii i 4-6 tygodni po jej
zakończeniu

Wzrost CETC

Spadek/stabilne
CETC

Ponowne
rozpoczęcie
terapii

Brak terapii

Kontrola CETC
po 3
miesiącach

Kontrola CETC
po 6
miesiącach

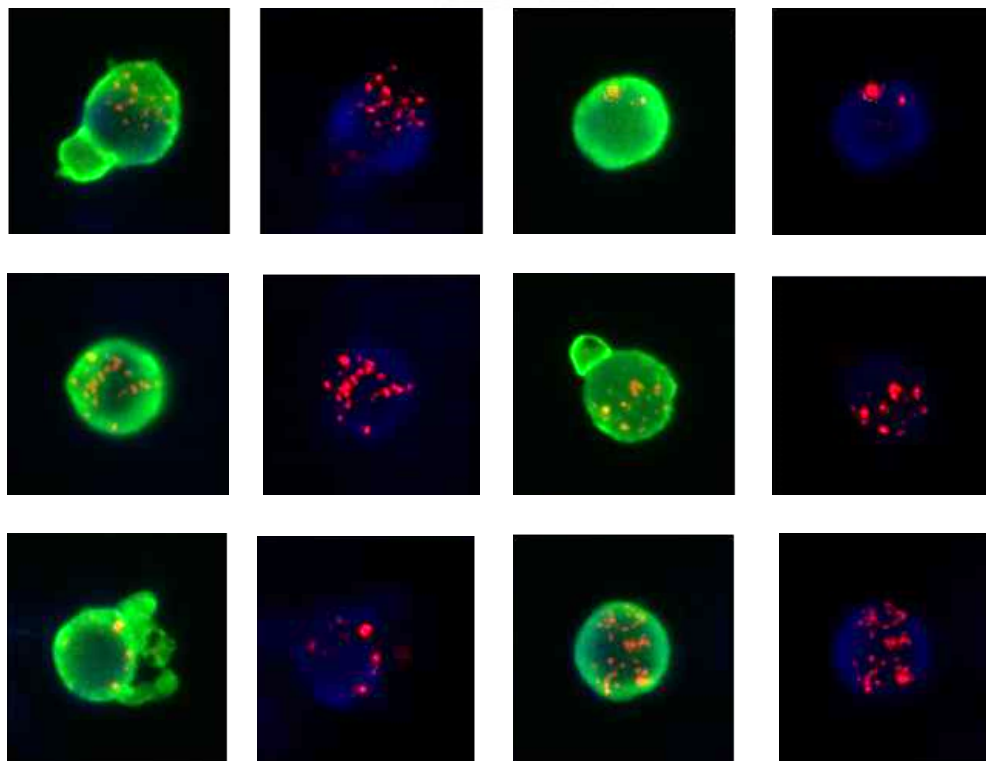
Wzrost CETCs



ponowne rozpoczęcie
terapii **podtrzymującej**

Charakterystyka CETCs

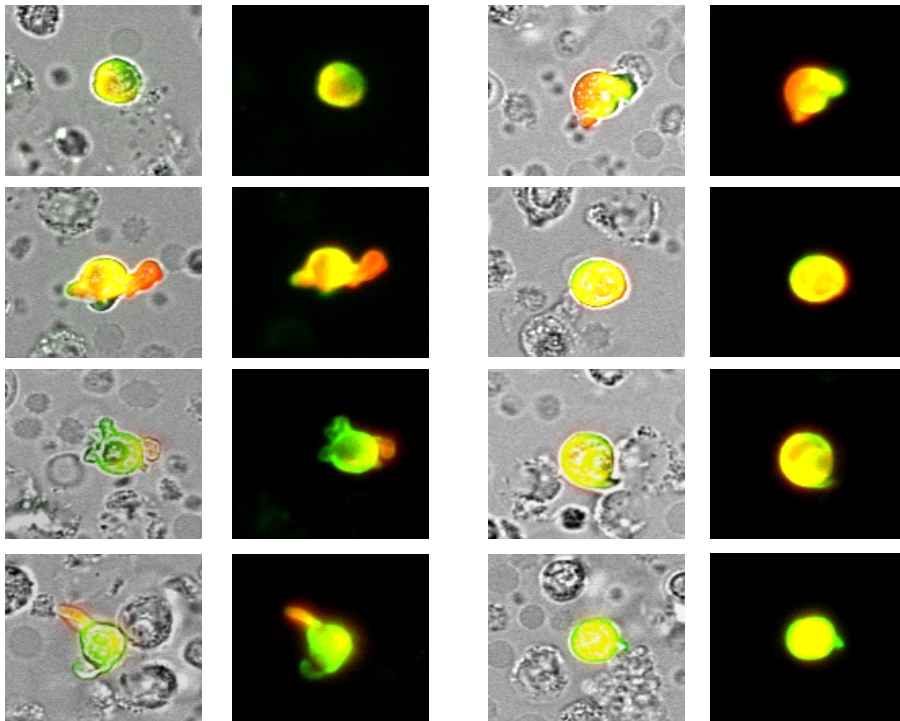
FISH: amplifikacja HER2/neu



✔ Prawidłowe komórki mają tylko dwa sygnały HER2/*neu*

→ Komórki nowotworowe mają więcej niż dwie kopie genu *c-erbB2* w jądrze (amplifikacja)

Charakterystyka krążących komórek nowotworowych



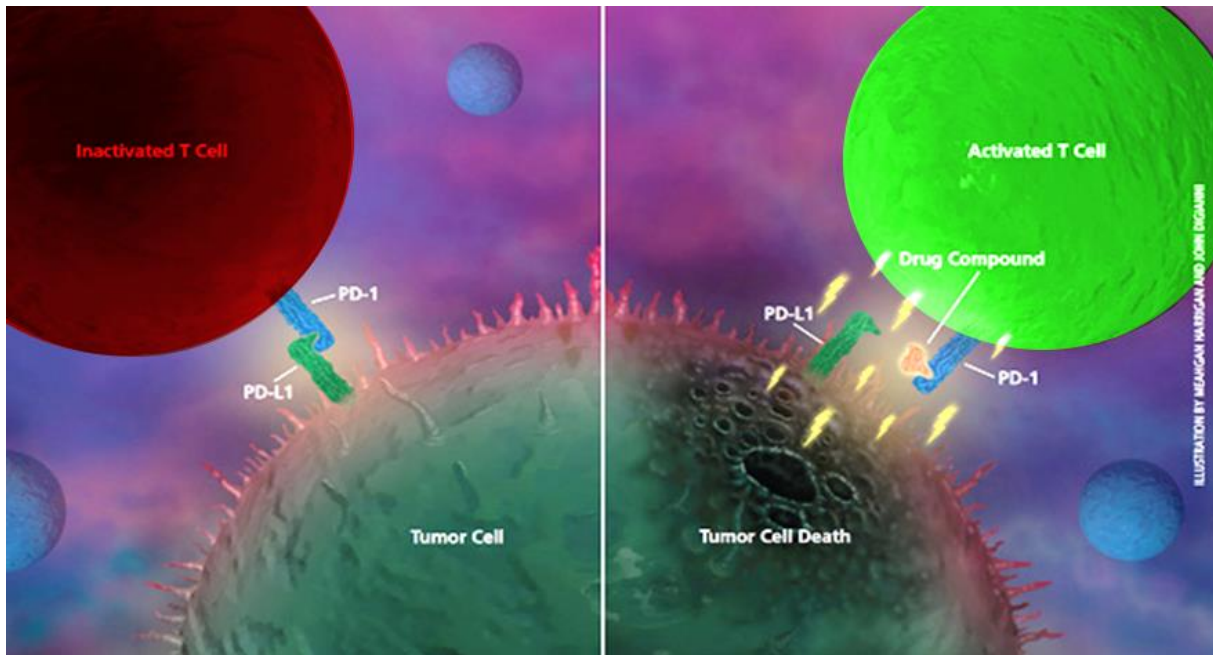
- receptor estrogenowy
- receptor progesteronowy
- PSA/PSMA
- melanina-A
- Ki-67
- Insulin-like growth factor receptor-I (IGF-IR)
- Vascular-endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2)
- Programmed death ligand 1 (PDL-1)

Podsumowanie

- ◆ **Kontrola aktywności guza** w czasie rzeczywistym przy pomocy jednej próbki krwi
- ◆ **Ilościowe** oznaczanie **żywych CETC**
- ◆ Dodatkowe narzędzie do **wczesnego** wykrywania chorób nowotworowych
- ◆ Wysoka czułość także we **wczesnym stadium choroby**
- ◆ Monitorowanie **skuteczności leczenia onkologicznego**
- ◆ Charakterystyka **właściwości CETCs** istotnych dla **terapii przeciwnowotworowej** (ER, PR, HER2 neu)
- ◆ Identyfikacja i dobór **najbardziej skutecznej terapii**
- ◆ **Długofalowa kontrola** nawet 10 lat po postawieniu diagnozy

Najnowsze osiągnięcia naukowe

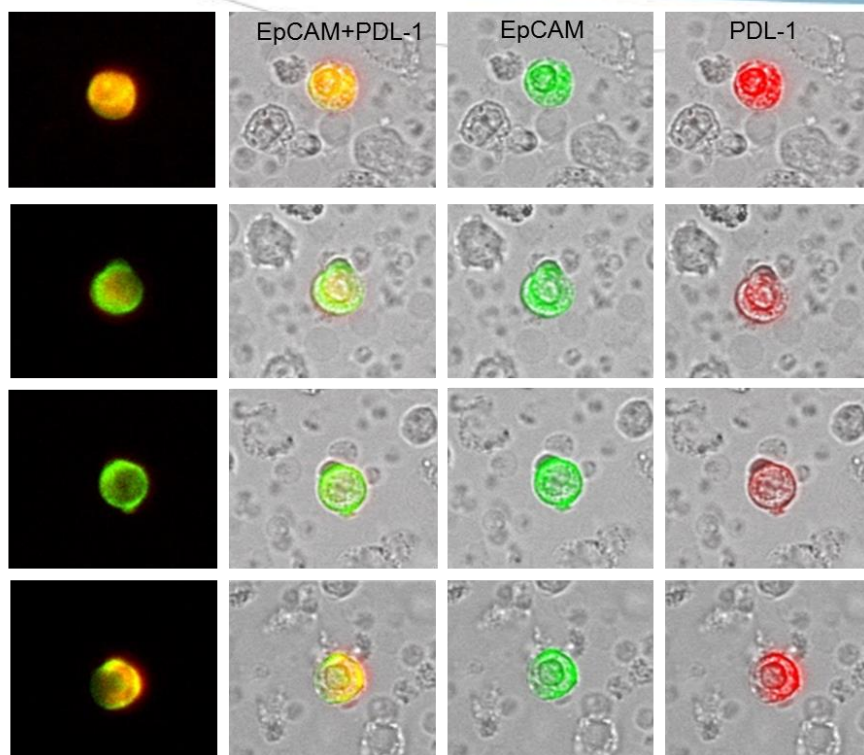
Rola PDL-1 w immunoterapii nowotworów



- szlak PD-1/PDL-1 jest kluczowy w immunologicznej odpowiedzi wobec komórek nowotworowych
- Hamowanie tego szlaku wydaje się być obiecującą strategią terapeutyczną

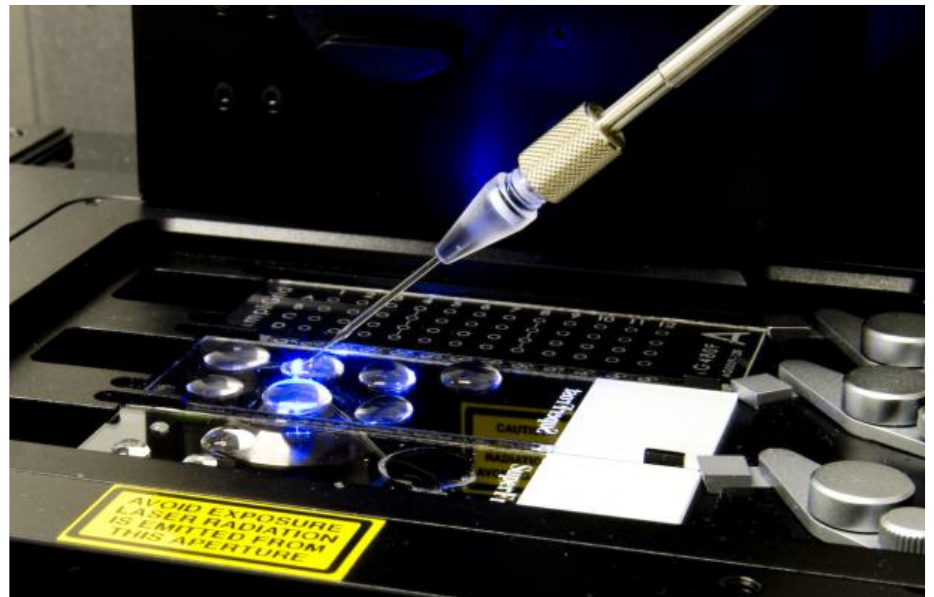
→ Ekspresja PDL-1 na krążących komórkach nowotworowych może mieć wartość prognostyczną przed i w czasie stosowania terapii przeciwciałami anty PD-1/PDL-1

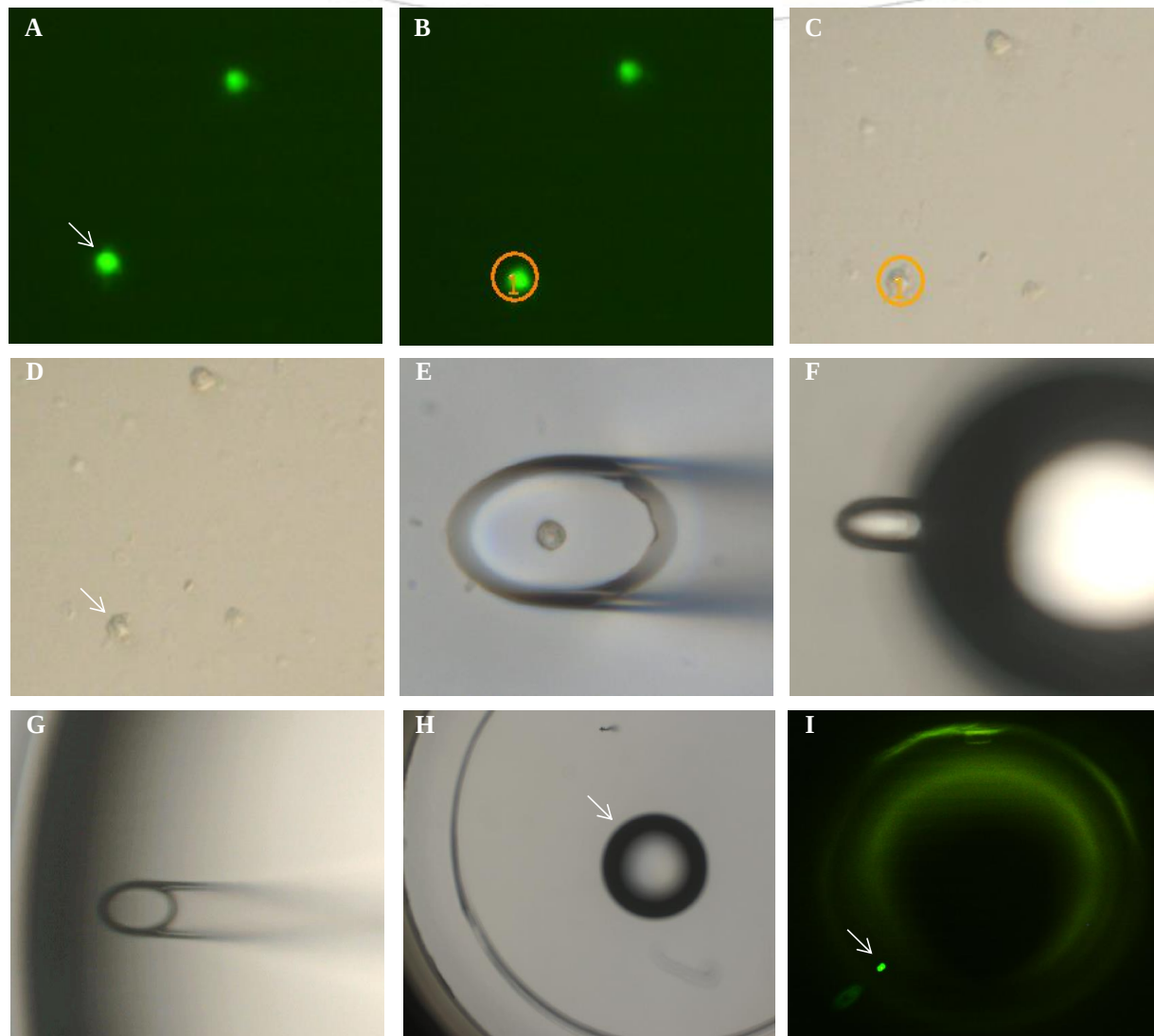
Ekspresja PDL-1 na powierzchni krążących komórek nowotworowych



- krążące komórki nowotworowe na swojej powierzchni posiadają antygen PDL-1
- Intensywność fluorescencji dla EpCAM i PDL-1 różni się pomiędzy pojedynczymi komórkami u jednego pacjenta

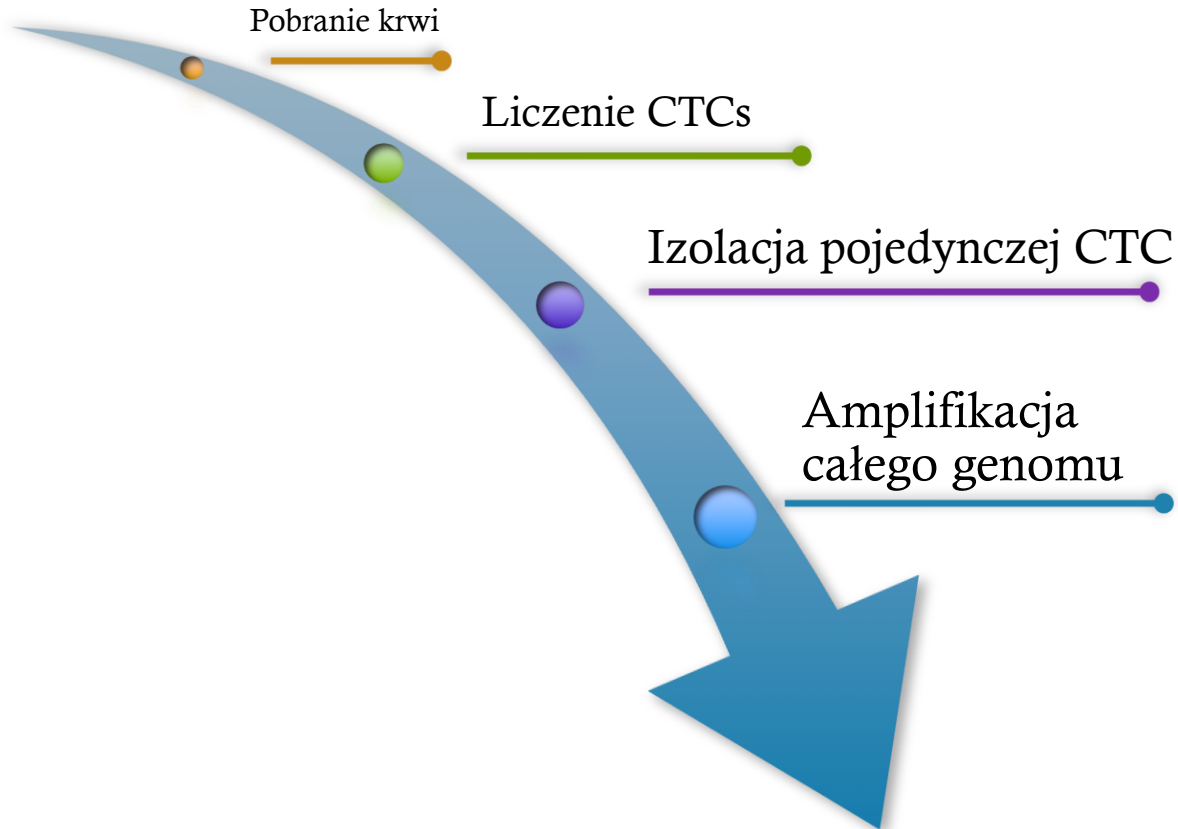
Badanie mutacji - analiza pojedynczej krążącej komórki nowotworowej





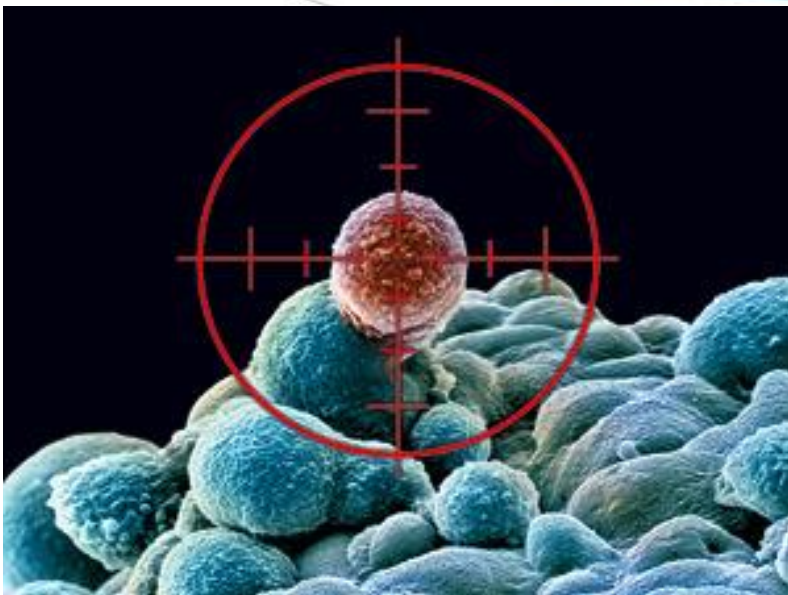
Procedura izolacji
pojedynczej komórki
nowotworowej

Workflow

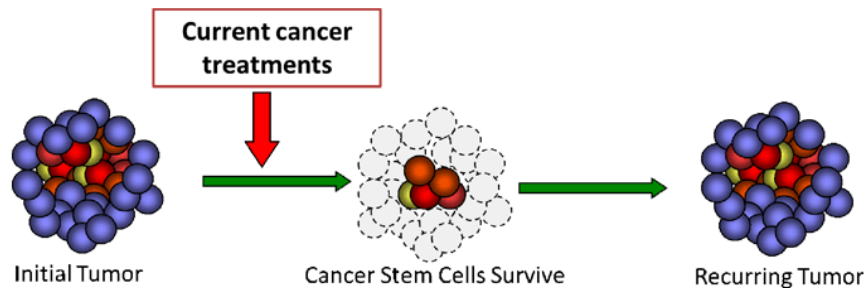


Analiza mutacji BRAF, KRAS, EGFR

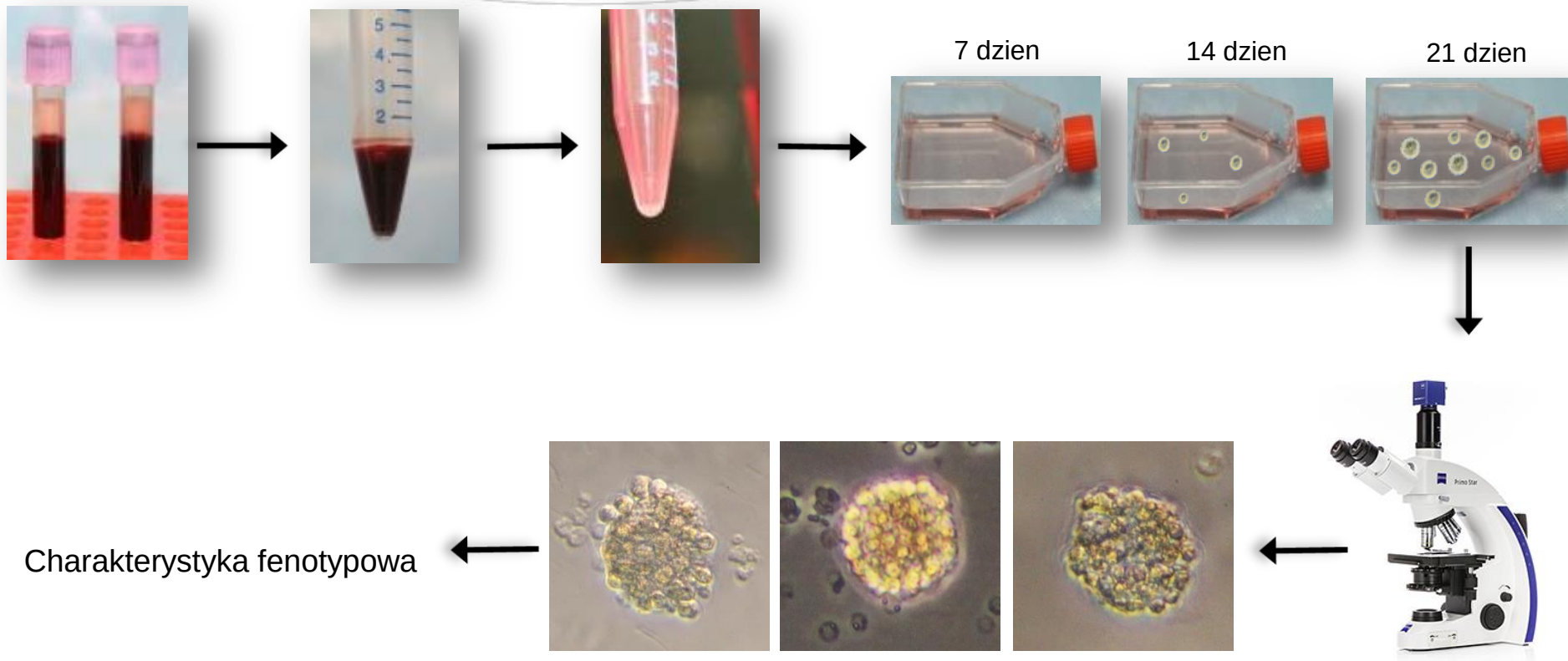
Macierzyste komórki nowotworowe (CSCs)



- Subpopulacja komórek nowotworowych
- Posiadają cechy komórek macierzystych: zdolność do samoodnawialności i różnicowania się w populację heterogennych komórek nowotworowych
- Odpowiedzialne za inicjację, progresję oraz powstawanie przerzutów odległych
- Oporne na konwencjonalną chemio i radioterapię



Hodowla krążących komórek nowotworowych



→ Obecność 3D struktur tzw. sfer

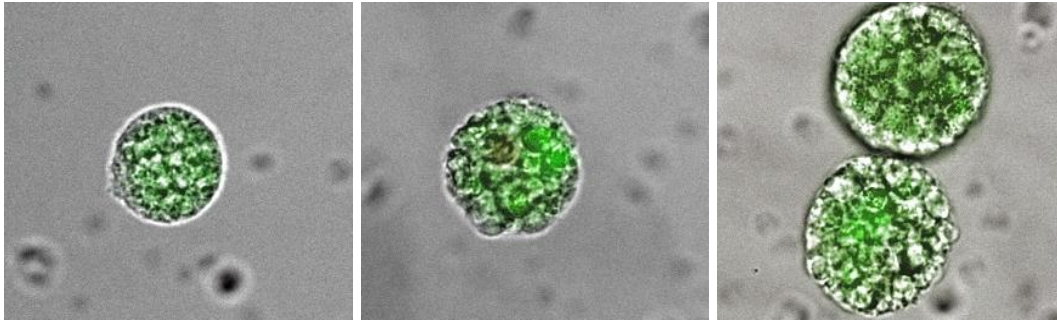
→ Typ wzrostu charakterystyczny dla **macierzystych komórek nowotworowych**

Hodowla krążących komórek nowotworowych

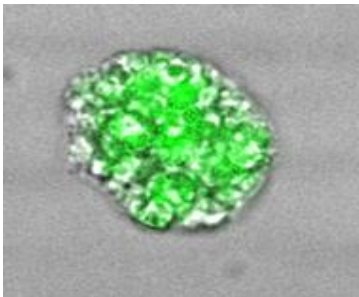
day 7

day 14

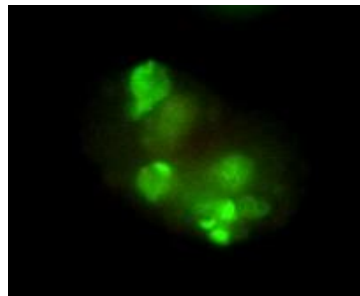
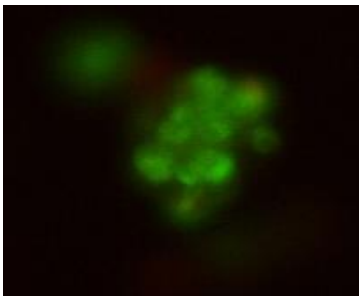
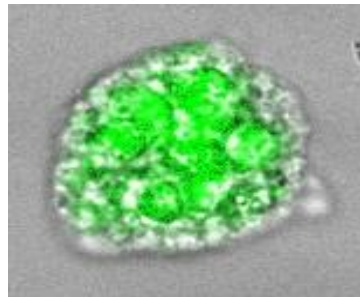
day 21



anti-EpCAM-FITC

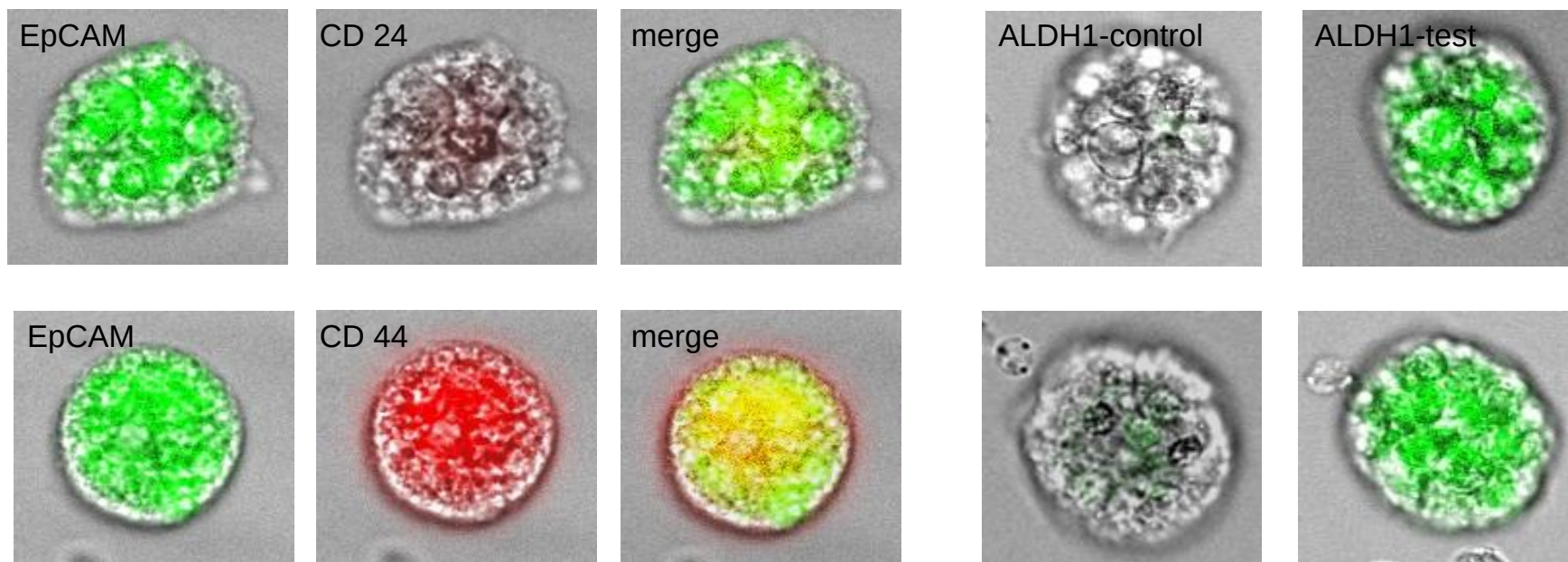


anti-EpCAM-FITC



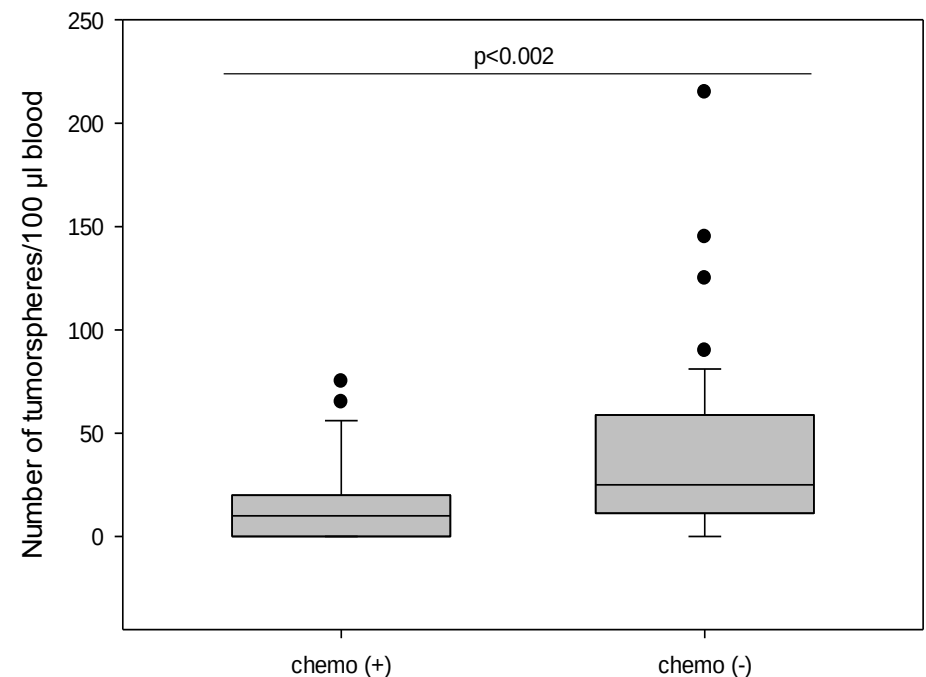
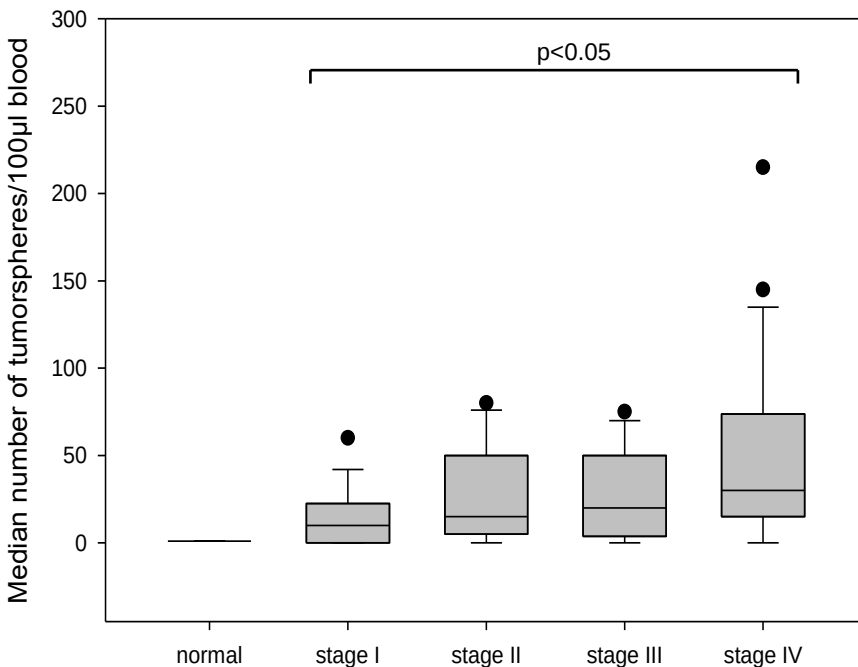
- Tylko niewielka ilość krążących komórek nowotworowych ma zdolności proliferacyjne i rośnie jako sfery (0.1-10%)
- Sfery rosną stopniowo w czasie i po okresie 21 dni mają średnicę 40-50 μm

Typowy fenotyp macierzystych komórek nowotworowych w raku piersi



The number of tumorspheres cultured from peripheral blood is a predictor for presence of metastasis in patients with breast cancer.

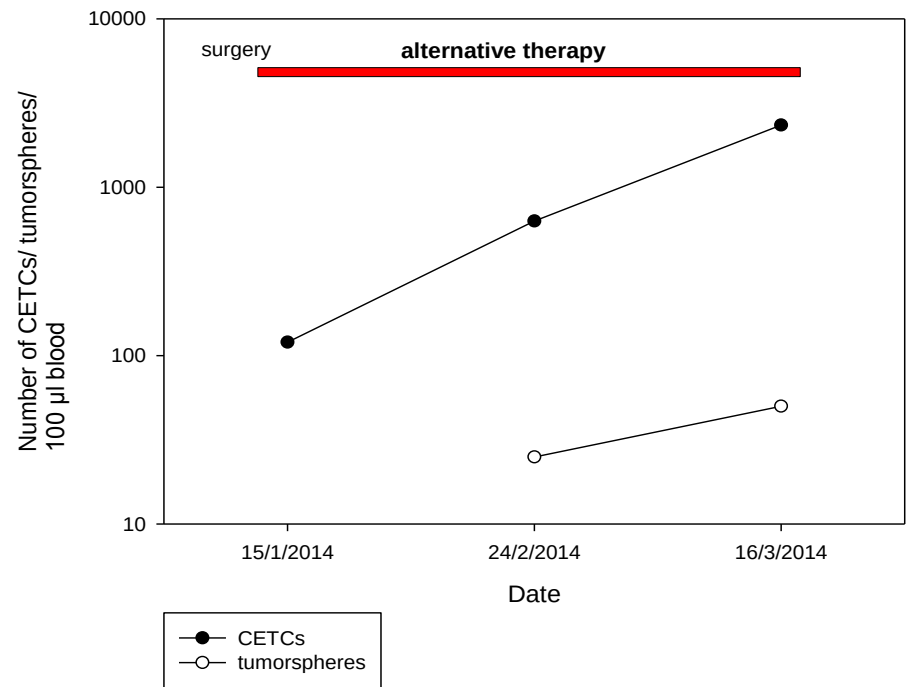
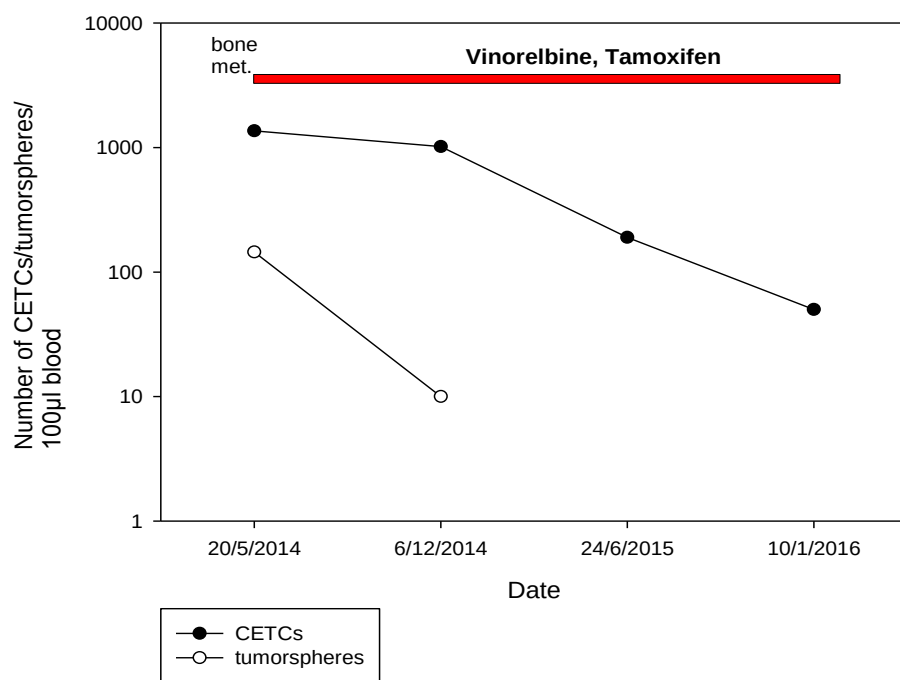
Pizon M, Schott D, Pachmann U, Pachmann K: doi: 10.18632



- ▶ Pacjenci z przerzutami odległymi mają większą ilość sfer
- ▶ Chemioterapia jest najważniejsza strategia leczenia onkologicznego

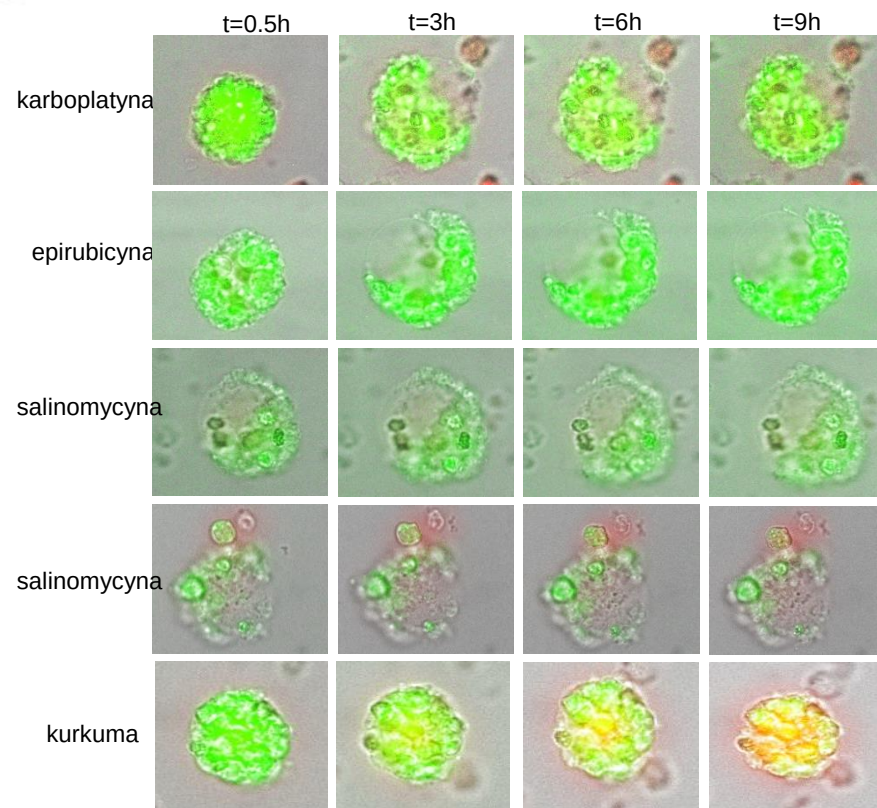
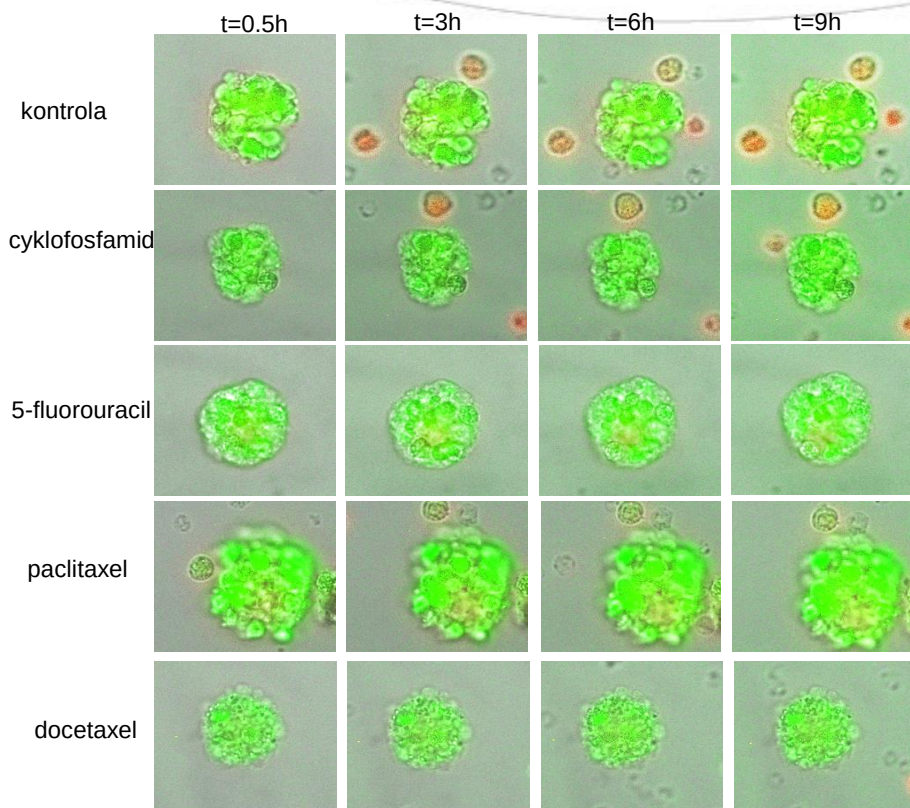
The number of tumorspheres cultured from peripheral blood is a predictor for presence of metastasis in patients with breast cancer.

Pizon M, Schott D, Pachmann U, Pachmann K: doi: 10.18632

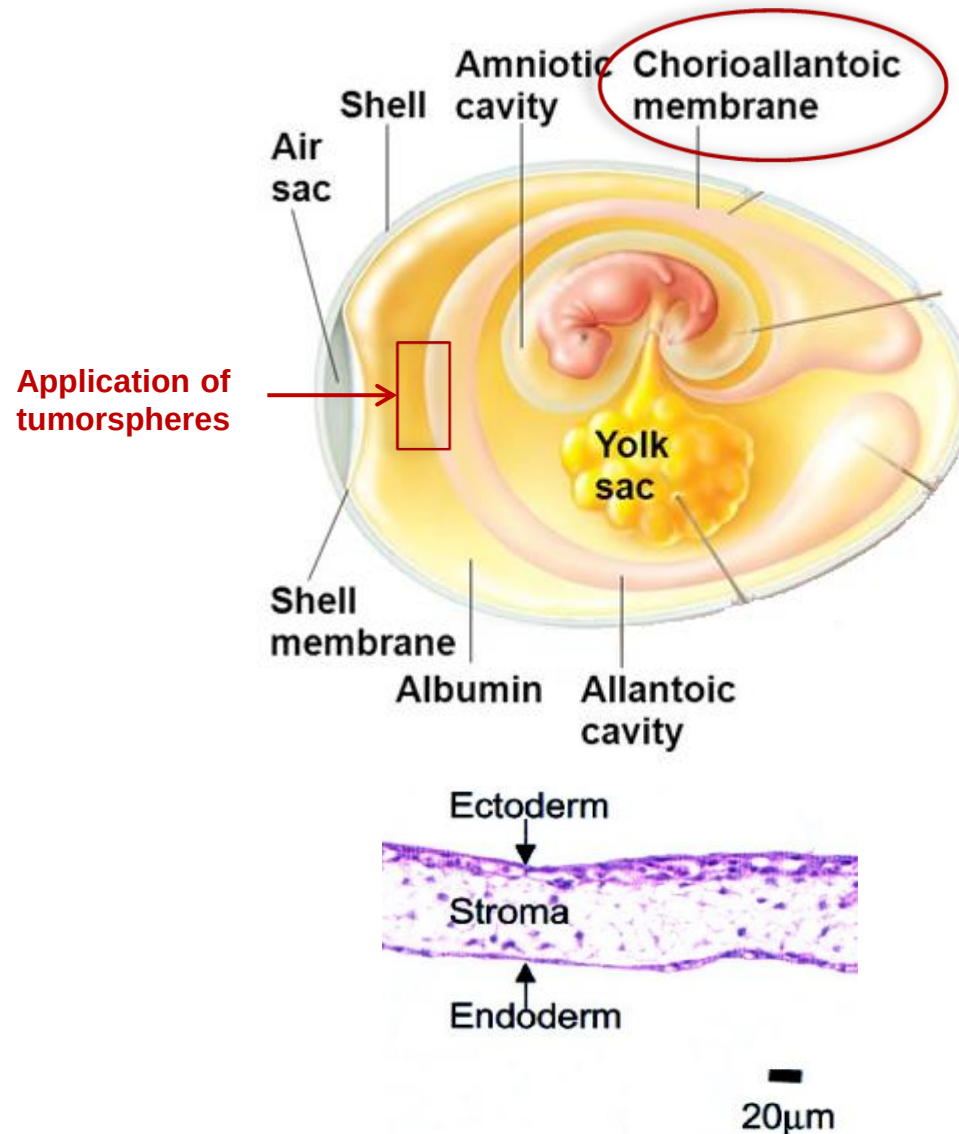


- 🌱 Pacjentka z przerzutującym rakiem piersi - spadek CETC i sfer podczas terapii vinorelbina i tamoxifenem
- 🌱 Pacjentka z rakiem piersi – wzrost CETC i sfer przy braku leczenia cytotoksycznego

Oporność na większość stosowanych leków przeciwnowotworowych



Błona omoczniowo-kosmówkowa zarodka kury (CAM) jako model *in vivo*

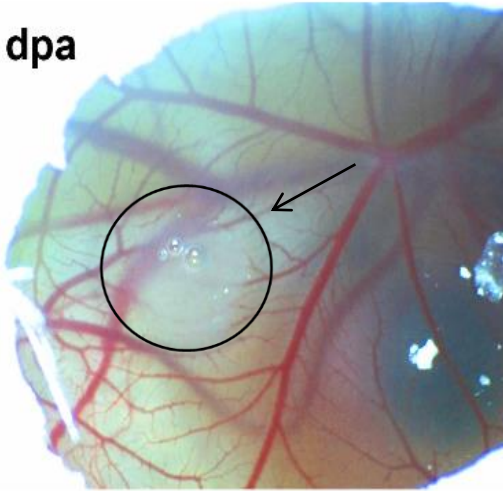


Błona omoczniowo-kosmówkowa zarodka kury (CAM) jako model *in vivo*

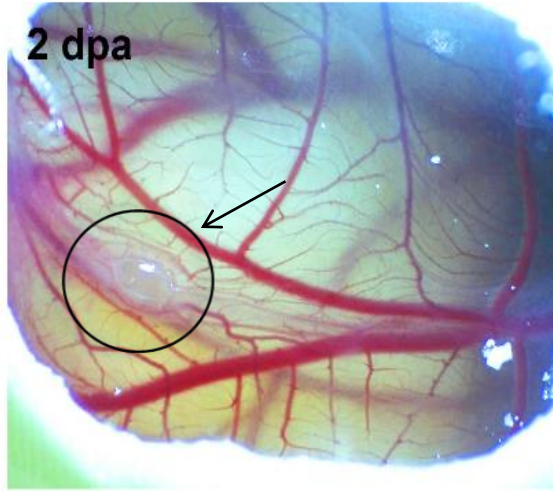


Błona omoczniowo-kosmówkowa zarodka kury (CAM) jako model *in vivo*

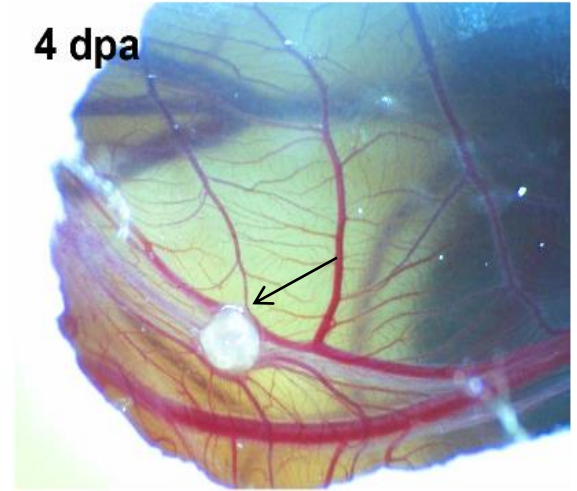
0 dpa



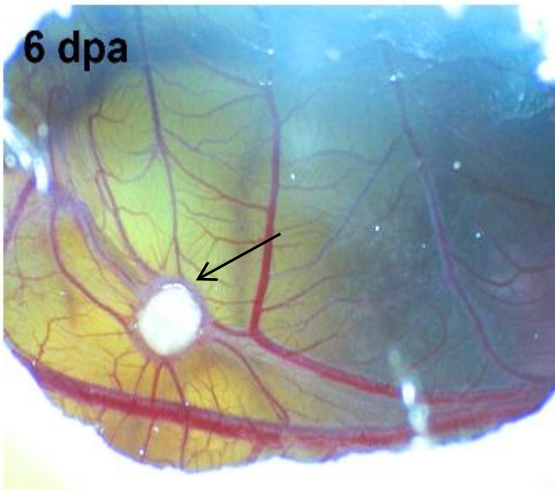
2 dpa



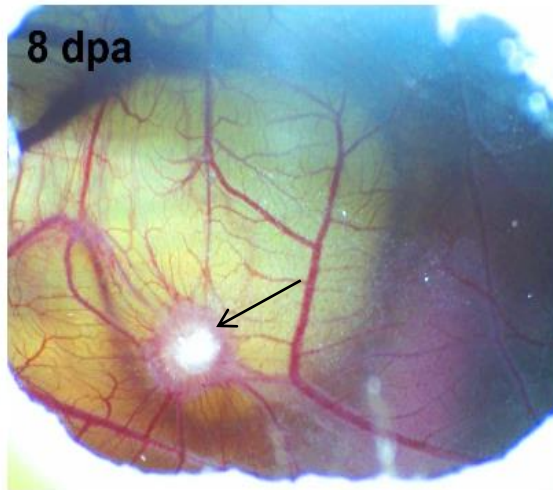
4 dpa



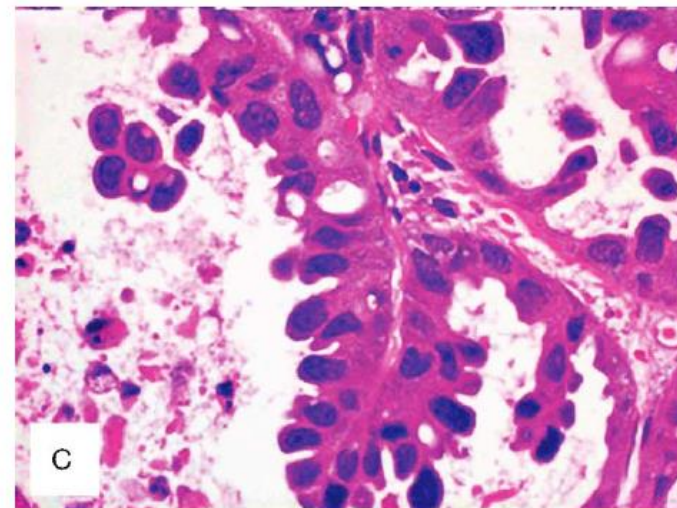
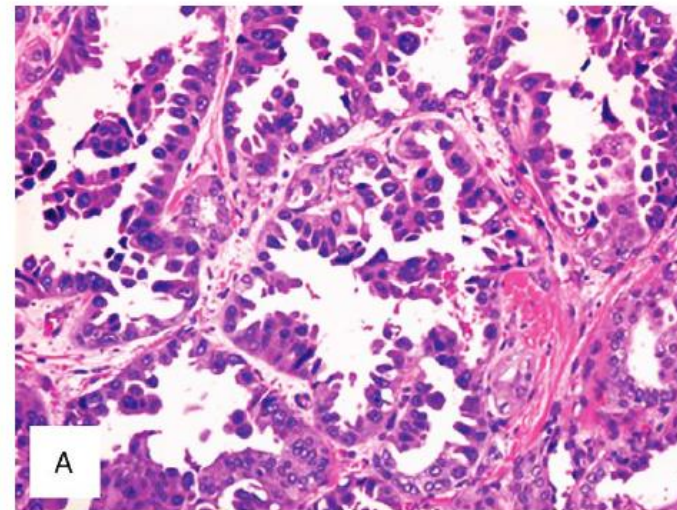
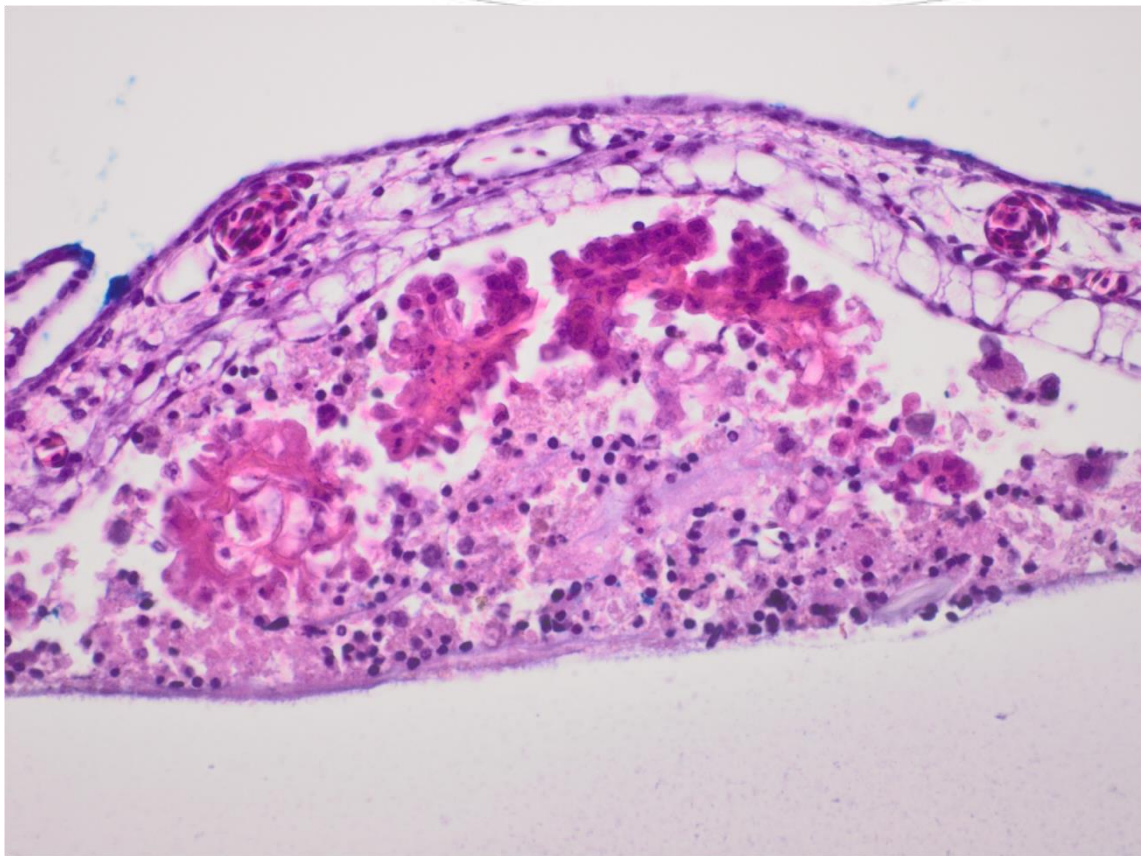
6 dpa



8 dpa



Błona omoczniowo-kosmówkowa zarodka kury (CAM) jako model *in vivo*



barwienie przeglądowe H-E guza wyhodowanego na błonie CAM i guza pierwotnego

Dziękuję za uwagę

