

## 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.

JANKŮ F.<sup>1</sup>, SROVNAL J.<sup>2</sup>, KOŘÍNKOVÁ G.<sup>2</sup>, PETRUŽELKA L.<sup>2</sup>, MATOUŠ B.<sup>3</sup>, CSC., HAJDÚCH M.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>ONKOLOGICKÁ KLINIKA I.LF UK A VFN V PRAZE

<sup>2</sup>LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, DĚTSKÁ KLINIKA LF UP A FN V OLOMOUCI

<sup>3</sup>ÚSTAV BIOCHEMIE A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE I.LF UK V PRAZE

<sup>4</sup>ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN V OLOMOUCI

### Souhrn

**Východiska:** Karciñoembryonální antigen (CEA) je sérovým nádorovým markerem celé řady nádorů. Doposud bylo publikováno několik metodických postupů detekce CEA pomocí RT-PCR. V následující studii je hodnocena kvantitativní RT-PCR pro CEA v diagnostice minimální reziduální choroby v kostní dřeni pacientek s karcinómem prsu před zahájením neoadjuvantní nebo adjuvantní systémové léčby. **Metody:** Celkem bylo vyšetřeno 70 aspirátů kostní dřene pacientek po radikálním chirurgickém výkonu nebo před zahájením neoadjuvantní léčby s kurativním záměrem. Celkem 37% pacientek bylo hodnoceno jako stádium I, 60% jako stádium II a 3% jako stádium III. Pro izolaci mRNA bylo použito kitu QIAamp RNA blood mini kit (Qiagen®). Následně byla provedena kvantitativní RT-PCR exprese CEA. **Výsledky:** Transkripty CEA byly zjištěny v 29 (41%) vzorcích ze 70. S mediánem sledování 22 měsíců bylo hlášeno 8 událostí hodnocených v rámci doby do sledované události (disease free survival, DFS). Jednalo se o 4 systémové recidivy, 1 duktální karcinom in situ (DCIS), 1 lokoregionální recidivu a 2 úmrtí bez nádoru. Čtyři DFS události (2 systémové recidivy, 2 úmrtí bez nádoru) byly pozorovány u pacientek s prokázanými transkripty CEA v kostní dřeni a 4 (2 systémové recidivy, 1 DCIS, 1 lokoregionální recidiva) u pacientek bez CEA v kostní dřeni. Byl pozorován trend ke kratšímu DFS ve skupině s CEA v kostní dřeni ( $p=0.05548$ ). Celkové přežití nebylo hodnoceno, jelikož byly doposud zaznamenány pouze 2 úmrtí (u pacientek bez nádoru). **Závěr:** Kvantitativní RT-PCR pro detekci CEA může být vhodnou metodou pro detekci minimální reziduální choroby v kostní dřeni. Prognostická hodnota zůstává nejasná. Prezentované výsledky je nutné interpretovat s opatrností, protože mohou být ovlivněny výskytem 2 nenádorových úmrtí u pacientek s CEA v kostní dřeni.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, kostní dřeň, CEA, minimální reziduální choroba

### Summary

**Background:** Carcinoembryonic antigen (CEA) is widely used as a serum tumour 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 minimal residual disease in bone marrow of early breast cancer patients prior the administration of any adjuvant systemic therapy. **Methods:** 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 tumour 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. **Results:** 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 tumour) 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 tumour) have been reported to date. **Conclusion:** Quantitative RT-PCR assay for CEA may be a useful tool for detection of minimal residual disease 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, minimal residual disease

## Úvod

Časný hematogenní rozsev nádorových buněk je podkladem pro pozdější vznik vzdálených metastáz. Nicméně z počátku je pod rozlišovací schopností klinicky běžně dostupných metod, a proto není zohledněn v stagingových klasifikacích (1). U pacientek s časným karcinomem prsu je minimální reziduální choroba v kostní dřeni prognosticky nepříznivým ukazatelem, který by v budoucnu mohl přispět k volbě léčebné strategie (2). Doposud byly zkoušeny různé imunocytochemické metody (3, 4) a techniky využívající reverzní transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakci (RT-PCR) (5, 6, 7). Senzitivita RT-PCR je ve srovnání s imunocytochemií 10 x až 100 x vyšší (6). Nicméně RT-PCR je zatím kontroverzní metodou, protože specifita techniky závisí na počtu amplifikačních cyklů a designu použitých primerů. Navíc celá řada genů kódujících detekované molekuly není specifická jen pro nádory, ale vyskytuje se v určitém množství i v normálních tkáních (8).

Karcinoembryonální antigen (CEA) byl původně popsán jako onkofetální glykoprotein. V současnosti je široce používán jako nádorový marker celé řady nádorů především karcinomu prsu a tlustého střeva (9, 10). K detekci CEA pomocí RT-PCR bylo vyvinuto doposud několik technik. Gerhard a spol. (6) publikoval výsledky se specifickou metodikou detekce CEA exprimujících nádorových buněk v kostní dřeni pacientů s karcinomem tlustého střeva nebo jiným CEA pozitivním karcinomem. V rámci testovaného souboru 62 vzorků amplifikace CEA specifické mRNA umožňovala specifickou detekci nádorových buněk v kostní dřeni a periferní krvi. Mitas a spol. (11) popsali kvantitativní CEA RT-PCR detekci minimální reziduální choroby v axilárních lymfatických uzlinách pacientek s karcinomem prsu.

V prezentované studii je zkoumána metoda kvantitativní CEA RT-PCR detekce v diagnostice minimální reziduální choroby u pacientek s časným karcinomem prsu před zahájením systémové léčby.

## METODY

### Soubor pacientek

Zařazeným pacientkám Onkologické kliniky 1.LF UK a VFN v Praze byly odebrány vzorky kostní dřeni z hrudní kosti nebo lopaty kosti kyčelní. Všechny pacientky byly buď po radikálním chirurgickém výkonu bez známek onemocnění nebo před zahájením neoadjuvantní léčby s kurativním záměrem. Nábor probíhal od března 2001 do června 2004. Vstupní kritéria zahrnovala: primární karcinom prsu stádia I, II, a nebo III podle UICC (12), adekvátní radikální chirurgický výkon, nebo plánovaná neoadjuvantní léčba s kurativním záměrem. Celkem bylo na základě zmíněných kritérií zařazeno 70 pacientek: 26 (37 %) stádia I, 19 (27 %) stádia IIA, 23 (33 %) stádia IIB a 2 (3 %) stádia IIIB. Podrobná charakteristika souboru je popsána v tabulce 1. Adjuvantní léčba byla indikována na základě platného konsensu ze St. Gallen buď z roku 2001 (13) nebo z roku 2003 (14). Adjuvantní chemoterapie zahrnovala antracyklinové režimy nebo režimy s antracykliny a taxány nebo režimy bez antracyklinů. Celkem byla podána 51 (73 %) pacientkám. Z 62 (89 %) pacientek s expresí hormonálních receptorů byla 54 (77%) podána příslušná adjuvantní hormonální léčba tamoxifenem nebo anastrozolem. Osm pacientek s expresí hormonálních receptorů nebylo zatím léčeno adjuvantní hormonální léčbou, protože v době analýzy neukončily adjuvantní chemoterapii nebo radioterapii. Devět premenopauzálních pacientek podstoupilo chirurgickou nebo farmakologickou ovariální ablací. V případě prs zachovávacího chirurgického výkonu následovala vždy radioterapie. Pacientky s více než 3 postiženými axilárními lymfatickými uzlinami nádorem pod-

Tabulka č. 1: Soubor pacientek (N=70)

	Pacientky	
	No.	%
Věk		
Medián	52	
Rozmezí	28-76	
Premenopauzální	27	39
Postmenopauzální	43	61
Stádium		
I	26	37
IIA	19	27
IIB	23	33
IIIB	2	3
N+ (postižení spadových axilárních uzlin)	35	50
HR + (hormonální receptory)	62	89
Histologie		
Invazivní duktální karcinom	53	76
Invazivní lobulární karcinom	14	20
Smišeny duktální/lobulární karcinom	3	4
Chemoterapie		
Neoadjuvantní (F)AC*	4	6
antracyklin-taxán	3	4
letrozol	1	1
Adjuvantní		
(F)AC/(F)EC*	37	53
CMF**	5	7
antracyklin-taxán	9	13
Tamoxifen	52	74
Anastrozol	2	3

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

\*\*CMF: cyklofosfamid, metotrexát, fluorouracil

stoupily ozařování axily. Všechny zařazené subjekty byly sledovány stran recidivy a případného úmrtí.

Výzkum probíhal ve shodě s Helsinskou deklarací a byl schválen místní etickou komisí. Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu.

### Aspirace kostní dřeni

Před odběrem byla provedena drobná kožní incize za účelem zamezení kontaminace vzorku epiteliálními buňkami. Celkem bylo do zkumavek s EDTA odebráno pomocí jednorázové punkční jehly (Allegiance Healthcare Corporation, McGaw Park, IL, USA) 0,5 až 7, 5 (medián 1,5) ml kostní dřeni z kosti hrudní (u 49 pacientek) nebo lopaty kosti kyčelní (u 21 pacientek). Vzorky byly ihned zpracovány níže zmíněnou technikou. Odběry poskytly dostatečné množství mRNA.

### Zpracování vzorků kostní dřeni

Extrakce RNA ze vzorků kostní dřeni byla provedena pomocí komerčního kitu (QIAamp RNA Blood Kit, Qiagen, Valencia, USA) podle instrukcí výrobce. Čistota RNA byla kontrolována pomocí UV spektrofotometru.

### Kvantitativní RT-PCR

Komplementární DNA (cDNA) byla připravena pomocí kitu RevertAid (Fermentas, Burlington, Kanada) na gradientovém cykléru Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, Waltham, MA) s použitím následujícího schématu: V prvním kroku byla směs 3 µg celkové RNA s 0,3 µg náhodných hexamerů Random primers (Promega, Madison, WI, USA) inkubována

5 minut při 70 °C, poté rychle zchlazena na ledu. V následujícím kroku bylo ke směsi přidáno 6 μl 5x RT pufru (Fermentas), 3 μl 10mM dNTP a 0,75 μl inhibitoru ribonukleáz RNA-sin (40U/μl) (Promega, Madison, WI, USA). Směs byla ponechána 5 minut při pokojové teplotě, a na závěr bylo přidáno 150 U reverzní transkriptázy M-MuLV RevertAid (Fermentas, Burlington, Kanada) a inkubováno 60 minut při 42 °C. Posledním krokem byla tepelná inaktivace reverzní transkriptázy 5 minut při 95 °C.

Původně publikované priméry na detekci karcinoembryonálního antigenu (CEA, CEACAM5, NM 004363) (15) byly modifikovány a designovány tak, aby nedošlo k amplifikaci jiných podobných genů anebo genomické DNA: CEA3 (5' - TAA GTG TTG ACC ACA GCG ACC C - 3'), CEA4 (GTT CCC ATC AAT CAG CCA AGA A - 3') a TaqMan próba CEA- P (ATG TCC TCT ATG GCC CAG ACG ACC C - 3' BHQ1 - HEX). Celková délka ampliconu je 179 bp. Jako standardy pro absolutní kvantifikaci bylo použito amplicony o délce 513 bp připravené pomocí specifických primerů CEA3outer (5' - ACA GTC TAT GCA GAG CCA CCC AAA - 3') a CEA4outer (5' - GCT GTG GCC ACT GGC TGA GT - 3'). Real-time RT-PCR bylo provedeno na real-time cyklu Rotor-Gene 3000 (Corbett-Research, Sydney, Austrálie). PCR reakce byla zahájena 15-ti minutovou inkubací při teplotě 96 °C, kdy došlo k aktivaci HotStart Taq polymerázy (AB Gene, Epsom, Velká Británie). Poté následovalo samotné cyklování 15s/95 °C - 15s/65 °C. Reakční směs o celkovém objemu 25 μl pro detekci CEA obsahovala primery o koncentraci CEA3 300nM, CEA4 600nM, specifickou TaqMan sondou CEAP o koncentraci 200nM (vše Generi-Biotech, Hradec Králové, Česká republika), MgCl<sub>2</sub> 3mM, 10x PCR buffer, 1U HotStart Taq polymerázy (vše AB Gene, Epsom, Velká Británie), dNTP 200uM (Promega, Madison, WI, USA) a 100ng cDNA. K prevenci kontaminace během zpracování vzorků bylo používáno špiček s filtry a oddělených pracovních ploch. Každý vzorek byl analyzován v dubletu. Během analýz byly používány pozitivní a negativní kontroly k ověření senzitivity, specifity, reprodukovatelnosti a k detekci eventuální kontaminace. Vyhodnocení real-time RT-PCR reakce bylo provedeno softwarem Rotor-Gene 3000 verze 6.0 (Corbett-Research, Sydney, Austrálie) a absolutní kvantifikace hledaného markeru byla vztažena na množství RNA vstupující do reverzní transkripce.

## Statistika

Pro statistické analýzy bylo použito software Statistica verze 6.0 (StatSoft © 2003). Byly vyhodnoceny korelace mezi expresí CEA o ostatními prognostickými faktory jako je velikost nádoru, infiltrace axilárních lymfatických uzlin, počet infiltrovaných uzlin, exprese hormonálních receptorů, histologický typ a nádorový grading. Byla provedena univariační analýza posuzující vliv CEA na dobu do sledované události (disease free survival, DFS), dobu do vzniku vzdálených metastáz (distant metastasis free survival, DMFS) a dobu do recidivy (relapse free survival, RFS). DFS byl definován jako doba od vstupu do studie do vzniku vzdálených metastáz, lokoregionální recidivy, kontralaterálního karcinomu prsu, duktálního karcinomu in-situ (DCIS) nebo úmrtí bez nádoru. DMFS byl definován jako doba od vstupu do studie do vzniku vzdálených metastáz, lokoregionální recidivy, kontralaterálního karcinomu prsu nebo duktálního karcinomu in situ (DCIS).

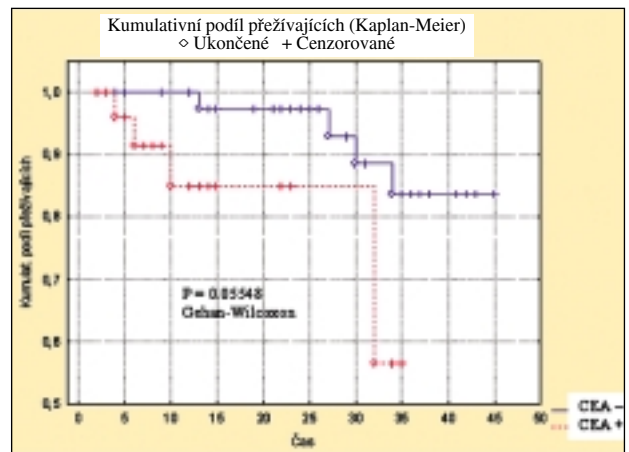
## Výsledky

Celkem byly odebrány vzorky kostní dřevě od 70 pacientek před zahájením systémové léčby. Dostatečné množství mRNA bylo izolováno u všech 70 vzorků. Transkripty CEA mRNA byly zjištěny v kostní dřevě u 29 (41%) pacientek. Většina pacientek byla stádia II: 9 stádium IIA, 9 stádium IIB. Deset pacientek mělo klinické stádium I a pouze 1 stádium IIIB. Více jak polovina z nich (15/52%) měla prokázané postižení axilárních

lymfatických uzlin. Ve srovnání s ostatními prognostickými faktory nebyla prokázána korelace s nádorovým gradíngem ( $r = -0,22$ ), expresí hormonálních receptorů ( $r = 0$ ) a histologickým typem ( $r = 0,06$ ).

Medián doby sledování činil v době analýzy 22 měsíců (rozmezí: 2 až 45 měsíců). U 8 pacientek (9%) byla zaznamenána událost hodnocena v rámci DFS. Z nich se jednalo u 4 pacientek o vznik vzdálených metastáz, 1 lokoregionální recidivu, 1 DCIS a 2 úmrtí bez nádoru (plicní embolie, autonehoda). U pacientek s transkripty CEA v kostní dřevě byly zaznamenány 2 systémové recidivy a 2 úmrtí bez nádoru. U pacientek bez CEA v kostní dřevě byly zjištěny 2 systémové recidivy, 1 DCIS a 1 lokoregionální recidiva. Byl zjištěn trend ke kratšímu DFS ve skupině s CEA v kostní dřevě. Nicméně statisticky se pohyboval těsně nad hranici statistické významnosti ( $p=0,05548$ , Gehan-Wilcoxon). Křivka pro DFS, je znázorněna na obrázku 1. Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami ve smyslu DMFS ( $p=0,271$ ) a RFS ( $p=0,37231$ ). Celkové přežití nebylo hodnoceno, jelikož se v souboru objevily pouze 2 úmrtí (obě nenádorové).

Obr. 1: DFS (Kaplan Maier)



## Diskuse

Detekce minimální reziduální choroby v kostní dřevě pacientek s časnými stádii karcinomu prsu může přispět k zdokonalení stagingových klasifikací a tím k přesnějšímu odhadu prognózy nemocné. (16). Doposud bylo pro RT PCR detekci reziduální choroby zkoušeno u pacientů s různými nádory včetně karcinomu prsu několik markerů jako např. cytokeratiny, mamoglobin a maspin (17,18,19). Exprese CEA jako markeru nádorových buněk byla zkoumána v lymfatických uzlinách, periferní krvi a kostní dřevě. Min a spol. (16) publikovali dobré výsledky s CEA RT PCR detekcí nádorových buněk v sentinelové uzlině. Mitas a spol. (11) dosáhl podobných výsledků při použití kvantitativní RT PCR. Naopak někteří autoři shledali detekci CEA exprese ve stejných indikacích jako málo přínosnou (21). Bohužel všechny zveřejněné studie trpěly malým počtem zařazených pacientek (od 17 do 22), a tak je obtížné na základě dostupných dat vyvodit konečné závěry. Podobně nekonzistentní výsledky byly publikovány o detekci CEA v periferní krvi (22). Na základě přehledu literatury byly transkripty CEA mRNA v kostní dřevě zjištěny u 17,4% až 67% pacientů. Gerhard a spol. (6) zjistil CEA pomocí RT PCR u 4 z 6 pacientek z karcinomem prsu. Zhong a spol. (23) detekoval CEA podobnou technikou u 27,8% pacientek v doposud největším publikovaném souboru (181 pacientek s karcinomem prsu po radikálním výkonu pro karcinom prsu). Berois a spol. (24) ve své práci publikoval proporcionálně nejmenší záchyt CEA ve vzorcích kostní dřevě (17,4%; 8 z 46 pacientek). V naší práci jsme pomocí metody kvantitativního RT-PCR pro detekci CEA prokázali minimální reziduální chorobu u 41% (29 ze 70) pacientek s časným karcinomem.

V dřívě publikovaných studiích byla minimální reziduální choroba detekována pomocí imunocytochemie potvrzena jako nezávislý negativní prognostický faktor pro kratší dobu do recidivy a celkové přežití pacientek s časným karcinomem prsu (16). Navíc nedávno publikovaná metaanalýza tyto závěry potvrdila (25). U CEA jako markeru nádorových buněk v periferní krvi byla prokázána negativní prognostická hodnota u pacientů s kolorektálním karcinomem a nemalobuněčným karcinomem plic (26, 27). U karcinomu prsu Jotsuka a spol. (28) publikoval výsledky studie ze 101 pacientkami z časným karcinomem prsu. Průkaz transkriptů mRNA pro CEA v periferní krvi byl prognosticky nepříznivým faktorem. Stathopoulou a spol. (29) zkoumali expresi CEA v periferní krvi pacientů s karcinomem prsu, tlustého střeva a hematologických malignit. Bohužel zveřejněné výsledky neobsahují data ohledně přežití. Doposud nebyla publikovaná větší studie zabývající se prognostickou hodnotou CEA v kostní dřeni. V naší studii při mediánu sledování 22 měsíců jsme pozorovali 8 událostí hodnocených v rámci DFS. Čtyři z nich byly popsány u pacientek s CEA transkripty v kostní dřeni. Nicméně 2 události ve skupině s CEA expresí neměly přímý vztah k nádoru. Ve skupině s CEA v kostní dřeni 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 a RFS. Data týkající se DFS by měla být interpretována s velkou opatrností, protože mohou být při daném počtu pacientek a událostí ovlivněna 2 nenáhodnými úmrtími ve skupině pacientek s CEA expresí v kostní dřeni. Nebyla potvrzena korelace s ostatními klinickými a laboratorními prognostickými faktory. Studie prokázala, že technika kvantitativní RT-PCR pro CEA může být využita pro detekci minimální reziduální choroby v kostní dřeni pacientek s časnými stádii karcinomu prsu. Nicméně specificita techniky by měla být ověřena na vzorcích kostní dřene zdravých dobrovolníků, aby byla stanovena míra ilegální transkripce CEA v normální kostní dřeni. Prognostická hodnota CEA v kostní dřeni pacientek s karcinomem prsu zůstává nejasná.

### Poděkování

Výzkum byl podpořen grantem RASO ČOS ČLS JEP, zavedení metody detekce CEA transkriptů v kostní dřeni bylo financováno z projektu IGA MZČR NR7804 také výzkumnými záměry MSM0021620808 a MSM 6198959216.

Došlo: 25. 9. 2005

Přijato: 15. 10. 2005

### Literatura

- Cote R, Rosen P, Lesser M, Old L, Osborne M. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749-56.
- Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumour cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol*. 1992;10:1534-9.
- 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.
- Kaul S, Zhong XY, Diel I, Bastert G. 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.
- Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12:475-82.
- Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, 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.
- Zhong XY, Kaul S, Diel I, Bastert G. Tumour cell contamination (TC) in bone marrow of breast cancer patients: Sensitive detection by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for MUC1, CEA, keratin 19 and GA733±2. *Arch Gynecol Obstet* 1996; 258:92.
- Krismann M, Todt B, Schroeder J, Gareis D, Mueller KM, Seeber S, 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.
- Shively JE, Beatty JD. CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. *Crit Rev Oncol Hematom* 1985; 2:355-99.
- 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.
- Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, Baron PL, Elliott BM, Brothers TE, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer*. 2001;93:162-71.
- Sobin LH, Wittekind Ch. *Nádory prsu*. In: UICC - International Union Against Cancer TNM klasifikace zhoubných nádorů, 6. vydání 2002, česká verze 2004. John Wiley & Sons, Inc.; Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Praha, 2004: p 111-19.
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. 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.
- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3357-65.
- Silva JM, Rodriguez R, Garcia JM, Munoz C, Silva J, Dominguez G, 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.
- Braun S, Pantel K. Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *Oncologist* 2001; 6:125-32.
- Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Mar;17(3):870-9.
- 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.
- Ballestrero A, Coviello DA, Garuti A, Nencioni A, Fama A, Rocco I, 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.
- 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.
- Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, 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.
- Corradini P, Voena C, Astolfi M, Delloro S, Pilotti S, Arrigoni G, 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.
- Zhong XY, 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.
- Berois N, Varangot M, Sonora C, Zarantonelli L, Pressa C, Lavina R, 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.
- Braun S, Vogl FD, 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.
- Guadagni F, Kantor J, Aloe S, Carone MD, Spila A, D'Alessandro R, 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.
- Castaldo G, Tomaiuolo R, Sanduzzi A, Ponticciello A, Marchettiello I, Salvatore F. Carcinoembryonic antigen mRNA analysis detects micrometastatic cells in blood from lung cancer patients. *Eur Respir J* 2003;22:418-21.
- Jotsuka T, Okumura Y, Nakano S, Nitta H, Sato T, Miyachi M, 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.
- Stathopoulou A, Mavroudis D, Perraki M, Apostolaki S, Vlachonikolis I, Lianidou E, 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.