



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΜΙΚΡΟΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ (CK19, Mammaglobin-A, HER2)
ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΙΜΟ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

**Μιχαήλ Γεωργίου Ιγνατιάδης
Ιατρός Παθολόγος Ογκολόγος**

Διδακτορική Διατριβή

Στους γονείς μου

Στους δασκάλους μου

Περιεχόμενα

<i>Πρόλογος</i>	6
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1.1. Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού	11
1.1.1. Η ηλικία	12
1.1.2. Το μέγεθος του όγκου	12
1.1.3. Η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων	13
1.1.4. Ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας	14
1.1.5. Η διήθηση αγγείων και λεμφαγγείων	15
1.1.6. Οι υποδοχείς των οιστρογόνων και προγεστερόνης	15
1.1.7. Ο υποδοχέας του HER2	16
1.1.8. CEA, CA 15-3, CA27.29	17
1.1.9. Γονιδιακές υπογραφές.....	18
1.1.10. uPA/PAI-1.....	24
1.1.11. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (Minimal Residual Disease, MRD)	26
1.2. Ορισμός των μικρομεταστατικών κυττάρων: Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα, (Circulating Tumor Cells, CTCs), Διάσπαρτα Καρκινικά Κύτταρα, (Disseminated Tumor Cells, DTCs)	28
1.3. Μέθοδοι και περιορισμοί για την ανίχνευση των μικρομεταστατικών κυττάρων	28
1.4. CTCs και διάγνωση του καρκίνου του μαστού	34
1.5. CTCs/DTCs και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού	35
1.5.1 Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού	37
1.5.2. Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στον πρώιμο καρκίνο του μαστού	39
1.5.2.1. DTCs	39
1.5.2.2. CTCs	41
1.5.2.3. CTCs ή DTCs.....	44
1.5.3. Ανίχνευση CTCs/DTCs στον πρώιμο καρκίνο του μαστού: έχει πάντα προγνωστική σημασία;	46
1.5.3.1. Χρήση άλλων δεικτών εκτός από τις κυτταροκερατίνες για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων	49
1.5.3.1.1. HER2.....	49
1.5.3.1.2. Mammaglobin-A.....	54
1.5.3.1.3. EGFR	63
1.5.3.1.4. Survivin.....	64
1.5.3.2. Μελέτη της δυνατότητας πολλαπλασιασμού των μικρομεταστατικών κυττάρων	65
1.5.3.3. Μέθοδοι για την διάκριση αποπτωτικών από μη αποπτωτικά μικρομεταστατικά κύτταρα.....	65
1.5.3.4. Μελέτη της έκφρασης του φαινοτύπου των βλαστικών κυττάρων στα μικρομεταστατικά κύτταρα.....	66

1.6. Μελέτη της προγνωστικής αξίας των μικρομεταστατικών κυττάρων στα πλαίσια διεθνών πολυκεντρικών μελετών	66
1.7. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος και μοριακά πορτραίτα του καρκίνου του μαστού	69
1.8. CTCs/DTCs και πρόβλεψη στον καρκίνο του μαστού	74
1.8.1. Γονοτυπική και φαινοτυπική ανάλυση CTCs/DTCs	74
1.8.2. CTCs/DTCs και χημειοθεραπεία/ενδοκρινική θεραπεία	76
1.8.3. Ανίχνευση CTCs και απάντηση στη νεοσυμπληρωματική χημειοθεραπεία ..	76
1.8.4. CTCs/DTCs και νεώτερες στοχευμένες θεραπείες	77
1.9. CTCs/DTCs ως εργαλείο πρόγνωσης και πρόβλεψης. Έτοιμο για κλινική εφαρμογή;	78
1.10. Στόχοι της διατριβής	81
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	84
2.1. Οι Ασθενείς	84
2.2. Οι Μέθοδοι	86
2.2.1. Μοριακή ανίχνευση CK19mRNA+, MGB1mRNA+, HER2mRNA+ CTCs. 86	
2.2.1.1. Κλινικά δείγματα	86
2.2.1.2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)	86
2.2.1.3. Απομόνωση ολικού RNA	87
2.2.1.4. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)	89
2.2.1.5. Δείκτες για την ανίχνευση CTCs	91
2.2.1.6. Έλεγχος ποιότητας των RNA δειγμάτων της RT-PCR	91
2.2.1.7. Ευαισθησία και ειδικότητα RT-PCR πολλαπλών δεικτών	97
2.2.2. Ανίχνευση CTCs με την τεχνική του ανοσοφθορισμού	101
2.2.3. Ανοσοϊστοχημεία στον πρωτοπαθή όγκο για την έκφραση του HER2 και της MGB1	102
2.3. Στατιστική ανάλυση	103
2.4. Αποτελέσματα	104
2.4.1. Χαρακτηριστικά των ασθενών και ανίχνευση CTCs.....	104
2.4.2. Έκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο και ανίχνευση CTCs.....	107
2.4.3. Έκφραση της MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο και ανίχνευση CTCs.....	107
2.4.4. Ανοσοφαινότυπος CTCs.....	108
2.4.5. Μοριακό προφίλ CTCs και κλινική έκβαση.....	110
2.4.6. Μονοπαραγοντική και Πολυπαραγοντική ανάλυση.....	115
2.5. Συζήτηση	119
3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	125
3.2. SUMMARY.....	127
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	129
5. ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ	149

6. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ..... 151

Πρόλογος

Τα τελευταία χρόνια διάφορα νέα μοριακά εργαλεία έχουν προταθεί, για να βοηθήσουν τους παθολόγους ογκολόγους προκειμένου να απαντήσουν στις τρεις κρίσιμες ερωτήσεις που αφορούν την αντιμετώπιση του πρώιμου καρκίνου του μαστού: α) ποιες γυναίκες έχουν τόσο καλή πρόγνωση, ώστε να μπορούμε με ασφάλεια να αποφύγουμε τη χορήγηση μιας ενδεχομένως τοξικής χημειοθεραπείας (πρόγνωση); β) ποια θεραπεία θα είναι πιο αποτελεσματική για τη κάθε συγκεκριμένη ασθενή (πρόβλεψη); και γ) ποιες γυναίκες παραμένουν σε υψηλό κίνδυνο υποτροπής και απαιτούν τη χορήγηση δευτερογενούς συμπληρωματικής θεραπείας. Ένας τρόπος για να απαντηθούν αυτά τα ερωτήματα είναι η μελέτη της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (minimal residual disease, MRD), δηλαδή των μικρομεταστατικών κυττάρων που δεν είναι ανιχνεύσιμα με τις συνήθεις διαγνωστικές τεχνικές. Η παρουσία διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων (Disseminated Tumor Cells, DTCs) στον μυελό των οστών έχει συσχετισθεί με πτωχή κλινική έκβαση στον πρώιμο καρκίνο του μαστού σε πολλές μελέτες. Ωστόσο, η ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells, CTCs) του περιφερικού αίματος είναι ευκολότερη και επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη εκτίμηση και παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου. Ήδη από το 1996 είχε δημιουργηθεί στο Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης μια ερευνητική ομάδα με στόχο την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Μόλις 6 μήνες αφού ξεκίνησα την ειδικότητα της Παθολογικής Ογκολογίας, οι καθηγητές μου κ. Β. Γεωργούλιας και κ. Δ. Μαυρουδής μου έκαναν την τιμή να μου προτείνουν την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής. Το θέμα που μου κέντρισε το ενδιαφέρον αφορούσε την μελέτη των μικρομεταστατικών κυττάρων στον καρκίνο του μαστού. Η μελέτη της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, μετά τη χειρουργική επέμβαση εξαίρεσης του πρωτοπαθούς όγκου σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού, έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον, διότι μπορεί όχι μόνο να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τη βιολογία της μετάστασης στον καρκίνο του μαστού, αλλά και να μπορέσουμε να προβλέψουμε την έκβαση της νόσου σε κάθε ασθενή. Επιπλέον, στο μέλλον ο φαινοτυπικός και γονοτυπικός χαρακτηρισμός των μικρομεταστατικών κυττάρων μπορεί να μας βοηθήσει να καταλάβουμε τους μηχανισμούς αποτυχίας της συμπληρωματικής θεραπείας και να εντοπίσουμε καινούργιους θεραπευτικούς στόχους για καινοτόμες στρατηγικές συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Επομένως, η μελέτη της μικρομεταστατικής νόσου μπορεί να βοηθήσει στο μέλλον τους κλινικούς ογκολόγους να προσφέρουν εξατομικευμένη θεραπεία στους ασθενείς τους.

Ήδη το εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, είχε εκτεταμένη εμπειρία με τη χρήση της CK19 για την ανίχνευση κυκλοφορούντων μικρομεταστατικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Οι μελέτες των δύο εργαστηρίων έδειξαν ότι η ανίχνευση της CK19 ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας πτωχής έκβασης σε γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Με

δεδομένη την ετερογένεια των μικρομεταστατικών κυττάρων, η ιδέα για την παρούσα διατριβή ήταν να εξετασθεί αν η χρήση περισσότερων του ενός δεικτών μπορούσε να βελτιώσει την ευαισθησία και την ειδικότητα της εξέτασης να προβλέπει την υποτροπή της νόσου. Έτσι χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από τη μέθοδο για την ενίσχυση του γονιδίου της CK19, μια ακόμη μέθοδος για την ενίσχυση του HER2 γονιδίου (αναπτύχθηκε από την κα Μ. Περράκη) και μια για την ενίσχυση του γονιδίου της mammapglobin-A (αναπτύχθηκε από το εργαστήριο της κα Λιανίδου). Στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε μια μέθοδος που συνδυάζει τους 3 δείκτες (CK-19, mammapglobin-A και HER2) για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, η οποία ελέγχθηκε για την προγνωστική της αξία σε 175 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Η έρευνα αυτή είναι η πρώτη δημοσιευμένη στη διεθνή βιβλιογραφία στην οποία αποδεικνύεται ότι η ανίχνευση CTCs με τη χρήση μιας RT-PCR πολλαπλών δεικτών έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διαστρωμάτωση του κινδύνου υποτροπής σε κλινικές μελέτες πρώιμου καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, απαραίτητη είναι μια διεθνής πολυκεντρική μελέτη στην οποία η κλινική χρησιμότητα της παραπάνω μεθόδου θα ελεγχθεί σε διαφορετικά εργαστήρια και στην οποία θα απαντηθούν ερωτήματα, όπως η σταθερότητα του δείγματος κατά τη μεταφορά, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων ανάμεσα σε διαφορετικά εργαστήρια και ο έλεγχος της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων μας σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών. Τώρα, αξιοποιώντας τη γνώση και

εμπειρία που αποκτήθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, καταβάλλεται προσπάθεια για μεταφορά της τεχνολογίας και της τεχνογνωσίας για την μελέτη των CTCs στο εργαστήριο Μεταφραστικής Έρευνας του Jules Bordet Institut, Brussels, Belgium που διευθύνεται από τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Χρήστο Σωτηρίου. Ο στόχος της προσπάθειας αυτής είναι η αξιολόγηση των CTCs ως προγνωστικών και προβλεπτικών εργαλείων στα πλαίσια πολυκεντρικών διεθνών προοπτικών μελετών στις οποίες ερωτήματα για την κλινική χρήση των CTCs είναι δευτερεύοντες ή πρωτεύοντες στόχοι των μελετών.

Ευχαριστώ θερμά όλους τους δασκάλους μου, ιδιαίτερα τους καθηγητές μου κ. Β. Γεωργούλια και κ. Δ. Μαυρουδή τόσο για την τιμή να μου αναθέσουν την εκπόνηση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής, όσο και για το ενδιαφέρον με το οποίο επέβλεψαν κάθε στάδιο από την αρχή της εκπόνησής της μέχρι και την ολοκλήρωσή της. Τους ευχαριστώ, γιατί μου έμαθαν να θέτω ερωτήματα και να βρίσκω τρόπους να τα προσεγγίζω, να συγγράφω επιστημονικές εργασίες και να δουλεύω συλλογικά προσφέροντας σε μια ομάδα. Τέλος τους ευχαριστώ, γιατί μου έδειξαν, ο καθένας με το παράδειγμά του, πώς να προσεγγίζω τον ογκολογικό άρρωστο και να του προσφέρω τις υπηρεσίες μου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Δ. Μαυρουδή, ο οποίος ήταν και ο επιβλέπων της διατριβής μου, γιατί χωρίς τη συνεχή βοήθειά του δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίησή της. Ευχαριστώ την Αναπλ. Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας κα Ε. Λιανίδου, για τις πολύτιμες επιστημονικές παρατηρήσεις της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Ευχαριστώ τις βιολόγους Μ. Περράκη, Γ. Καλλέργη, Σ. Αποστολάκη και Μ.

Ντούλια για τις πολύτιμες υποδείξεις τους και τη βοήθειά τους στην εκτέλεση των πειραμάτων. Ευχαριστώ τον Αναπλ. Καθηγητή Βιοστατιστικής κ. Γρ. Χλουβεράκη και την κα Δώρα Χατζηδάκη για τη βοήθειά τους σε θέματα Βιοστατιστικής, τον Αναπλ. Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Ε. Σταθόπουλο και την παθολογοανατόμο κα Μ. Καφούση για την εκτίμηση των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των όγκων των ασθενών που αναλύθηκαν για την παρούσα διατριβή. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τους Καθηγητές κ. Σαμώνη, κ.Στουρνάρα, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Θεωδορόπουλο, και την Λέκτορα κ. Αγγελάκη για τις παρατηρήσεις τους αναφορικά με την διατριβή μου. Ευχαριστώ τον κ. Χρήστο Σωτηρίου, Αναπλ. Καθηγητή του Ελεύθερου Πανεπιστημίου των Βρυξελλών για τις γόνιμες συζητήσεις που είχα μαζί του αναφορικά με τη βιολογία του καρκίνου του μαστού καθώς και για την γονιδιακή ανάλυση του πρωτοπαθούς όγκου με τη χρήση μικροσυστοιχιών. Επίσης ευχαριστώ όλους τους ιατρούς, τις νοσηλεύτριες, τις γραμματείς της Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης, τα μέλη της ομάδας Κλινικών Μελετών και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιολογίας του Καρκίνου καθώς και αυτό της Παγκρήτιας Ένωσης Βιοϊατρικών Ερευνών για την βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Τέλος, ευχαριστώ όλες τις ασθενείς που πρόθυμα δέχθηκαν να συμμετάσχουν στη μελέτη ελπίζοντας ότι, ακόμα και εάν δεν βοηθηθούν οι ίδιες, η γνώση που θα παραχθεί θα μπορούσε να βοηθήσει τις μελλοντικές γενεές.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος που προσβάλλει τις γυναίκες. Το 2006 είχαν διαγνωσθεί στην Ευρώπη 429.900 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και είχε διαπιστωθεί ότι ο καρκίνος αυτός ήταν η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο (131.900 θάνατοι) μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα και τον κολορθικό καρκίνο(1). Στην αντιμετώπιση του πρώιμου καρκίνου του μαστού ο παθολόγος ογκολόγος πρέπει καθημερινά στην κλινική πράξη να απαντήσει σε δύο ερωτήματα:

α. Μπορώ να εντοπίσω τις γυναίκες που έχουν καλή πρόγνωση και δεν χρειάζονται χημειοθεραπεία ως μέρος της συμπληρωματικής συστηματικής τους θεραπείας;

β. Μπορώ να εντοπίσω ποιός συνδυασμός συμπληρωματικής συστηματικής θεραπείας είναι ο καλύτερος για κάθε γυναίκα;

Για την απάντηση στο πρώτο ερώτημα οι παθολόγοι ογκολόγοι χρησιμοποιούν τις κατευθυντήριες οδηγίες στις οποίες έχουν καταλήξει διάφορες ομάδες ειδικών(2) ή και αλγόριθμους, όπως το Nottingham Prognostic Index(3) και το Adjuvant Online(4;5). Τα ανωτέρω εργαλεία συνδυάζουν την προγνωστική πληροφορία από διάφορα καθιερωμένα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενή και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του όγκου, για να βοηθήσουν το γιατρό να εκτιμήσει την πρόγνωση του ασθενή. Για το δεύτερο ερώτημα δύο δείκτες χρησιμοποιούνται κυρίως στην καθημερινή πράξη: Η έκφραση του υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) στον πρωτοπαθή όγκο καθορίζει αν θα δώσουμε ενδοκρινική

θεραπεία, ενώ η έκφραση του υποδοχέα HER2 αν θα δώσουμε θεραπεία με trastuzumab σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού.

Έτσι τα ακόλουθα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη από τους ογκολόγους

1.1.1. Η ηλικία

Αν και υπήρξαν αρκετές αντικρουόμενες ανακοινώσεις για τον ρόλο που διαδραματίζει η ηλικία εμφάνισης της νόσου στην πορεία του καρκίνου του μαστού, το 1994 δημοσιεύθηκαν δυο μεγάλες μελέτες από τις οποίες φάνηκε ότι ηλικία διάγνωσης μικρότερη των 35 ετών αποτελεί ανεξάρτητο επιβαρυντικό προγνωστικό παράγοντα(6;7).

1.1.2. Το μέγεθος του όγκου

Το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για υποτροπή της νόσου. Σε μια σειρά 13.464 ασθενών με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, διαπιστώθηκε ότι η 5ετής επιβίωση για τις ασθενείς με όγκους μέγιστης διαμέτρου μικρότερης από 1cm ήταν 99% και μειωνόταν στο 89%, όταν ο όγκος είχε διάμετρο από 1 έως 3cm και 86% σε όγκους από 3 έως 5cm(8). Σύμφωνα με την τελευταία TNM ταξινόμηση, οι όγκοι του μαστού διακρίνονται σε 4 βασικές κατηγορίες με βάση το μέγεθος τους: T1 όγκοι $\leq 2\text{cm}$, $2\text{cm} < \text{T2}$ όγκοι $\leq 5\text{cm}$, T3 όγκοι $> 5\text{cm}$ και T4 όγκοι οποιοδήποτε μεγέθους με απευθείας επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα και το δέρμα(9).

1.1.3. Η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων

Στις περισσότερες κλινικές μελέτες, η διαστρωμάτωση των ασθενών γίνεται σε τέσσερις ομάδες οι οποίες περιλαμβάνουν την ομάδα των ασθενών χωρίς διηθημένους λεμφαδένες, και τις ομάδες με 1 έως 3, με 4 έως 9 και με πάνω από 10 διηθημένους λεμφαδένες. Η 5ετής επιβίωση για την πρώτη ομάδα είναι 83%, και 73%, 46% και 28% αντίστοιχα για τις υπόλοιπες(10). Τα ποσοστά επιβίωσης επηρεάζονται τόσο από την ύπαρξη ή όχι μεταστατικής εστίας στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, όσο και από το επίπεδο εντόπισης των διηθημένων λεμφαδένων, τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων, την ποσότητα της μεταστατικής νόσου, την παρουσία ή όχι εξωλεμφαδενικής διασποράς και την παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων στα προσαγωγά αγγεία. Στην τελευταία TNM ταξινόμηση για τη διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων χρησιμοποιούνται τρεις όροι: μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα (isolated tumor cells), μικρομεταστάσεις (micrometastases) και μακρομεταστάσεις (macrometastases)(9). Ως μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα ορίζονται μεμονωμένα κύτταρα ή μικρές ομάδες κυττάρων όχι μεγαλύτερες από 0.2mm χωρίς ιστολογική απόδειξη κακοήθους δραστηριότητας, όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή αντίδραση του στρώματος. Ως μικρομεταστάσεις ορίζονται διηθήσεις καρκινικών κυττάρων >0.2mm και <2mm, ενώ ως μακρομεταστάσεις διηθήσεις >2mm. Κατά παράδοση, η κατάσταση των μασχαλιαίων λεμφαδένων ελεγχόταν με λεμφαδενικό καθαρισμό επιπέδου I και II. Πιο πρόσφατα άρχισε να κερδίζει έδαφος η βιοψία του λεμφαδένα φρουρού, η εντόπιση του οποίου, όταν γίνει με συνδυασμό χρώσης με κυανούν του μεθυλενίου και ραδιοεπισημασμένου

κολλοειδούς, είναι ακριβής και συμβαδίζει με την κλασική σταδιοποίηση της νόσου σε ποσοστό πάνω από 95%(11).

1.1.4. Ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας

Παρότι ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας θεωρείται κλασικός προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του μαστού(12), η χρήση του ήταν από τα περισσότερο αμφιλεγόμενα ζητήματα που εξετάστηκαν από την Breast Task Force κατά τη συζήτηση του τελευταίου AJCC Cancer Staging. Τελικώς ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας δεν έχει συμπεριληφθεί στην τελευταία ταξινόμηση(9). Η αξιολόγηση του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας δεν είχε αρχικά ικανοποιητική επαναληψιμότητα στα διάφορα εργαστήρια. Με στόχο να γίνει η εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας πιο ποσοτική, οι Elston και Ellis σχεδίασαν μια τροποποίηση του συστήματος των Bloom και Richardson, συγκεκριμένα τον κατά Nottingham ιστολογικό βαθμό κακοήθειας (Nottingham combined histologic grade)(13). Αυτό το σύστημα βασίζεται σε μια ημιποσοτική εκτίμηση τριών μορφολογικών χαρακτηριστικών (ποσοστό σχηματισμού σωληναρίων, βαθμός πυρηνικού πλειομορφισμού, και η μέτρηση των μιτώσεων σε ένα προκαθορισμένο πεδίο). Κάθε χαρακτηριστικό βαθμολογείται με μια τιμή από 1 έως 3 και τελικά υπολογίζεται ένα συνολικό score. Με ένα score 3, 4 ή 5 ο όγκος χαρακτηρίζεται grade 1, με score 6 ή 7 χαρακτηρίζεται grade 2 και με score 8 ή 9 grade 3.

1.1.5. Η διήθηση αγγείων και λεμφαγγείων

Υπάρχουν εργασίες από τις οποίες προκύπτει ότι η διήθηση αγγείων και λεμφαγγείων αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για τις ασθενείς χωρίς διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες(14). Από μια μελέτη της International Breast Cancer Study Group με 1.275 ασθενείς χωρίς διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες, η παρουσία lymphovascular invasion (LVI) συνδεόταν με αύξηση κατά 15% του ποσοστού υποτροπής(15).

1.1.6. Οι υποδοχείς των οιστρογόνων και προγεστερόνης

Η ανίχνευση και μέτρηση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων γινόταν παλιότερα με βιοχημικές μεθόδους σε ομογενοποιημένο φρέσκο ιστό, ενώ σήμερα γίνεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε τομές παραφίνης. Τελευταία ερευνάται η εκτίμησή τους με ποσοτική RT-PCR σε ιστό παραφίνης(16;17).

Με βάση την τελευταία μεταανάλυση των Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), ασθενείς με ER-αρνητικούς όγκους υποτροπιάζουν συχνότερα τα πρώτα 5 χρόνια από τη διάγνωση, ενώ ασθενείς με ER-θετικούς όγκους υποτροπιάζουν συχνότερα τα έτη 5-15. Συνολικά το ποσοστό των παρατηρούμενων υποτροπών στην 15ετία είναι ανεξάρτητο από την κατάσταση του ER-υποδοχέα του πρωτοπαθούς όγκου(18). Επομένως ο ER-υποδοχέας χρησιμοποιείται κυρίως ως παράγοντας ανταπόκρισης σε ορμονοθεραπεία. Μέχρι πρόσφατα, σε αρκετά εργαστήρια, για να χαρακτηριστεί ένας όγκος θετικός για ορμονικούς υποδοχείς, θα έπρεπε αυτοί να εκφράζονται τουλάχιστον στο 10% των κυττάρων. Όμως από μια ανασκόπηση διαφόρων

μελετών, προέκυψε ότι ακόμη και όταν μόνο το 1% των κυττάρων εκφράζει οιστρογονικούς υποδοχείς, μπορεί να υπάρξει σημαντικό όφελος από την συμπληρωματική χορήγηση αντιοιστρογόνων(19).

1.1.7. Ο υποδοχέας του HER2

Ο έλεγχος για υπερέκφραση του HER2 γίνεται με ανοσοϊστοχημεία, αλλά η εξέταση επιβεβαίωσης είναι η μέθοδος του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (Fluorescent *In Situ* Hybridization, FISH)(20). Η υπερέκφρασή του συνδέεται με φτωχότερη πρόγνωση(21). Παρ' όλα αυτά χρησιμοποιείται όχι τόσο ως προγνωστικός δείκτης αλλά κυρίως ως δείκτης πρόβλεψης της ανταπόκρισης στο trastuzumab.

Για να δοθεί απάντηση στα δύο βασικά ερωτήματα, της εκτίμησης της πρόγνωσης και της πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία, έχουν προταθεί και βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης διάφοροι δείκτες μετρώμενοι με διάφορες τεχνολογίες (22). Από τους δείκτες του περιφερικού αίματος οι δείκτες CEA, CA 15-3, CA27.29 έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση μεταστατικού καρκίνου του μαστού, ιδιαίτερα όταν δεν υπάρχει μετρήσιμη νόσος. Για μερικούς δείκτες που αφορούν εξέταση του πρωτοπαθούς όγκου (uPA/PAI-1, δύο γονιδιακές υπογραφές όπως το MammaPrint και το Oncotype DX), ενώ υπάρχουν αρκετά στοιχεία για την κλινική τους χρησιμότητα, δεν υπάρχει απόδειξη επιπέδου 1 (level I evidence) ότι η χρήση τους μπορεί να βελτιώσει την αντιμετώπιση ασθενών με καρκίνο του μαστού. Παρ' όλα αυτά το

Oncotype DX έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται από πολλούς Παθολόγους Ογκολόγους στην καθημερινή κλινική πράξη στις ΗΠΑ.

Τέλος με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες του ASCO για τους παρακάτω δείκτες δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά στοιχεία, ώστε να χρησιμοποιηθούν στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού: Δείκτες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανιχνεύσιμοι με βάση την ανοσοϊστοχημεία (π.χ Ki67, cyclin D, cyclin E, p27, p21, thymidine kinase, topoisomerase II) ή με βάση την κυτταρομετρία ροής (π.χ DNA content, S phase,), το κυκλοφορούν εξωκυττάριο τμήμα του HER2 υποδοχέα, οι μετρήσεις του p53, της Cathepsin D, τμημάτων της Cyclin E, η πρωτεωμική ανάλυση, η ανίχνευση Κυκλοφορούντων Καρκινικών Κυττάρων (Circulating Tumor Cells, CTCs) στο αίμα ασθενών και διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων (Disseminated Tumor Cells, DTCs) στον μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού(22).

1.1.8. CEA, CA 15-3, CA27.29

Δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία που να υποστηρίζουν τη χρήση των ανωτέρω δεικτών στη διάγνωση, παρακολούθηση και θεραπεία ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, ενώ οι ανωτέρω δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με το ιστορικό, τη φυσική εξέταση και τις απεικονιστικές διαγνωστικές εξετάσεις για την παρακολούθηση της απάντησης στη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ιδιαίτερα αυτών που δεν έχουν μετρητή νόσο.

1.1.9. Γονιδιακές υπογραφές

Η εφαρμογή της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών και η αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος επέτρεψε στους επιστήμονες να μελετήσουν ταυτόχρονα την έκφραση χιλιάδων γονιδίων. Οι μελέτες αυτές της γονιδιακής έκφρασης είχαν ως αποτέλεσμα:

- α. Μια καινούρια μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού σε μοριακούς υποτύπους με κλινική σημασία και επιπλέον σημαντική συμβολή στην κατανόηση διαφόρων ογκογενετικών μονοπατιών και της διαδικασίας της μετάστασης.
- β. Νέα εργαλεία για την πρόβλεψη της υποτροπής της νόσου και της ανταπόκρισης σε διάφορες θεραπείες.

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο γονιδιώματος στον καρκίνο του μαστού επιβεβαίωσε ότι ο καρκίνος αυτός δεν είναι μια νοσολογική κατάσταση, αλλά αποτελείται από μοριακά διαφορετικές ασθένειες. Τέσσερα μοριακά πορτραίτα καρκίνου του μαστού παρατηρήθηκαν επανειλημμένα από ανεξάρτητους ερευνητές(23-26). Αυτά περιλαμβάνουν: (α) Basal-like πορτραίτο που αντιστοιχεί κυρίως σε ER- και HER2-αρνητικά, υψηλού βαθμού ιστολογικής κακοήθειας, διηθητικά πορογενή καρκινώματα (β) τους Luminal-A όγκους που είναι ER-θετικά χαμηλού βαθμού ιστολογικής κακοήθειας, διηθητικά πορογενή καρκινώματα (γ) τους Luminal-B όγκους που είναι επίσης ER-θετικοί αλλά υψηλού βαθμού κακοήθειας και τους (δ) HER2-θετικούς όγκους που χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το HER2. Οι ER-αρνητικοί και ER-θετικοί όγκοι διαφέρουν στην έκφραση όχι μόνο ενός ορμονικού υποδοχέα αλλά σε επίπεδο έκφρασης χιλιάδων γονιδίων (διάφορες κυτταροκερατίνες, ER-ρυθμιζόμενα γονίδια και γονίδια σχετιζόμενα με τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και πολλά γονίδια με άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία όσον αφορά την βιολογία του καρκίνου).

Όσον αφορά την ανάπτυξη γονιδιακών υπογραφών για την πρόγνωση της υποτροπής έχουν χρησιμοποιηθεί τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις:

α. Η “top-down” προσέγγιση, η οποία συγκρίνει δεδομένα γονιδιακής έκφρασης από σειρές ασθενών με γνωστή κλινική έκβαση για να εντοπίσει γονίδια που σχετίζονται με την πρόγνωση χωρίς καμία *a priori* βιολογική υπόθεση.

β. Η “hypothesis driven or bottom-up” προσέγγιση, η οποία εντοπίζει αρχικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που σχετίζονται με ένα βιολογικό φαινότυπο ή ένα μοριακό μονοπάτι και στην συνέχεια συσχετίζει τα δεδομένα αυτά με την κλινική έκβαση.

γ. Η “candidate gene” προσέγγιση η οποία συνδυάζει συγκεκριμένα γονίδια που έχουν ενδιαφέρον με βάση την υπάρχουσα γνώση της βιολογίας του μαστού σε ένα πολυπαραγοντικό προγνωστικό μοντέλο.

Ένα παράδειγμα της “top-down” προσέγγισης είναι η γονιδιακή υπογραφή των 70-γονιδίων (MammaPrint, Agendia Inc., Amsterdam, Netherlands) που αναπτύχθηκε από ερευνητές στο Netherlands Cancer Institute (NKI). Η υπογραφή αυτή εγκρίθηκε πρόσφατα από τον οργανισμό U.S. Food and Drug Administration (FDA), για να βοηθήσει στην εκτίμηση της πρόγνωσης σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες(27). Η μέθοδος αυτή μετράει την έκφραση 70-γονιδίων και υπολογίζει ένα προγνωστικό score το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να

κατατάξει ασθενείς σε ομάδες «καλής» και «πτωχής» πρόγνωσης. Η υπογραφή αυτή ελέγχθηκε σε δύο διαφορετικές σειρές ασθενών. Σε μια σειρά 295 ασθενών, οι ασθενείς με τη γονιδιακή υπογραφή «καλής» πρόγνωσης είχαν επιβίωση ελεύθερη απομακρυσμένων μεταστάσεων 95% (standard error [SE] \pm 2%) και 85% (SE \pm 4%) στα 5 και 10 χρόνια, αντίστοιχα, ενώ οι ασθενείς με την «πτωχή» μοριακή υπογραφή είχαν 60% (SE \pm 4%) και 50% (SE \pm 4.5%) αντίστοιχα (28). Μια δεύτερη μελέτη (n=307) επιβεβαίωσε τα ανωτέρω ευρήματα(29). Είναι σημαντικό, ότι η συγκεκριμένη υπογραφή μπόρεσε να ξεχωρίσει υποομάδες ασθενών διαφορετικής πρόγνωσης μέσα στις ομάδες ασθενών διαφορετικού κλινικού κινδύνου, όπως αυτές έχουν οριστεί χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Adjuvant Online (www.adjuvantonline.com). Με άλλα λόγια, μερικοί κλινικώς υψηλού κινδύνου ασθενείς μπορούσαν να επαναπροσδιοριστούν ως χαμηλού κινδύνου ασθενείς με βάση την γονιδιακή τους υπογραφή, και το αντίθετο.

Ένα παράδειγμα της “hypothesis driven or bottom-up” προσέγγισης είναι το Genomic Grade Index που ανέπτυξαν οι Σωτηρίου και συνεργάτες(30). Οι ερευνητές αυτοί προσπάθησαν να ανιχνεύσουν σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης τις διαφορές ανάμεσα σε όγκους χαμηλής και υψηλής κακοήθειας υποθέτοντας ότι τα γονίδια με διαφοροποιημένη έκφραση θα μπορούσαν να βελτιώσουν την πρόγνωση στην ομάδα των όγκων οι οποίοι χαρακτηρίζονται με βάση την μορφολογία ως όγκοι ενδιάμεσης κακοήθειας. Χρησιμοποιώντας αυτήν την προσέγγιση ταυτοποιήθηκε μια υπογραφή 97-γονιδίων η οποία μπόρεσε να ξεχωρίσει όγκους χαμηλής από όγκους υψηλής κακοήθειας και να χωρίσει τους όγκους ενδιάμεσης κακοήθειας σε δύο ξεχωριστές υποομάδες χαμηλής και

υψηλής κακοήθειας με διαφορετική πρόγνωση. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε διάφορες ανεξάρτητες βάσεις δεδομένων που δημιουργήθηκαν με διαφορετικές πλατφόρμες μικροσυστοιχιών(30).

Ένα παράδειγμα της “candidate gene” προσέγγισης είναι το Oncotype DX (Genomic Health, Inc., Redwood City, CA) το οποίο χρησιμοποιεί την Q-RT-PCR τεχνολογία. Η μέθοδος αυτή είναι εμπορικά διαθέσιμη στις ΗΠΑ, για να βοηθήσει τους κλινικούς ογκολόγους στη λήψη θεραπευτικής απόφασης και μετράει την έκφραση του ER και HER2 καθώς και διαφόρων άλλων ER-ρυθμιζόμενων μεταγράφων καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του Oncotype DX είναι ότι συνδυάζει τα ανωτέρω αποτελέσματα σε ένα απλό και εύκολα κατανοητό σκορ υποτροπής “recurrence score” (RS). Το RS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια συνεχής μεταβλητή για την εκτίμηση της πιθανότητας υποτροπής στα 10 χρόνια ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να κατατάξει τους ασθενείς σε κατηγορίες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου.

Η συσχέτιση ανάμεσα στο RS και την απομακρυσμένη υποτροπή εξετάστηκε σε ιστούς παραφίνης από 668 ασθενείς με ER-θετικούς όγκους με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες που έλαβαν μόνο ταμοξιφαίνη στην κλινική μελέτη National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B14. Τα ποσοστά 10-ετούς απομακρυσμένης υποτροπής ήταν 7% (95% CI: 4-10%), 14% (95% CI: 8-20%), και 30% (95%CI: 24-37%) για κατηγορίες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου αντίστοιχα ($p < 0.001$)(16). Έτσι οι ER-θετικοί ασθενείς με υψηλό RS δεν θεραπεύονται αποτελεσματικά με 5 χρόνια ταμοξιφαίνης. Η αξία

του RS ως καθαρά προγνωστικού παράγοντα εξετάστηκε επίσης στο σκέλος ελέγχου στην B-14 μελέτη, όπου φάνηκε ότι το RS έχει προγνωστική αξία στους ER-θετικούς ασθενείς ακόμη και απουσία ενδοκρινικής θεραπείας(16). Η συσχέτιση ανάμεσα στο RS και το όφελος από συμπληρωματική χημειοθεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη, και 5-φθοριοουρακίλη (CMF) σε ER-θετικούς ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες που έλαβαν ταμοξιφαίνη εξετάστηκε σε μια υποομάδα ασθενών από την τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη NSABP B20 (n=651)(31). Υψηλότερο RS σχετίστηκε με μεγαλύτερο όφελος από CMF χημειοθεραπεία. Όταν έγινε σύγκριση της πρόγνωσης με βάση τα κλινικά δεδομένα και το RS, παρατηρήθηκε σε 1/3 των περιπτώσεων διαφορά ανάμεσα στην κλινική και την γενωμική πρόβλεψη. Στις περιπτώσεις αυτές, η γονιδιακή υπογραφή προέβλεψε με μεγαλύτερη ακρίβεια την 10-ετή επιβίωση ελεύθερη υποτροπής(32).

Διάφοροι ερευνητές έχουν αναπτύξει διαφορετικές γονιδιακές υπογραφές(33). Οι διάφορες αυτές υπογραφές έχουν λίγα κοινά γονίδια. Αυτό μπορεί να προκαλεί έκπληξη αρχικά, αλλά είναι συχνό χαρακτηριστικό δεδομένων που περιέχουν μεγάλο αριθμό στενά σχετιζόμενων μεταβλητών. Πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί των σχετιζόμενων μεταβλητών μπορεί να επιλεγούν, ώστε να δημιουργηθούν γονιδιακές υπογραφές με παρόμοια προγνωστική αξία. Έτσι, όταν 5 διαφορετικές γονιδιακές υπογραφές ελέγχθηκαν στην ίδια σειρά ασθενών, 4 από τις 5 είχαν παρόμοια προγνωστική αξία(34). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε σε μια πρόσφατη μεταανάλυση δημόσια διαθέσιμων κλινικών δεδομένων και δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από 3000

ασθενείς με καρκίνο του μαστού, η οποία μελέτησε συνολικά 9 γονιδιακές υπογραφές. Κάθε μια από αυτές τις γονιδιακές υπογραφές είχε παρόμοια προγνωστική ικανότητα παρά τη μικρή επικάλυψη όσον αφορά τα γονίδια που την αποτελούν. Μερικά πολύ σημαντικά συμπεράσματα προέκυψαν από την ανάλυση αυτή:

α. Τα γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ήταν κυρίως υπεύθυνα για την προγνωστική ικανότητα κάθε υπογραφής.

β. Οι γονιδιακές υπογραφές ήταν πολύ χρήσιμες στην ταξινόμηση των ER-θετικών ασθενών στην κατηγορία υψηλού ή χαμηλού κινδύνου για υποτροπή, αλλά ήταν λιγότερο χρήσιμες στους ασθενείς με ER-αρνητικούς καθώς και HER2-θετικούς όγκους.

γ. Η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου διατήρησαν την προγνωστική τους αξία που ενισχύει την άποψη ότι τόσο οι γονιδιακές υπογραφές όσο και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου είναι απαραίτητα για μια πιο κατά το δυνατόν ακριβή εκτίμηση της πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Η πρώτη γενιά των γονιδιακών υπογραφών χαρακτηρίζεται από μεγάλα διαστήματα εμπιστοσύνης ως προς την ακρίβεια πρόβλεψης του κινδύνου υποτροπής και θανάτου, γι αυτό και η πραγματική τους ακρίβεια μένει να καθοριστεί. Μια κατάλληλη θεραπευτική απόφαση μπορεί να ληφθεί και χωρίς την χρήση αυτών των tests. Ωστόσο, όταν οι κλινικές παράμετροι δεν βοηθούν ή όταν οι ασθενείς δεν είναι σίγουροι για τη θεραπευτική τους αγωγή, οι γονιδιακές υπογραφές μπορεί να βοηθήσουν στην διαδικασία λήψης της απόφασης.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι καμία προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη δεν έχει ολοκληρωθεί η οποία να συγκρίνει τη λήψη θεραπευτικής απόφασης με βάση τις κλινικές παραμέτρους μόνο ή λαμβάνοντας υπόψη και τις γονιδιακές υπογραφές. Δυο τέτοιες μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη, η μελέτη MINDACT στην Ευρώπη, στην οποία δοκιμάζεται το Mammaprint και η μελέτη TAILORX στις ΗΠΑ, στην οποία δοκιμάζεται το Oncotype DX. Δεδομένα επιβίωσης από τις παραπάνω μελέτες δεν θα είναι διαθέσιμα για αρκετά χρόνια. Ωστόσο, το κλινικό όφελος από την χρήση αυτών των γονιδιακών υπογραφών μπορεί να είναι ανεξάρτητο από το όφελος για την επιβίωση. Μπορεί να υποστηριχθεί ότι η προγνωστική πληροφορία η οποία βοηθά τους ασθενείς και τους γιατρούς τους να νιώθουν πιο άνετοι με μια συγκεκριμένη θεραπευτική απόφαση έχει από μόνη της αξία.

1.1.10. uPA/PAI-1

Με βάση της τελευταίες οδηγίες του ASCO η μέτρηση του uPA/PAI-1 με ELISA σε 300 mg φρέσκου ή κατεψυγμένου ιστού από καρκίνο του μαστού (το λιγότερο) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της πρόγνωσης σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθέντα καρκίνο του μαστού και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες(22). Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση γι αυτούς τους δείκτες δεν είναι ακριβής, ενώ η προγνωστική αξία της ELISA από μικρότερους όγκους ιστού, όπως από core βιοψίες, δεν έχει εκτιμηθεί. Χαμηλά επίπεδα και των δύο δεικτών έχουν συσχετισθεί με χαμηλό κίνδυνο υποτροπής ειδικά σε γυναίκες με ER-

θετικούς όγκους που λαμβάνουν ενδοκρινική θεραπεία, τόσο ώστε η χημειοθεραπεία να προσφέρει μόνο πολύ μικρό επιπλέον όφελος.

Έχουν δημοσιευθεί τα πρώιμα αποτελέσματα μιας προοπτικής μελέτης η οποία χρησιμοποίησε τα επίπεδα uPA/PAI-1, για να στρωματοποιήσει ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες(35). Στη μελέτη εντάχθηκαν 556 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Ασθενείς των οποίων οι όγκοι παρουσίαζαν χαμηλή έκφραση των δύο αυτών δεικτών δεν έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία, αλλά τέθηκαν σε παρακολούθηση. Ασθενείς των οποίων οι όγκοι είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του uPA και PAI-1, τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία με CMF ή καθόλου συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Σ' αυτή τη δημοσίευση η εκτιμώμενη υποτροπή στην 3-ετία για τους 241 ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης uPA/PAI-1 ήταν 6.7%, με ένα διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 32 μηνών(35). Περίπου ο διπλός αριθμός υποτροπών παρατηρήθηκε σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης είτε uPA είτε και PAI-1 που δεν έλαβαν χημειοθεραπεία και ο κίνδυνος υποτροπής στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία ήταν 0.56 του κινδύνου των ασθενών που δεν έλαβαν θεραπεία(35). Σε μια άλλη προοπτική κλινική μελέτη που είναι σε εξέλιξη, ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες τυχαιοποιούνται ανάμεσα σε μια ομάδα στην οποία οι κλινικές αποφάσεις σχετικά με τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας λαμβάνονται χρησιμοποιώντας τα uPA/PAI-επίπεδα, ενώ στην άλλη ομάδα λαμβάνονται με βάση της ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες.

Μέχρι τώρα η συγκεκριμένη εξέταση δεν χρησιμοποιείται στην καθημερινή κλινική πράξη, διότι αφενός δεν υπάρχει προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη που να αποδεικνύει ότι χρησιμοποιώντας αυτό το τεστ βελτιώνεται η κλινική έκβαση ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, αφετέρου διότι χρειάζεται μεγάλη ποσότητα φρέσκου ή κατεψυγμένου ιστού.

1.1.11. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (Minimal Residual Disease, MRD)

Το TNM σύστημα για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού δε μπορεί να εντοπίσει με ακρίβεια την υποομάδα των γυναικών με μικρούς όγκους και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες οι οποίες υποτροπιάζουν και πεθαίνουν από τον καρκίνο του μαστού(8). Γι αυτό πολλοί ερευνητές υπέθεσαν ότι η ανίχνευση μικρομεταστάσεων στο μυελό των οστών (DTCs)(36-38) ή στο περιφερικό αίμα (CTCs)(39-42) μπορεί να συμβάλλει σε καλύτερη πρόγνωση πέρα από το TNM σύστημα. Επιπλέον, τα μικρομεταστατικά κύτταρα τα οποία δεν είναι ανιχνεύσιμα με τις απεικονιστικές και εργαστηριακές εξετάσεις που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή πράξη, όταν ανιχνεύονται μετά από χειρουργική επέμβαση για πρώιμο καρκίνο του μαστού, θεωρείται ότι συμβάλλουν στην υποτροπή της νόσου και γι αυτό είναι οι στόχοι της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Κατά συνέπεια, η μελέτη αυτών των κυττάρων πέρα από την προγνωστική αξία έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης της ασθενούς στη συμπληρωματική θεραπεία .

Ωστόσο οι κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας (ASCO) για τους καρκινικούς δείκτες στον καρκίνο του μαστού θεωρούν ότι τα δεδομένα σήμερα δεν είναι αρκετά, για να προτείνουν την εκτίμηση των DTCs στο μυελό ως απαραίτητη εξέταση για την αντιμετώπιση γυναικών με καρκίνο του μαστού(22). Ομοίως, η ίδια εταιρεία πρότεινε ότι η μέτρηση CTCs δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να τίθεται η διάγνωση καρκίνου του μαστού ούτε θα πρέπει να επηρεάζει οποιαδήποτε θεραπευτική απόφαση σε αυτές τις ασθενείς(22). Ωστόσο, είναι η πρώτη φορά που η εκτίμηση των CTCs/DTCs έχει συμπεριληφθεί στις οδηγίες της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας και το panel θεώρησε ότι τα δεδομένα είναι ενδιαφέροντα και θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω στο μέλλον(22).

Η μελέτη της μικρομεταστατικής νόσου έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης. Η ομάδα του C. Klein έδειξε ότι τα DTCs του μυελού των οστών είχαν πιο πρώιμες γενωμικές αλλαγές σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα του πρωτοπαθούς όγκου. Προτείνει κατ' αυτόν τον τρόπο ότι η διασπορά των καρκινικών κυττάρων είναι πρώιμο φαινόμενο στην ογκογένεση του καρκίνου του μαστού και ότι κατά συνέπεια ακόμη και όταν η διάγνωση γίνει σε πρώιμο στάδιο, θα πρέπει να θεωρείται σε πολλούς ασθενείς ως ήδη συστηματική νόσος(43;44).

1.2. Ορισμός των μικρομεταστατικών κυττάρων: Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα, (Circulating Tumor Cells, CTCs), Διάσπαρτα Καρκινικά Κύτταρα, (Disseminated Tumor Cells, DTCs)

Διάσπαρτα Καρκινικά Κύτταρα, (Disseminated Tumor Cells, DTCs) ορίζονται ως «κρυφά» επιθηλιακά κύτταρα τα οποία ανιχνεύονται στο μυελό των οστών γυναικών με καρκίνο του μαστού. Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα, (Circulating Tumor Cells, CTCs) ορίζονται ως «κρυφά» επιθηλιακά κύτταρα τα οποία ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα γυναικών με καρκίνο του μαστού. Επιθηλιακά κύτταρα ανιχνεύονται σπάνια στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα υγιών γυναικών. Διάφοροι ερευνητές έχουν αποδείξει ότι τα περισσότερα από τα ανιχνεύσιμα επιθηλιακά κύτταρα στο μυελό των οστών(44-46) ή στο περιφερικό αίμα(47) γυναικών με καρκίνο του μαστού είναι καρκινικά κύτταρα.

1.3. Μέθοδοι και περιορισμοί για την ανίχνευση των μικρομεταστατικών κυττάρων

Εξ ορισμού, τα μικρομεταστατικά κύτταρα δεν είναι ανιχνεύσιμα με την καθιερωμένη χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης. Αυτά τα κύτταρα ανιχνεύονται συνήθως μετά από ένα αρχικό στάδιο εμπλουτισμού (διαβαθμιζόμενη φυγοκέντριση με τη χρήση Ficoll/Hyraque, OncoQuick, διήθηση, τεχνικές ανοσομαγνητικού διαχωρισμού, όπως διαχωρισμός κυττάρων με τη χρήση μαγνητικού πεδίου και μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με ειδικά αντισώματα) χρησιμοποιώντας είτε άμεσες μεθόδους, κυρίως μεθόδους που βασίζονται στη χρήση αντισωμάτων (ανοσοκυτταροχημεία, ανοσοφθορισμός,

κυτταρομετρία ροής) είτε έμμεσες μεθόδους, κυρίως μεθόδους που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων (mRNA μεταγράφων με RT-PCR)(42;48-51). Διάφοροι ερευνητές έχουν συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων(52;53). Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων θεωρούνται γενικά πιο ευαίσθητες, ενώ η ανοσοκυτταροχημεία προσφέρει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την εκτίμηση της μορφολογίας των κυττάρων.

Μια τεχνική που βασίζεται στον ανοσοφθορισμό και την κυτταρομετρία ροής αποτελεί τη βάση ενός ημι-αυτοματοποιημένου συστήματος, CellSearch system (Veridex, Warren, New Jersey, USA), το οποίο έχει πρόσφατα εγκριθεί από τον FDA. Το σύστημα αυτό επιτρέπει την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των CTCs. Μετά από ένα αρχικό στάδιο εμπλουτισμού χρησιμοποιώντας σφαιρίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα έναντι του EPCAM (epithelial cell adhesion molecule), ακολουθεί χρώση των EPCAM-θετικών κυττάρων με αντίσωμα ειδικό για τις κυτταροκερατίνες 8,18,19, με αντίσωμα ειδικό για το CD45 και με 4'6-diamidino-2-phenylindole-2 (DAPI)(54). Ως CTC χαρακτηρίζεται ένα κύτταρο θετικό για κυτταροκερατίνη και DAPI αλλά αρνητικό για το CD45.

Έχουν δημοσιευθεί επίσης μέθοδοι με τις οποίες έχει επιτευχθεί ανίχνευση CTCs από ολικό αίμα χωρίς να προηγηθεί άλλο στάδιο εμπλουτισμού παρά μόνο λύση ερυθρών(55;56). Όσον αφορά τον ανοσοφθορισμό η προτιμώμενη μέθοδος ανίχνευσης είναι η αυτοματοποιημένη ψηφιακή μικροσκοπία (automated digital microscopy, ADM). Ωστόσο η μέθοδος αυτή είναι πολύ αργή στη σάρωση. Έχει δημοσιευθεί η χρησιμοποίηση της τεχνολογίας των οπτικών ινών για τη σάρωση

μεγάλων επιφανειών (fiber-optic array scanning technology, FAST), η οποία εφαρμόζει τεχνικές laser-printing για την επίλυση του προβλήματος ανίχνευσης σπάνιων κυττάρων(55). Με την FAST κυτταρομετρία, μπορεί να γίνει διέγερση φθορίζουσών χρωστικών σε 300,000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο, και η εκπομπή φθορισμού συλλέγεται με ένα εξαιρετικά μεγάλο οπτικό πεδίο. Με τον τρόπο αυτό η ταχύτητα σάρωσης είναι 500 φορές μεγαλύτερη από την ταχύτητα σάρωσης με την τεχνική της ADM με παρόμοια ευαισθησία και αυξημένη ειδικότητα(55). Οι ερευνητές προτείνουν τη συνδυασμένη χρήση της τεχνολογίας FAST και της ADM για την ανίχνευση σπάνιων CTCs σε ασθενείς με πρώιμα στάδια καρκίνου(55). Εκτιμάται ότι σε πρώιμα στάδια του καρκίνου, μικρομεταστατικά κύτταρα ανευρίσκονται στην κυκλοφορία σε συγκεντρώσεις 1 μικρομεταστατικό κύτταρο ανά 10^6 ως 10^7 μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος(57). Αν λάβουμε υπόψη μας το κατώτερο όριο ανίχνευσης, χρειαζόμαστε ένα δείγμα με 100 εκκατομύρια αιμοποιητικά κύτταρα, για να ανιχνεύσουμε τουλάχιστο ένα CTC με υψηλή πιθανότητα (99.995%). Για την ανάλυση με ADM ενός τέτοιου δείγματος, ένας κυτταροπαθολόγος θα χρειαζόταν 18 ώρες, για να αναλύσει 3,000–30,000 εικόνες(2–5). Αντίθετα χρησιμοποιώντας την τεχνολογία FAST, μια πρώτη σάρωση 100 εκατομμυρίων κυττάρων καταλήγει σε 1,500 εικόνες, οι οποίες μετά από επανασάρωση με ADM μειώνονται σε 300 και έτσι ο ίδιος κυτταροπαθολόγος χρειάζεται τελικά μόνο 5 min, για να τις αναλύσει. Το πλεονέκτημα με τη χρήση της FAST τεχνολογίας είναι ότι δεν είναι απαραίτητες τεχνικές εμπλουτισμού οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ελαττωμένη ευαισθησία λόγω απώλειας κυττάρων(55).

Μια άλλη μέθοδος έχει προταθεί για την ανίχνευση κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων (Circulating Epithelial Tumor Cells, CETCs) χωρίς να προηγηθεί στάδιο εμπλουτισμού. Αυτή χρησιμοποιεί laser scanning κυτταρομετρητή για την ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων μετά από χρώση με αντισώματα έναντι του EpCAM και CD45 επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες(56).

Πρόσφατα, η Nagrath και συνεργάτες δημοσίευσαν την ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής ('CTC-chip') ικανής για την αποτελεσματική και επιλεκτική απομόνωση ανέπαφων CTCs από ολικό αίμα. Η τεχνολογία βασίζεται στην αντίδραση ανάμεσα σε CTCs και μικροκηλίδες επικαλυμμένες με αντίσωμα έναντι του EpCAM κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ροής, και δεν απαιτεί προηγουμένως σήμανση ή άλλη επεξεργασία των δειγμάτων(58).

Για την ανίχνευση των CTCs/DTCs, διάφοροι δείκτες έχουν επιλεγεί με βάση την έκφρασή τους στα επιθηλιακά αλλά όχι στα μεσεγχυματογενή κύτταρα (epithelial-specific markers) ή με βάση την ειδικότητα της έκφρασής τους στο μαζικό αδένιο (breast tissue-specific markers). Από τους διάφορους δείκτες, αυτός που έχει περισσότερο μελετηθεί είναι οι κυτταροκερατίνες, οι οποίες είναι διάμεσα ινίδια του κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων(59). Οι κυτταροκερατίνες που έχουν μελετηθεί περισσότερο στον καρκίνο του μαστού είναι οι CK8,18,19 .

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί χρησιμοποιώντας είτε τις μεθόδους που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα είτε τις μεθόδους που βασίζονται στα αντισώματα(49). Η επιμόλυνση με γενωμικό DNA κατά τη

διάρκεια της απομόνωσης ολικού RNA, η παράτυπη έκφραση ή επαγωγή της έκφρασης δεικτών CTCs/DTCs σε μονοπύρρηνα ή λεμφοκύτταρα από κυτταροκίνες και η παρουσία ψευδογονιδίων της CK19 έχουν αναφερθεί ως αίτια για ψευδώς θετικά αποτελέσματα, όταν γίνεται χρήση των μεθόδων που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα(49;60-63). Η χρήση ποσοτικής RT-PCR η οποία μερικές φορές μπορεί να ξεχωρίσει χαμηλά επίπεδα παράτυπης έκφρασης από υψηλότερα επίπεδα που παρατηρούνται στον καρκίνο του μαστού καθώς επίσης και ο σχεδιασμός των εκκινητών, ώστε να μην ενισχύουν γενωμικό DNA ή ψευδογονίδια, μπορούν ως ένα βαθμό να λύσουν τα παραπάνω προβλήματα(64). Παρόμοιοι περιορισμοί έχουν περιγραφεί με μεθόδους που βασίζονται στη χρήση αντισωμάτων. Πολλά από τα αντισώματα τα οποία χρησιμοποιούνται για τη χρώση επιθηλιακών κυττάρων ή κυττάρων καρκίνου του μαστού είναι γνωστό ότι περιστασιακά προκαλούν τη χρώση αιμοποιητικών κυττάρων τα οποία έχουν παράτυπη έκφραση κυτταροκερατινών (CK19) ή MUC1. Μη ειδική χρώση πλασματοκυττάρων μπορεί επίσης να συμβεί εξαιτίας της αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης εναντίον των k και λ ελαφρών αλύσεων στην επιφάνεια του κυττάρου. Η βελτιστοποίηση των αντισωμάτων και η χρήση των κατάλληλων αρνητικών δειγμάτων ελέγχου έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των ανωτέρω προβλημάτων.

Η αξιοπιστία του προσδιορισμού καρκινο-σχετιζόμενων μεταγράφων mRNA με RT-PCR και real time RT-PCR για την ανίχνευση των CTCs στο περιφερικό αίμα, μπορεί επίσης να περιοριστεί από τους προαναλυτικούς παράγοντες, όπως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη δειγματοληψία

μέχρι την επεξεργασία του δείγματος, ο χρόνος της ανάλυσης και η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της παραμονής και της επεξεργασίας, τα οποία έχει δειχθεί, ότι επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση (65). Επιπλέον, τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να προκληθεί από τη φλεβοτομή, την επαφή με ξένες επιφάνειες ή ακόμη μετά από έκθεση σε συστατικά από λυμένα κύτταρα, όπως η αιμοσφαιρίνη. Μάλιστα το ενδοκυττάριο RNA μπορεί να αποικοδομηθεί κατά την *ex vivo* παραμονή του αίματος από ειδικές και μη ειδικές ενδογενείς ριβονουκλεάσες (65). Μελέτες που διερεύνησαν την επίπτωση της *ex vivo* επώασης των δειγμάτων αίματος στα επίπεδα έκφρασης πολλών γονιδίων με μικροσυστοιχίες κατέληξαν ότι πολλά γονίδια που εκφράζονται από τα κύτταρα του αίματος είναι πολύ ευαίσθητα στην *ex vivo* επεξεργασία των δειγμάτων. Μάλιστα προτείνουν ότι σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την υποξία και το κυτταρικό στρες μπορεί να ενεργοποιούνται στα δείγματα, των οποίων η επεξεργασία καθυστερεί, ενώ σημαντικοί κυτταρικοί μηχανισμοί, όπως ο κυτταρικός κύκλος, ο πολλαπλασιασμός, η μεταγραφική ρύθμιση και η απόπτωση μπορεί να καταστέλλονται στα δείγματα αυτά(65). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι μεταγραφικές αποκρίσεις στο στρες συμβαίνουν μόλις 2 ώρες μετά την αιμοληψία(65). Κατά την ανίχνευση CTCs στο περιφερικό αίμα, η καθυστέρηση επεξεργασίας των δειγμάτων περιφερικού αίματος – εκτός από αλλαγές στα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των λευκών αιμοσφαιρίων – αυξάνει τις πιθανότητες πρόκλησης απόπτωσης στα CTCs λόγω απομάκρυνσής τους από το *in vivo* μικροπεριβάλλον τους. Κατά συνέπεια, τα δείγματα αίματος και το RNA θα πρέπει να υφίστανται άμεση επεξεργασία μετά τη συλλογή τους,

για να αποφευχθεί η αλλοίωση της *in vivo* γονιδιακής έκφρασης από *ex vivo* αποκρίσεις στο στρες, ιδιαίτερα όταν η ποσότητα του RNA στόχου είναι πάρα πολύ μικρή, όπως ισχύει στην περίπτωση της ανίχνευσης CTCs στο περιφερικό αίμα. Εναλλακτικά, υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kit, όπως το PAXgene (Qiagen), για τη συλλογή, σταθεροποίηση και απευθείας απομόνωση του RNA από ολικό αίμα, τα οποία εξασφαλίζουν σταθεροποίηση του RNA μέχρι και για 5 μέρες μετά τη δειγματοληψία.

1.4. CTCs και διάγνωση του καρκίνου του μαστού

Διάφορες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τη μοριακή ανίχνευση δεικτών μικρομεταστατικών κυττάρων ως εργαλείο για την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού(66;67). Η Reinholz και συνεργάτες σε δημοσίευσή τους διαπίστωσαν ότι η μοριακή ανίχνευση CTCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη μαστογραφία και τη φυσική εξέταση για την πρόωμη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Η μέθοδος που ανέπτυξαν βασίζεται στην ανίχνευση μεταγράφων των γονιδίων mammaglobin-A (MGB1) και B305D-C. Έτσι ανέπτυξαν ένα διαγνωστικό τεστ το οποίο είχε ευαισθησία 70.5% και ειδικότητα 81% για τη διάγνωση καρκίνου του μαστού σε γυναίκες οι οποίες υποβλήθηκαν σε βιοψία για βλάβες του μαστού, ανιχνεύσιμες σε έλεγχο με μαστογραφία(66). Ο Chen και συνεργάτες ανέπτυξαν μια μέθοδο βασισμένη σε συστοιχίες για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών mRNA δεικτών για την διάγνωση του καρκίνου του μαστού(67). Η ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού ήταν 80.6% και 83.8%, αντίστοιχα (67).

1.5. CTCs/DTCs και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού

Η προγνωστική σημασία της ανίχνευσης DTCs και CTCs στον καρκίνο του μαστού έχει μελετηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες (βλ Πίνακα 1)

Πίνακας 1. Προγνωστική σημασία των DTCs και CTCs στον καρκίνο του μαστού

Στάδιο	Ιστός	Μέθοδος εμπλουτισμού	Δείκτης	A/A	Ανίχνευση (%)	Ανεξάρτητη Προγνωστική Αξία	Ref
I-III	BM	Ficoll / ICC	CK	4703	30.6	DFS, DDFS, BCSS, OS	(38)
I-III	BM	Ficoll / ICC	CK	552	36	DMFS, OS	(68)
I-III	BM	Ficoll / ICC	CK	228	12.7	RFS, OS	(69)
I-II ¹	BM	Ficoll / ICC	CK	484	30.8	NR	(70)
I-II	BM	Ficoll / ICC	CK	128	13.3	NR	(71)
I-III	BM	Ficoll / ICC	MUC	727	43.3	DDFS, OS	(36)
I-III	BM	Ficoll / ICC	MUC	350	25	No	(72)
I-III	BM	Ficoll / ICC	CK18, HER2	52	CK+:100 CK+/HER2+:60	OS	(73)
I-III	BM	Ficoll / IF	CK,HER2	137	CK+:34, CK+/HER2+12	NR	(74)
IV	PB	IS	CK	177	49	PFS, OS	(75)
IV	PB	Ficoll / RT-PCR	Multi ²	103	29.1	No	(76)
I-IV	PB	Filtration / ICC	CK8	123	I-III:25 IV:11.6	I-III:No IV:TTP	(77)
I-IV	PB	EL / RT-PCR	Multi ³	65	69	NR	(78)
IV	PB	Ficoll / IS / PCR ELISA	Telomerase	25	84	NR	(79)
I-III	PB	Ficoll / RT-PCR	CK19	148	29.7	DFI , OS	(39)
I-III	PB	Ficoll / RT-PCR	CK19	444	40.8	DFS, OS	(41)
I-II ¹	PB	Ficoll / RT-PCR	CK19	167	21.6	DFS, OS	(40)
I-III	PB	Ficoll / RT-PCR	Multi ⁴	175	44	DFS	(80)
I-III	PB	Ficoll / RT-PCR	MGB1	101	13.9	DFI	(81)
I-II	PB	Ficoll / RT-PCR	HER2	214	21	DFI	(82)
I-III	PB	IS / ICC	CK, HER2	35	48.6	No	(83)
NED	PB BM	Ficoll, IS, ICC	CK	341	CTCs: 10 DTCs:14	NR	(84)
I-IV	PB BM	Ficoll, ICC	CK	114	CTCs: 24.5 DTCs: 59	DTCs for DFS	(85)
I-IV	PB BM	Ficoll, RT-PCR	CK19 MGB1	148	PB:15 BM:28	CK19+DTCs for OS	(86)
I-IV	PB	EL / IS / ICC	CK	75	28	NR	(87)
I-IV	PB	Ficoll / RT-PCR	CK19	109	44	NR	(88)
I-IV	PB	IS / RT-PCR	MUC	94	37	NR	(89)
I-IV	PB	EL / RT-PCR	MGB1	78	24.3	NR	(90)
NED, IV	PB	EL / RT-PCR	MGB1	310 157	NED: 2 IV:29	OS	(91)
I-IV	PB	Ficoll / RT-PCR	EGFRvIII	62	43.5	NR	(92)

A/A: Αριθμός Ασθενών, NED: Απουσία μακροσκοπικά ορατής νόσου, BM: Μυελός των οστών, PB: Περιφερικό Αίμα NR: Δεν έχει δημοσιευθεί, CTCs : Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα, DTCs : Διάσπαρτα Καρκινικά Κύτταρα, MNCs: Μονοπύρηντα Κύτταρα, ICC: Ανοσοϊστοχημεία, IF: Ανοσοφθορισμός, IS:

Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός, EL: Λύση ερυθροκυττάρων, CK: Κυτταροκερατίνη, Muc: Μουκίνη, MGB1: Mammaglobin-A, EGFRvIII: Epidermal Growth Factor Receptor variantIII, I-II¹: Όγκοι με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, Multi-marker²: (CK19, p1B, PS2 and EGP2), Multi-marker³ [human chorionic gonadotropin (hCG), c-Met, 134-N-acetylgalactosaminyl- transferase (GalNAc-T), and tumor-associated antigen (MAGE-A3)], Multi-marker⁴: (CK19, MGB1 and HER2), ⁵: CTCs-θετικοί ασθενείς έχουν τουλάχιστον ένα mRNA marker θετικό, DFS: Επιβίωση Ελεύθερη Νόσου, DDFS: Επιβίωση Ελεύθερη Απομακρυσμένων Μεταστάσεων, BCSS: Επιβίωση Ελεύθερη Καρκίνου του Μαστού, OS: Ολική Επιβίωση, DMFS: Επιβίωση Ελεύθερη Απομακρυσμένων Μεταστάσεων, RF: Επιβίωση Ελεύθερη Υποτροπής, DFI: Διάστημα Ελεύθερο Νόσου, PFS: Επιβίωση Ελεύθερη Προόδου Νόσου, TTP: Χρόνος έως την υποτροπή, RT-PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά από αντίστροφη μεταγραφή, Ct : Cycle threshold (όριο του κύκλου), Nested⁶: Στην περίπτωση της διπλής RT-PCR, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ανιχνεύσιμα και μη ανιχνεύσιμα, Eq: Ισοδύναμα

1.5.1 Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού

Στις περισσότερες μελέτες αναφορικά με την προγνωστική αξία των CTCs στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού έχει χρησιμοποιηθεί το CellSearch system. Η παρουσία ≥ 5 CTCs/7.5mL αίματος σε 177 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (μετρήσιμη νόσος) πριν την έναρξη της θεραπείας, ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (DFS) και για την ολική επιβίωση (OS)(75). Επιπλέον η παρακολούθηση CTCs με το CellSearch προτάθηκε ως ανώτερος δείκτης από τις συνήθεις απεικονιστικές εξετάσεις, για την πρόβλεψη της OS σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού(93). Είναι ενδιαφέρον ότι, όταν η προγνωστική πληροφορία της ανίχνευσης CTCs ήταν γνωστή, η εκτίμηση της πρόγνωσης χρησιμοποιώντας τις απεικονιστικές διαγνωστικές εξετάσεις δεν μπορούσε να βελτιώσει με στατιστικώς σημαντικό τρόπο την πρόγνωση, ενώ, όταν τα αποτελέσματα από τις απεικονιστικές εξετάσεις ήταν διαθέσιμα, η πληροφορία αναφορικά με την ανίχνευση CTCs μπορούσε να διαχωρίσει περαιτέρω τους ασθενείς σε υποομάδες διαφορετικής πρόγνωσης. Επιπλέον, στην ίδια σειρά ασθενών με μετρήσιμο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, η ανίχνευση CTCs σε

διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της θεραπείας σχετίστηκε με ελαττωμένη DFS και OS(94). Ο Hayes και συνεργάτες εκτίμησαν την DFS και την OS σε 4 ομάδες ασθενών, ασθενείς με: (α) <5 CTCs/7.5mL αίματος σε όλες τις αιμοληψίες, (β) ≥ 5 CTCs/7.5mL στην αρχική αιμοληψία και <5 CTCs/7.5mL στην τελευταία αιμοληψία, (γ) <5 CTCs/7.5mL στην αρχική αιμοληψία και ≥ 5 CTCs/7.5mL στην τελευταία αιμοληψία, και (δ) ≥ 5 CTCs/7.5mL σε όλες τις αιμοληψίες. Ασθενείς με ≥ 5 CTCs/7.5mL σε όλες τις αιμοληψίες είχε τη μικρότερη διάμεση DFS και OS σε σχέση με οποιαδήποτε από τις άλλες ομάδες. Ασθενείς των οποίων η συγκέντρωση των CTCs μεταβλήθηκε από ≥ 5 CTCs σε <5 CTCs/7.5mL κατά τη διάρκεια της θεραπείας εμφάνισαν DFS και OS παρόμοια με αυτή των ασθενών στους οποίους τα CTCs δεν ήταν ποτέ αυξημένα. Τέλος, η OS ασθενών των οποίων η συγκέντρωση των CTCs μεταβλήθηκε από <5 CTCs σε ≥ 5 CTCs/7.5mL ήταν ελαττωμένη σε σχέση με την OS ασθενών των οποίων τα CTCs παρέμειναν χαμηλά, αλλά ήταν μεγαλύτερη από την OS των ασθενών που είχαν πάντα ≥ 5 CTCs/7.5 mL. Επιπλέον, οι Cristofanilli και συνεργάτες έδειξαν ότι η ανίχνευση ≥ 5 CTCs/7.5mL ήταν προγνωστικός παράγοντας ελαττωμένης OS σε ασθενείς με ER-θετικό/ HER2-αρνητικό και triple-negative μεταστατικό καρκίνο του μαστού και ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας πέρα από το φορτίο της νόσου(95). Τα δεδομένα για την παρακολούθηση των CTCs με το CellSearch αφορούν κυρίως ασθενείς με μετρήσιμο μεταστατικό καρκίνο του μαστού που ξεκινούν χημειοθεραπεία αλλά όχι ενδοκρινική θεραπεία. Μια άλλη πολυκεντρική μελέτη από διαφορετικούς ερευνητές εξέτασε την αναλυτική ικανότητα του CellSearch σε ασθενείς με

μεταστατικό καρκίνο του μαστού(96). Όταν διπλά δείγματα από 14 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού εξετάσθηκαν σε δύο διαφορετικά μηχανήματα CellSearch και μάλιστα σε δύο διαφορετικά ερευνητικά κέντρα στη Γερμανία, παρατηρήθηκε συμφωνία σε ποσοστό 78.6%. Στις περιπτώσεις όπου υπήρχε ασυμφωνία των αποτελεσμάτων τα δείγματα περιείχαν 2–4 CTCs/7.5mL αίματος. Γι' αυτό το λόγο, μια παρόμοια μελέτη για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας ανάμεσα σε διαφορετικά κέντρα και διαφορετικά CellSearch μηχανήματα σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού είναι αναγκαία, δεδομένου ότι αυτοί οι ασθενείς έχουν χαμηλά επίπεδα CTCs. Για να αποδειχθεί αν η ανίχνευση CTCs μπορεί να βελτιώσει την κλινική έκβαση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, το Southwest Oncology Group (SWOG) έχει ξεκινήσει μια κλινική μελέτη φάσης III (ClinicalTrials.gov NCT00382018). Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να συγκρίνει την αλλαγή χημειοθεραπείας σε σχέση με τη διατήρηση της χημειοθεραπείας σε ασθενείς που έχουν υψηλά επίπεδα CTCs ένα μήνα μετά την έναρξη της χημειοθεραπείας. Διάφοροι ερευνητές έχουν δημοσιεύσει άλλες λιγότερο τυποποιημένες μεθόδους με τη χρήση είτε αντισωμάτων είτε νουκλεϊκών οξέων για την ανίχνευση CTCs/DTCs στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού.(76;77;79;97;98)

1.5.2. Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στον πρώιμο καρκίνο του μαστού

1.5.2.1. DTCs

Αρκετές μελέτες έχουν ερευνήσει την προγνωστική αξία των DTCs στο μυελό των οστών στον πρώιμο καρκίνο του μαστού και αρκετές από αυτές

απέτυχαν να δείξουν την ανεξάρτητη προγνωστική αξία των DTCs, όταν ελέγχθηκαν για τα “γνωστά” χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου(36;37;70-72;99-101). Μια μεταανάλυση στην οποία αναλύθηκαν δεδομένα από 4703 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού μπόρεσε να απαντήσει αξιόπιστα στο παραπάνω ερώτημα(38). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, DTCs ανιχνεύθηκαν σε 30.6% των ασθενών κατά τη διάρκεια της επέμβασης για την αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και η ανίχνευσή τους ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας πτωχής πρόγνωσης. Σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς μικρομεταστατικά κύτταρα στο μυελό, οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα μικρομεταστατικά κύτταρα στο μυελό είχαν μεγαλύτερους όγκους με υψηλότερο βαθμό ιστολογικής κακοήθειας, και επιπλέον είχαν πιο συχνά διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες και ER-αρνητικούς όγκους. Το διάμεσο διάστημα παρακολούθησης των ασθενών χωρίς υποτροπή ήταν 62 μήνες. Κατά την περίοδο αυτή 1192 ασθενείς (25.3%) υποτροπίασαν. Η παρουσία μικρομεταστάσεων ήταν προγνωστικός παράγοντας πτωχής OS και DFS καθώς επίσης και επιβίωσης ελεύθερης απομακρυσμένων μεταστάσεων. Για την υποομάδα των ασθενών χαμηλού κινδύνου με pT1N0 όγκους (n=1036), η παρουσία DTCs σχετίσθηκε με αύξηση του κινδύνου για απομακρυσμένες μεταστάσεις και για θάνατο κατά τη διάρκεια των 5 πρώτων ετών παρακολούθησης(38). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, η παρουσία DTCs ήταν ανεξάρτητος παράγοντας πτωχής πρόγνωσης. Ωστόσο, σύμφωνα με τις ASCO 2007 κατευθυντήριες οδηγίες, τα παραπάνω δεδομένα δεν επαρκούν, ώστε να θεωρηθεί ότι μία ασθενής με ένα μικρό όγκο χαμηλού βαθμού κακοήθειας, με

αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και με ανιχνεύσιμα μικρομεταστατικά κύτταρα στο μυελό των οστών έχει σαφώς χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με μία ασθενή στην οποία δεν ανιχνεύονται αυτά τα κύτταρα, ώστε να δικαιολογείται διαφοροποίηση όσον αφορά τις κατευθυντήριες οδηγίες για συμπληρωματική θεραπεία(22).

Εκτός από την παραπάνω μεταανάλυση στην οποία η προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων εξετάστηκε με λήψη δείγματος μυελού των οστών κατά τη διάρκεια του χειρουργείου αφαίρεσης του πρωτοπαθούς όγκου, ο Janni και συνεργάτες σε μελέτη τους διαπίστωσαν ότι η ανεύρεση DTCs κατά τη διάρκεια του διαστήματος παρακολούθησης σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού ελεύθερες υποτροπής ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη DFS και OS (69).

1.5.2.2. CTCs

Από τους διάφορους δείκτες για την ανίχνευση CTCs, αυτός που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι η Cytokeratin-19 (CK19). Η CK19 είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που εκφράζεται στα επιθηλιακά αλλά όχι στα μεσεγχυματικά κύτταρα και έχει μελετηθεί εκτενώς από τη δική μας ομάδα και από άλλες(51). Το γονίδιο της CK19 έχει εντοπισθεί στο χρωμόσωμα 17 (17q21-q22), συνίσταται από 4667 νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει 6 εξόνια και 5 ιντρόνια, ενώ το mRNA της αποτελείται από 1360 νουκλεοτίδια. Επίσης, έχουν βρεθεί και δύο ψευδογονίδια της CK19, το CK19a(102) και το CK19b(103) τα οποία εμφανίζουν ομολογία με το γονίδιο της CK19 κατά 90% και 85%, αντίστοιχα. Η CK19 πρωτεΐνη αποτελείται από 400 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 44098D.

Η Σταθοπούλου και συνεργάτες σε δημοσίευση τους διαπίστωσαν ότι η ανίχνευση με διπλή RT-PCR CK19mRNA-θετικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα γυναικών με πρώιμο καρκίνο του μαστού ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας ελαττωμένης DFS και OS. Αργότερα οι ίδιοι ερευνητές ανέπτυξαν μια realtime RT-PCR για την ποσοτικοποίηση των CK19mRNA μεταγράφων(104). Ο Ξενίδης και συνεργάτες χρησιμοποίησαν αυτήν τη μέθοδο και ανίχνευσαν CK19mRNA-θετικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα σε ποσοστό 21.6% από 167 ασθενείς με αρνητικούς μασχαλαίους λεμφαδένες πριν από την χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Η παρουσία αυτών των κυττάρων ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μειωμένης DFS και OS (40). Σε μια σειρά 444 γυναικών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, ο Ιγνατιάδης και συνεργάτες ανίχνευσαν CK19mRNA-θετικά κύτταρα με την ίδια RT-PCR πραγματικού χρόνου στο περιφερικό αίμα σε ποσοστό 40.8% ασθενών πριν τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας(41). Η παρουσία αυτών των κυττάρων ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μειωμένης DFS και OS. Επιπλέον, ο Ξενίδης και συνεργάτες έδειξαν ότι CK19mRNA-θετικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν μετά τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας σε ποσοστό 32.7% από 450 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και η παρουσία τους ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μειωμένης DFS και OS(105). Διάφοροι ερευνητές έχουν δημοσιεύσει για τη μοριακή ή ανοσοϊστοχημική ανίχνευση CTCs χρησιμοποιώντας τις κυτταροκερατίνες ως δείκτη (87;88).

Στη μελέτη SUCCESS, >1 CTCs/23mL (μέσος όρος 13, εύρος 2-827), περιφερικού αίματος ανιχνεύθηκε με το CellSearch System σε ποσοστό 9.6%

από 1767 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και υψηλού κινδύνου ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες(106). Από τους 852 ασθενείς με λήψη αίματος πριν από την έναρξη της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας και μετά την ολοκλήρωσή της, 11% είχαν >1CTCs/23mL πριν την έναρξη της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας (μέσος όρος 7, εύρος 2-166), ενώ 7% των ασθενών είχαν >1CTCs/23mL μετά την ολοκλήρωσή της (μέσος όρος 6, εύρος 2-84). Από τους ασθενείς, που ήταν αρχικά CTCs-θετικοί, 10% παρέμειναν θετικοί (n=9) και 90% ήταν CTCs-αρνητικοί μετά τη χημειοθεραπεία (n=82). Εξαιτίας του μικρού διαστήματος παρακολούθησης, τα δεδομένα για την προγνωστική αξία της ανίχνευσης CTCs δεν έχουν ακόμη δημοσιευθεί. Αντίθετα με το μεταστατικό καρκίνο του μαστού, δεν έχει ακόμη καθοριστεί το cut-off, προκειμένου ένας ασθενής με πρώιμο καρκίνο του μαστού να θεωρηθεί ως CTCs-θετικός, όταν υποβληθεί στη δοκιμασία ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων με το CellSearch σύστημα.

Μια άλλη μέθοδος έχει προταθεί για την ανίχνευση κυκλοφορούντων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων (Circulating Epithelial Tumor Cells, CETCs). Αυτή χρησιμοποιεί laser scanning κυτταρομετρητή για την ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων μετά από χρώση με EpCAM και CD45 φθορίζον αντίσωμα αντίστοιχα. Ο αριθμός των CETCs που ανιχνεύθηκαν ανά mL ήταν 0-100.000. Δεν ανιχνεύθηκαν επιθηλιακά κύτταρα σε 97% από υγιείς εθελοντές και σε 38 από 40 ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Με την ανωτέρω μέθοδο, CETCs ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ασθενείς από μια σειρά 91 ασθενών με

πρώιμο καρκίνο του μαστού. Οι αριθμοί των CETCs αναλύθηκαν πριν την έναρξη συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, πριν από κάθε νέο κύκλο χημειοθεραπείας, και πριν το τέλος της χημειοθεραπείας. Τρεις τύποι απάντησης σε χημειοθεραπεία παρατηρήθηκαν:

- α. Ελάττωση στον αριθμό των κυττάρων (>10 φορές)
- β. Οριακές αλλαγές στον αριθμό των κυττάρων (<10 φορές) και
- γ. Αύξηση ή ελάττωση με επακόλουθη αύξηση (>10 φορές) στον αριθμό των CETCs.

Είκοσι υποτροπές (22%) παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των 40 μηνών του διαστήματος παρακολούθησης, με μια υποτροπή στην ομάδα 1 (28 ασθενείς), 5 υποτροπές στην ομάδα 2 (30 ασθενείς), και 14 υποτροπές στην ομάδα 3 (33 ασθενείς). Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς που είχαν ελάττωση των κυττάρων και σε αυτούς που είχαν αύξηση των κυττάρων(107).

1.5.2.3. CTCs ή DTCs

Σε σχέση με τη αναρρόφηση μυελού των οστών, η λήψη περιφερικού αίματος είναι πιο εύκολη και πιο αποδεκτή από τους ασθενείς και τους θεράποντες ιατρούς. Γι αυτό είναι σημαντικό, κατά πόσο η λήψη περιφερικού αίματος μπορεί να αντικαταστήσει την αναρρόφηση μυελού των οστών για την εκτίμηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου. Ο Wiedswang και συνεργάτες συνέκριναν την προγνωστική αξία των CTCs με αυτή των DTCs χρησιμοποιώντας ανοσοκυτταροχημεία σε 341 ασθενείς με καρκίνο του μαστού στους οποίους η λήψη του μυελού και του αίματος έγινε μετά από ένα διάμεσο

διάστημα παρακολούθησης 40 μηνών μετά την αρχική επέμβαση(84).Δείγματα περιφερικού αίματος αλλά όχι μυελού των οστών υποβλήθηκαν σε αρνητικό ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό (αναλύθηκαν 10×10^6 μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος έναντι 2×10^6 μονοπύρηνων κύτταρων μυελού των οστών). Παρ' ότι και τα CTCs (10% των ασθενών) και τα DTCs (14% των ασθενών) συσχετίστηκαν σημαντικά με την κλινική έκβαση, τα DTCs είχαν μεγαλύτερη προγνωστική αξία από τα CTCs(84). Ο Pierga και συνεργάτες συνέκριναν την ανίχνευση κυτταροκερατίνης-θετικών CTCs και DTCs με ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης σε 114 ασθενείς με καρκίνο του μαστού(85). Συνολικά 3-5mL μυελού των οστών και 7-14mL αίματος έχουν ληφθεί από κάθε ασθενή και τελικά 3×10^6 μονοπύρρηνα κύτταρα που απομονώθηκαν με Ficoll (3 slides για κάθε ασθενή και για κάθε δείγμα μυελού των οστών και δείγμα περιφερικού αίματος) υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημεία με αντισώματα έναντι της CK 8, 18, and 19 για την παρουσία CTCs και DTCs, αντίστοιχα. Στους μη-μεταστατικούς ασθενείς ($n = 75$), η παρουσία DTCs αλλά όχι CTCs ήταν προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένη DFS (85). Σε μια άλλη μελέτη οι Benou και συνεργάτες χρησιμοποίησαν 9mL περιφερικού αίματος και 9mL μυελού των οστών για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων με Ficoll. Εν συνεχεία έγινε απομόνωση RNA και τελικά για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκαν 2μg ολικού RNA. Δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών έχουν συλλεγεί από 148 ασθενείς με πρώιμο ($n=116$) και μεταστατικό ($n=32$) καρκίνο του μαστού πριν την έναρξη οποιασδήποτε τοπικής ή συστηματικής θεραπείας. Το μέσο διάστημα παρακολούθησης ήταν 786 ημέρες.

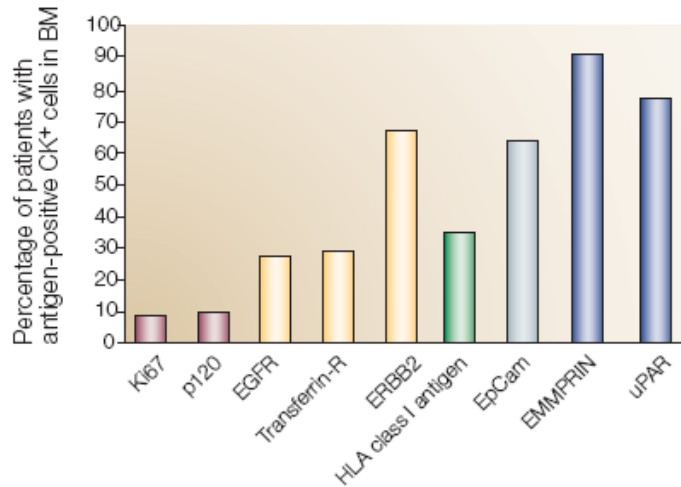
Χρησιμοποιώντας φυσιολογικούς εθελοντές καθώς και ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες ως ομάδα ελέγχου, βρέθηκε αυξημένη έκφραση της CK19 σε 42 (28%) δείγματα μυελού των οστών και σε 22 (15%) δείγματα περιφερικού αίματος. Η έκφραση της mammaglobin-A ήταν αυξημένη σε 20% δειγμάτων μυελού των οστών και περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού. Ασθενείς με αυξημένη έκφραση είτε της CK19 είτε της mammaglobin-A στο μυελό των οστών αλλά όχι στο περιφερικό αίμα είχαν χειρότερη OS(86). Αν και οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι τα DTCs έχουν ανώτερη προγνωστική αξία από τα CTCs στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, δεν έχουν ποτέ συγκριθεί στην ίδια σειρά ασθενών οι καλύτερες τεχνικές για την ανίχνευση DTCs στο μυελό (ανοσοκυτταροχημεία(38) και CTCs στο περιφερικό αίμα (π.χ real-time RT-PCR για τη CK19(40;41;64;104)).

1.5.3. Ανίχνευση CTCs/DTCs στον πρώιμο καρκίνο του μαστού: έχει πάντα προγνωστική σημασία;

Περίπου 30%-50% των ασθενών με καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα μικρομεταστατικά κύτταρα θα αναπτύξουν κλινικά εμφανείς μεταστάσεις με ένα διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 62 μηνών για αυτούς που δεν έχουν πεθάνει(38). Ταυτόχρονα ακόμη και ασθενείς χωρίς DTCs υποτροπιάζουν και πεθαίνουν από καρκίνο του μαστού(38). Ταυτόχρονα, μόνο 30% από τους ασθενείς με CK19mRNA-θετικά κύτταρα υποτροπιάζουν, ενώ μόνο 15% των ασθενών στους οποίους τα ανωτέρω κύτταρα δεν ανιχνεύονται υποτροπιάζουν και πεθαίνουν από καρκίνο του μαστού μετά από ένα διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 5 ετών(41). Όσον αφορά το γεγονός ότι ασθενείς χωρίς

ανιχνεύσιμα DTCs/CTCs υποτροπιάζουν, αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε πρόβλημα κατά τη λήψη του δείγματος (sampling error) ή μπορεί να αποδοθεί στην μη ικανοποιητική ευαισθησία των κυτταροκερατινών ως δείκτη για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων. Πράγματι, η διασπορά των καρκινικών κυττάρων έχει σχετισθεί με την epithelial-mesenchymal transition, EMT και με την απώλεια των επιθηλιακών δεικτών(108). Αντιθέτως, όσον αφορά τους ασθενείς με ανιχνεύσιμα DTCs/CTCs που δεν υποτροπιάζουν, αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ανίχνευση αποπτωτικών κυττάρων, ή κυττάρων που δε μπορούν να αυτοπολλαπλασιαστούν και επιπλέον στην περίπτωση των DTCs του μυελού των οστών, αυτό μπορεί να αποδοθεί στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο στρώμα του μυελού των οστών και τα DTCs που μπορεί να ευνοήσουν την ανάπτυξη ή όχι κλινικά εμφανών μεταστάσεων(109). Επιπλέον μελέτες με μικροσυστοιχίες και συγκριτικό γενωμικό υβριδισμό (Comparative Genomic Hybridization, CGH) έχουν δείξει ότι ο καρκίνος του μαστού είναι μια γενετικά ετερογενής νόσος (23;33) και ότι DTCs προερχόμενα από ένα δεδομένο ασθενή με καρκίνο του μαστού χωρίς κλινικά εμφανή μετάσταση (στάδιο M0) είναι γενετικά ετερογενή(46). Αυτή η ετερογένεια ελαττώθηκε σημαντικά με την κλινική εμφάνιση μεταστάσεων(110). Η εικόνα 1 δείχνει ανάγλυφα την ετερογένεια των μικρομεταστατικών κυττάρων(50). Αντισώματα έναντι κυτταροκερατινών, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση DTCs έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αντισώματα εναντίον αντιγόνων καρκινικών κυττάρων για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των μικρομεταστατικών κυττάρων. Όπως φαίνεται τα DTCs εκφράζουν σε ποσοστό ως 10% αντιγόνα που σχετίζονται με τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό, σε ποσοστό 35% το HLA-1 αντιγόνο, σε ποσοστό 70% το αντιγόνο cERB2 και το uPAR.



Εικ 1. Το ποσοστό των ασθενών με κυτταροκερατίνη θετικά κύτταρα που εκφράζουν μια συγκεκριμένη ογκοπρωτεΐνη φαίνεται στον άξονα y, ενώ στον άξονα x απεικονίζονται αντιγόνα ογκοπρωτεϊνών. Το χρώμα των στηλών καθορίζει σε ποιά λειτουργική κατηγορία ανήκει το συγκεκριμένο αντιγόνο. Έτσι, με ρόζ χρώμα απεικονίζονται τα αντιγόνα που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με κίτρινο χρώμα οι αυξητικοί υποδοχείς, με πράσινο τα αντιγόνα που σχετίζονται με την ανοσιακή απάντηση, με γκρί τα μόρια πρόσδεσης και με μπλε οι πρωτεάσες και οι σχετιζόμενες με πρωτεΐνες πρωτεάσες. EGFR, epidermal growth factor receptor υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα; EMMPRIN, extracellularmatrix metalloproteinase inducer; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule επιθηλιακό μόριο προσκόλλησης; HLA, human leukocyte antigen Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο; transferrin-R, transferrin receptor υποδοχέας τρανσφερίνης; uPAR, urokinase-type plasminogen activator receptor, υποδοχέας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του τύπου της ουροκινάσης. (Αναδημοσίευση από το Pantel et al. Nat Rev Cancer 2004; 4:448-456).

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες προσεγγίσεις για την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης CTCs καθώς επίσης και για την ανίχνευση υποπληθυσμών CTCs με επιθετική βιολογική συμπεριφορά, οι οποίοι θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιο ειδικοί δείκτες για την πρόγνωση υποτροπής:

1.5.3.1. Χρήση άλλων δεικτών εκτός από τις κυτταροκερατίνες για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων

Διάφοροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικούς δείκτες για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων, όπως οι mucins, mammoglobin-A (MGB1), maspin, καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), HER2, EGFRvIII, cathepsin D, survivin, TWIST1(81;82;89-92;111-116). Παρακάτω θα αναλυθούν περισσότερο διεξοδικά δύο δείκτες, η mammoglobin-A (MGB1) και το HER2, οι οποίοι μαζί με την CK19 αποτέλεσαν τους τρεις δείκτες με βάση τους οποίους έγινε η ανίχνευση των CTCs στην παρούσα διατριβή.

1.5.3.1.1. HER2

Το HER2 γονίδιο στον καρκίνο του μαστού έχει δείχθει ότι σχετίζεται με αντίσταση στη θεραπεία και ελαττωμένη επιβίωση (117-119). Ταυτόχρονα η έκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο έχει χρησιμοποιηθεί ως προβλεπτικός δείκτης για ανταπόκριση στη θεραπεία με trastuzumab. Το γονίδιο του HER2 έχει εντοπισθεί στο χρωμόσωμα 17 (17q21.1), συνίσταται από 28661 νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει 27 εξόνια και 26 ιντρόνια, ενώ το μέγεθος του μεταγράφου είναι 4624bp. Η HER2 πρωτεΐνη αποτελείται από 1255 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 137,910 D.

Έκφραση του mRNA του HER2 στο μυελό των οστών

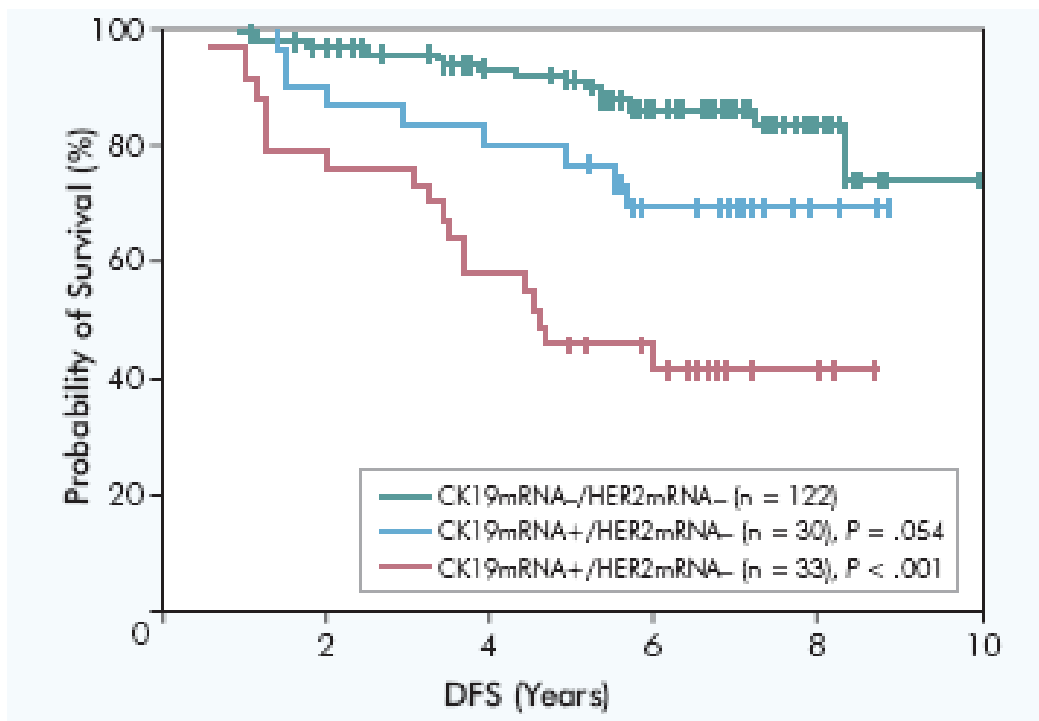
Ο Braun και συνεργάτες εξέτασαν 4×10^5 μονοπύρηνια κύτταρα ανά ασθενή μετά από επεξεργασία μυελού με διαβαθμισμένη φυγοκέντριση Ficoll. Οι ερευνητές αυτοί δημοσίευσαν πρώτοι ότι το HER2 συνεκφράζονταν σε 31 από τις 52 γυναίκες με ανιχνεύσιμα CK18-θετικά DTCs(73). Οι ασθενείς με HER2-θετικά

DTCs είχαν σημαντικά ελαττωμένη OS σε σχέση με ασθενείς με HER2-αρνητικά DTCs(73). Ο Solomayer και συνεργάτες ξεκίνησαν από 10-20mL μυελού των οστών και αφού απομόνωσαν μονοπύρηνια κύτταρα με διαβαθμισμένη φυγοκέντριση με Ficoll, χρησιμοποίησαν διπλό ανοσοφθορισμό με αντίσωμα έναντι παγκυτταροκερατίνης και anti-HER2 και ανέφεραν HER2-θετικότητα σε 20 από 46 ασθενείς με κυτταροκερατίνη θετικά DTCs(74).

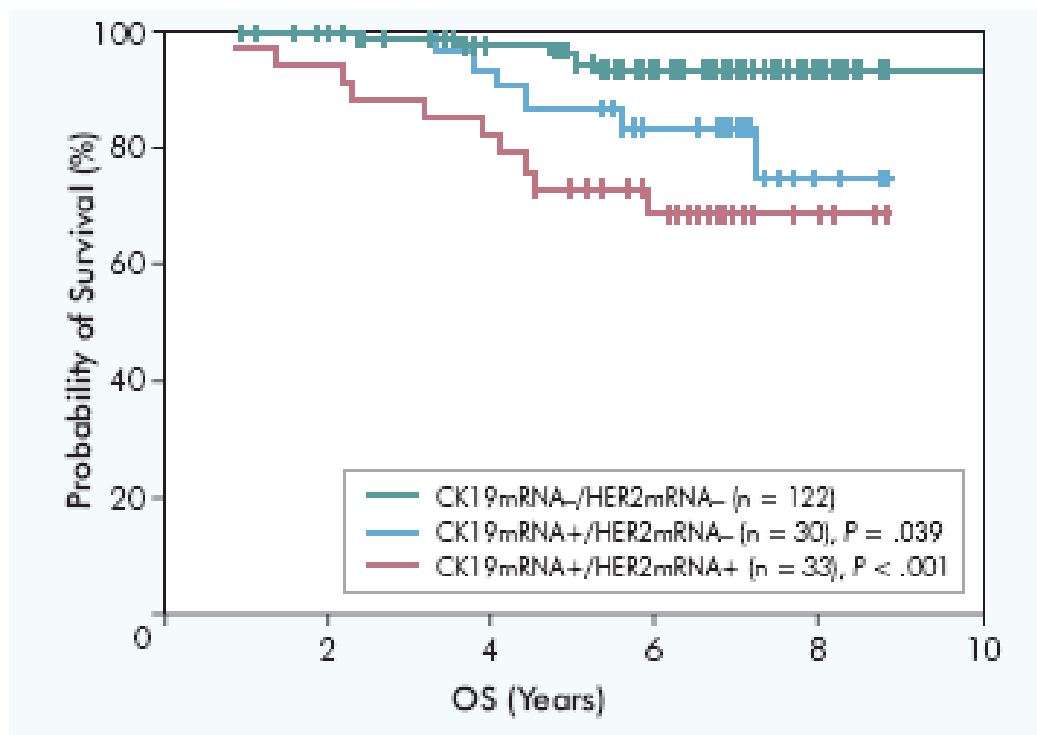
Έκφραση του mRNA του HER2 στο περιφερικό αίμα

Ο Wulfing και συνεργάτες χρησιμοποίησαν 50mL περιφερικού αίματος ανά ασθενή σε συνδυασμό με διαβαθμισμένη φυγοκέντριση και ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και στη συνέχεια διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση με αντισώματα έναντι της κυτταροκερατίνης και του HER2 για την ταυτοποίηση HER2-θετικών CTCs σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι η παρουσία HER2-θετικών CTCs σχετίστηκε με ελαττωμένη DFS και OS σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία και ενδοκρινική θεραπεία(83). Η Αποστολάκη και συνεργάτες ξεκίνησαν από 20mL περιφερικό αίμα και μετά απομόνωση μονοπυρήνων με Ficoll, εφάρμοσαν διπλή RT-PCR, για να ανιχνεύσουν HER2mRNA-θετικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα σε 21% από 214 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού μετά το τέλος της χορήγησης συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Η ανίχνευση τους ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένη DFS(82). Επιπλέον δείξαμε ότι η ταυτόχρονη ανίχνευση CK19mRNA και HER2 mRNA-θετικών κυττάρων πριν την χορήγηση συμπληρωματικής

χημειοθεραπείας σε 185 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για DFS (120). Συνολικά, 63 (34%) από τους 185 ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά κύτταρα και 33 (52.3%) από αυτούς είχαν επίσης ανιχνεύσιμα HER2mRNA-θετικά κύτταρα. Ασθενείς με CK19mRNA+ / HER2mRNA+ κύτταρα είχαν μικρότερη DFS αλλά όχι OS σε σχέση με τους CK19mRNA+ / HER2mRNA- ασθενείς (Εικόνα 2 και 3).



Εικ 2. Επιβίωση ελεύθερη νόσου σε ομάδες ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με βάση τη μοριακή ανίχνευση CK19mRNA+ και HER2mRNA+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα. (Αναδημοσίευση από το Ignatiadis et al Clin Breast Cancer 2007; 7: 883-889).



Εικ 3. Ολική επιβίωση σε ομάδες ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με βάση τη μοριακή ανίχνευση CK19mRNA+ και HER2mRNA+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα. (Αναδημοσίευση από το Ignatiadis et al Clin Breast Cancer 2007; 7: 883-889).

1.5.3.1.2.Mammaglobin-A

Η mammaglobin-A έχει περιγραφεί για πρώτη φορά ως μια νέα πρωτεΐνη η οποία κωδικοποιείται από ένα νέο c-DNA που απομονώθηκε από πρωτοπαθές ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα του μαστού και εκφράζεται σε διαφορετικό βαθμό σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου μαζικού αδένα(121). Η πρωτεΐνη είναι ομόλογη με αρκετές εκκρινόμενες επιθηλιακές πρωτεΐνες, και κατατάσσεται ως μέλος της οικογένειας της μητροσφαιρίνης (uteroglobin gene family)(121). Ο Watson και συνεργάτες δεν διαπίστωσαν έκφραση της μαστοσφαιρίνης σε άλλους ιστούς, όπως ωοθήκη, μήτρα, πνεύμονα, πλακούντα(121). Έτσι η τελευταία θεωρείται πρωτεΐνη ειδική για το μαζικό αδένα. Η λειτουργία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη διαδικασία της ογκογένεσης του καρκίνου του μαστού είναι ακόμη αδιευκρίνιστη. Η mammaglobin A (SCGB2A2) και η lipophilin B (SCGB1D2), είναι δύο μέλη της υπεροικογένειας των secretoglobins οι οποίες συνεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού και θεωρούνται πρωτεΐνες ειδικές του μαζικού αδένα. Το γονίδιο της mammaglobin-A, συνίσταται από 2998 νουκλεοτίδια, περιλαμβάνει 3 εξόνια και 2 ιντρόνια, ενώ το mRNA της αποτελείται από 502 νουκλεοτίδια. Το γονίδιο της mammaglobin-A έχει εντοπισθεί με φθορίζοντα in situ υβριδισμό (FISH) στο χρωμόσωμα 11 band q13. Ο Watson και συνεργάτες εξέτασαν το ρόλο που παίζει ο υποκινητής του γονιδίου (1000bp) στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στους μαστικούς καρκινικούς όγκους και στις κυτταρικές καρκινικές σειρές. Η μεταγραφική αυτή περιοχή εκκίνησης βρέθηκε ότι είναι ίδια τόσο στις μαστικές καρκινικές κυτταρικές σειρές που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης mammaglobin-A, όσο και σε εκείνες

που δεν εμφανίζουν. Οι ερευνητές θεωρούν ότι τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στη διαπίστωση ότι η υπερέκφραση της mammapglobin-A στον καρκίνο του μαστού επιτελείται μετά από πολύπλοκο μεταγραφικό έλεγχο σε πιο απομακρυσμένες αλληλουχίες (πέρα από τα 1000bp που εξετάστηκαν)(122). Παρ' όλα αυτά όμως η ίδια ομάδα ερευνητών δεν μπόρεσε να αποδείξει ότι τα στεροειδή, όπως η οιστραδιόλη, τα ανδρογόνα, η προγεστερόνη και η δεξαμεθαζόνη (dexamethasone) επηρεάζουν την μεταγραφή της mammapglobin-A. Τελευταία έχει αποδειχθεί ότι τα PEA3, AP-1, και μια μοναδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία συμμετέχουν στην μεταγραφική ρύθμιση της mammapglobin-A(123). Η πρωτεΐνη mammapglobin A αποτελείται από 93 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος είναι 10,499D.

Έκφραση της Mammapglobin-A σε πρωτοπαθή όγκο καρκίνου του μαστού

Ο Watson και συνεργάτες μελέτησαν την έκφραση της πρωτεΐνης της mammapglobin-A με ανοσοϊστοχημεία στον πρωτοπαθή όγκο και την συσχέτισαν με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας(124). Θετικά βρέθηκαν 81/100 (81%) δείγματα μαστικών καρκινικών όγκων, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας. Οι Núñez-Villar και συνεργάτες μελέτησαν 128 φρέσκα/κατεψυγμένα δείγματα πρωτοπαθούς όγκου από ασθενείς με καρκίνο του μαστού με την μέθοδο της RT-PCR και ποσοτικοποίησαν την έκφραση του mRNA της mammapglobin-A (125). Σε μονοπαραγοντική ανάλυση, υψηλή έκφραση της mammapglobin-A (πάνω από τη διάμεση τιμή των δειγμάτων που εξετάστηκαν) συσχετίστηκε σημαντικά ($P<0.05$) με την έκφραση του ER και του PR, με χαμηλή τιμή Ki67, με χαμηλό βαθμό

ιστολογικής κακοήθειας και με την απουσία διήθησης των μασχαλιαίων λεμφαδένων($P=0.058$). Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η αυξημένη έκφραση mammaglobin-A σχετίστηκε με λιγότερο επιθετικό φαινότυπο του καρκίνου του μαστού(125). Σε πρόσφατη δημοσίευση μελετήθηκαν τα επίπεδα της έκφρασης του mRNA της mammaglobin-A με real-time RT-PCR σε φρέσκα/κατεψυγμένα δείγματα πρωτοπαθούς όγκου από 280 ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού(126). Διαπιστώθηκε ότι υψηλά επίπεδα έκφρασής της στον πρωτοπαθή όγκο σχετίζονται με όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας, με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και ότι η έκφρασή της έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία για το ελεύθερο νόσου διάστημα, ιδιαίτερα στις ασθενείς που έλαβαν συμπληρωματική ορμονοθεραπεία με ταμοξιφαίνη.

Έκφραση της Mammaglobin-A σε άλλους καρκινικούς ιστούς

Ο Grunewald και συνεργάτες βρήκαν ότι η έκφραση του mRNA της mammaglobin-A με nested RT-PCR δεν περιοριζόταν μόνο στο φυσιολογικό μαστικό αδένιο και τον καρκίνο του μαστού, αλλά παρατηρήθηκε και σε καρκίνο των ωοθηκών, του ενδομητρίου, του τραχήλου ακόμη και σε περιπτώσεις καλοήθους υπερπλασίας και καρκίνου του προστάτη. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε έκφραση της mammaglobin-A σε κανένα από τα δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών από υγιείς εθελοντές και ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες(127). Ο Zafrakas και συνεργάτες ανέλυσαν την έκφραση των δύο αυτών γονιδίων σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων όγκων ($n = 309$) και αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών ($n = 309$), για να εκτιμήσουν την ειδικότητα της ιστοικής τους έκφρασης. Και τα δύο γονίδια βρέθηκε ότι

εκφράζονται σημαντικά εκτός από τον καρκίνο του μαστού και σε όγκους του γυναικείου γεννητικού συστήματος, π.χ καρκίνο του ενδομητρίου, των ωοθηκών και του τραχήλου(128).

Έκφραση της Mammaglobin-A στους μασχαλιαίους λεμφαδένες

Διάφορες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τη mammaglobin-A μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλους δείκτες για την ανίχνευση μικρο- ή μακρομεταστατικής νόσου στους λεμφαδένες (129-136). Υπάρχει μια εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί real-time RT-PCR για την ενίσχυση του mRNA της mammaglobin-A και της CK 19 [GeneSearch Breast Lymph Node (BLN) Assay, Veridex LLC, Warren, NJ] με σκοπό την ανίχνευση μεταστάσεων στον λεμφαδένα φρουρό (sentinel lymph node, SLNs) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Βρέθηκε ότι η ευαισθησία της μεθόδου αυτής ήταν συγκρίσιμη με αυτήν της ιστοπαθολογικής εξέτασης του SLN, όταν αναλύθηκε με διαδοχικές τομές 1.5 με 2 mm(136). Η μέθοδος αυτή μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές προεκτάσεις, καθώς επιτρέπει να εξετασθεί κατά τη διάρκεια του χειρουργείου μέσα σε 30' αν υπάρχει διήθηση του λεμφαδένα φρουρού και έτσι ο χειρουργός μπορεί να αποφασίσει διεγχειρητικά αν θα προχωρήσει ή όχι σε λεμφαδενικό καθαρισμό της μασχάλης. Αντίθετα η ιστοπαθολογική εξέταση του λεμφαδένα φρουρού μπορεί να γίνει μόνο μετεγχειρητικά.

Έκφραση του mRNA της Mammaglobin-A στο μυελό των οστών

Διάφοροι ερευνητές έχουν ανιχνεύσει το mRNA της mammaglobin-A στο μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού. Ο Ooka και συνεργάτες

ανέλυσαν 111 δείγματα μυελού των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιώντας την PCR σε πραγματικό χρόνο για την ενίσχυση του mRNA της mammapglobin-A. Μονοπύρηννα κύτταρα απομονώθηκαν με διαβαθμιζόμενη φυγοκέντριση χρησιμοποιώντας το Lymphprep και μετά την απομόνωση ολικού RNA, 1 μg από αυτό χρησιμοποιήθηκε για σύνθεση cDNA. Οι ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί (29,7%) στο συγκεκριμένο γονίδιο, είχαν υψηλότερη πιθανότητα να υποτροπιάσουν. Στην παραπάνω μελέτη, η ανεύρεση μικρομεταστάσεων στο μυελό των οστών με τη χρήση της mammapglobin-A ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένη DFS. Μία άλλη μελέτη που παρουσιάζει υψηλό ποσοστό θετικότητας τόσο σε δείγματα μυελού των οστών όσο και σε δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, είναι αυτή των Bossolasco και συνεργατών του(137). Οι ερευνητές αυτοί χρησιμοποιώντας διπλή PCR, ανίχνευσαν έκφραση της mammapglobin-A στο 23,7% των δειγμάτων.

Έκφραση του mRNA της Mammapglobin-A στο περιφερικό αίμα

Η ανίχνευση του mRNA της mammapglobin-A, ως δείκτη μικρομετάστασης στο περιφερικό αίμα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές(90;111;138-143). Πρώτος ο Zach και συνεργάτες ανίχνευσαν το mRNA της mammapglobin-A στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Ξεκίνησαν από 10mL αίματος και μετά από λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων απομόνωσαν ολικό RNA. Διαλύματα RNA, ξεκινώντας από 5mL περιφερικού αίματος, χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση cDNA ανεξάρτητα από την ολική ποσότητα του RNA. Στη συνέχεια οι ερευνητές

εφάρμοσαν nested PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της mammaglobin-A. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της μεθόδου τους ήταν 1 SKBR5 κύτταρο σε 10^6 - 10^7 λευκά αιμοσφαίρια. Όσον αφορά την ειδικότητα κανένα από 27 φυσιολογικά άτομα και 39 από 41 ασθενείς με διάφορες κακοήθειες, εκτός από καρκίνο του μαστού, δεν είχαν ανιχνεύσιμο mRNA της mammaglobin-A στο περιφερικό αίμα. Οι παραπάνω ερευνητές εξέτασαν την προγνωστική αξία της μεθόδου τους σε μια σειρά δειγμάτων περιφερικού αίματος από 143 ασθενείς με καλοήθεις παθήσεις του μαστού και από 467 γυναίκες με καρκίνο του μαστού(91). Κανένας από τους ασθενείς με καλοήθη πάθηση του μαστού δεν ήταν θετικός για τη mammaglobin-A, ενώ θετικοί για mammaglobin-A ήταν 5/310 (2%) ασθενείς με καρκίνο του μαστού αλλά χωρίς μακροσκοπικά ορατή νόσο κατά την εισαγωγή τους στη μελέτη καθώς και 46 από τους 157 (29%) ασθενείς με μεταστατική νόσο(91). Η ανίχνευση της mammaglobin-A είχε προγνωστική αξία τόσο στους ασθενείς χωρίς μακροσκοπικά ορατή νόσο όσο και σε αυτούς με μεταστατική νόσο. Μάλιστα στους ασθενείς με μεταστατική νόσο ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας κακής πρόγνωσης(91).

Αργότερα η Silva και συνεργάτες ανέπτυξαν με τη σειρά τους nested RT-PCR για την ανίχνευση της mammaglobin-A(90). Ξεκίνησαν από 5mL αίματος και μετά από λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων απομόνωσαν ολικό RNA. Στη συνέχεια έγινε σύνθεση cDNA ξεκινώντας από 1.5μg ολικού RNA. Χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά T47D το όριο ανίχνευσης ήταν ένα καρκινικό κύτταρο σε 10^6 αιμοποιητικά κύτταρα. Η mammaglobin-A δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα αιμοποιητικό δείγμα από 43 ασθενείς με αιματολογικές

κακοήθειες, από 14 ασθενείς με συμπαγείς όγκους πλην καρκίνου του μαστού και από 33 φυσιολογικούς εθελοντές. Πρόσφατα η παραπάνω ομάδα δημοσίευσε δεδομένα ανίχνευσης της mammaglobin-A σε 321 ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίοι έλαβαν (νεο)συμπληρωματική χημειοθεραπεία(144). Διαδοχικά δείγματα αίματος είχαν ληφθεί από τους παραπάνω ασθενείς πριν την χορήγηση χημειοθεραπείας και κατά τη διάρκεια του διαστήματος παρακολούθησής τους. Μετά από διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 43 μηνών, 59 ασθενείς ανέπτυξαν μετάσταση και 32 πέθαναν από τη νόσο. Σε 278 ασθενείς με διαθέσιμα δείγματα αίματος πριν τη χορήγηση χημειοθεραπείας, η ανίχνευση του mRNA της mammaglobin-A δεν σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Παραδόξως, διαπίστωσαν ότι ασθενείς οι οποίοι ήταν τουλάχιστο μια φορά θετικοί για τη mammaglobin A είχαν καλύτερη DFS σε σχέση με τους ασθενείς οι οποίοι ήταν συνεχώς αρνητικοί για τη mammaglobin-A, αντίθετα με την αρχική υπόθεση της μελέτης(144).

Εκτός από τις παραπάνω μελέτες, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν ανακοινώσει πρώιμα αποτελέσματα ανίχνευσης της mammaglobin-A σε διάφορες μελέτες που είναι σε εξέλιξη χωρίς όμως δεδομένα συσχέτισης με κλινική έκβαση. Η Cerveira και συνεργάτες χρησιμοποίησαν one-step RT-PCR για την ανίχνευση του mRNA της mammaglobin-A στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Χρησιμοποίησαν 8mL περιφερικού αίματος και στη συνέχεια απομόνωσαν τα εμπύρνα κύτταρα χρησιμοποιώντας διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων. Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποίησαν 0.5-5μg ολικού RNA καθώς και ειδικούς εκκινητές. Η mammaglobin-A ανιχνεύθηκε στο περιφερικό

αίμα 22 από 54 (41%) ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η μέθοδος αυτή είχε αυξημένη ευαισθησία και πολύ καλή ειδικότητα καθώς η mammaglobin-A δεν ανιχνεύθηκε, σε κανένα από 38 φυσιολογικούς εθελοντές και μόνο σε ένα από 18 ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην ανίχνευση mammaglobin-A και στο στάδιο της νόσου.

Ο Gargano και συνεργάτες χρησιμοποίησαν real-time RT-PCR για την ανίχνευση της mammaglobin-A στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού(145). Συγκεκριμένα 2.5mL αίματος είχαν συλλεγεί σε raxgene tubes και ολικό RNA απομονώθηκε από το ολικό αίμα. Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 5μg ολικού RNA. Κανένας από τους 35 φυσιολογικούς εθελοντές δεν ήταν θετικός, ενώ 3 από τους 36 (8%) ασθενείς με καρκίνο του μαστού ήταν θετικοί για τη mammaglobin-A.

Ο Grunewald και συνεργάτες χρησιμοποίησαν nested RT-PCR, για να συγκρίνουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της mammaglobin-A του epidermal-growth-factor receptor (EGFR), και της cytokeratin 19 (CK19) ως δεικτών για την ανίχνευση CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Σε δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, 11 (8%), 13 (10%), και 64 (48%) ήταν θετικά για το mRNA της mammaglobin-A, EGF-R, ή CK19, αντίστοιχα. Κανένα από τα δείγματα αίματος από φυσιολογικούς εθελοντές και από ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες δεν ήταν θετικό για τη mammaglobin-A, ενώ το CK19mRNA βρέθηκε στο περιφερικό αίμα 12 (39%) υγιών εθελοντών. Μετάγραφα του EGFR και της CK19 ανιχνεύθηκαν σε 5 (25%) και 2 (10%), αντίστοιχα, ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Για το λόγο αυτό

οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν ότι η mammaglobin-A είναι πιο ειδικός δείκτης για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων από την CK19 και τον EGFR(143).

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι διάφορες ερευνητές έχουν ανακοινώσει διαφορετικά ποσοστά ανίχνευσης της mammaglobin-A και διαφορετικά αποτελέσματα όσον αφορά τον ρόλο της ως εργαλείου πρόγνωσης στον καρκίνο του μαστού (66;81;90;91;144). Έτσι, ο ρόλος της ως προγνωστικός δείκτης για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού παραμένει ασαφής.

Ο Bernstein και συνεργάτες ανέπτυξαν μια μέθοδο ELISA για την ανίχνευση της mammaglobin στον ορό η οποία μπόρεσε να διαφοροποιήσει φυσιολογικές γυναίκες από γυναίκες με καρκίνο του μαστού και τα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα σε δείγματα που είχαν αποθηκευθεί για διαφορετικό χρονικό διάστημα και με διαφορετικές συνθήκες(146). Ο ρόλος αυτής της μεθόδου τόσο στην διάγνωση όσο και στην παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του μαστού πρέπει να εκτιμηθεί περαιτέρω.

Ο Mercatali και συνεργάτες χρησιμοποίησαν nested RT- PCR για την ανίχνευση της maspin και της mammaglobin-B στο περιφερικό αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Χρησιμοποιήθηκαν 2.5mL αίματος τα οποία είχαν συλλεγεί σε Paxgene tubes για την απομόνωση ολικού RNA. Συνολικά 500ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση cDNA. Η maspin ανιχνεύθηκε σε 3 (11%) από 27 φυσιολογικούς εθελοντές και σε 34 (24%) από 140 ασθενείς. Η

mammaglobin-B δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα φυσιολογικό εθελοντή, ενώ ανιχνεύθηκε σε 10 (7%) από τους 140 ασθενείς.

Mammaglobin-A και πλευριτική συλλογή

Τέλος η ανίχνευση του mRNA της mammaglobin-A έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την κυτταρολογική εξέταση για τη διαφορική διάγνωση της κακοήθους πλευριτικής συλλογής (127;147;148).

1.5.3.1.3. EGFR

Ο EGFRvIII (Epidermal growth factor receptor variant III) είναι το πιο κοινό προϊόν μετάλλαξης του EGFR με αποτέλεσμα την απάλειψη των εξονίων 2-7 που αντιστοιχεί τελικά σε απάλειψη 801 ζευγών βάσεων από το mRNA του EGFR(149). Ο υποδοχέας EGFRvIII είναι συνεχώς ενεργοποιημένος και η ενεργοποίησή του δεν εξαρτάται από την πρόσδεση κάποιου συνδέτη(150). Ούτε η πρωτεΐνη, ούτε το mRNA του EGFRvIII έχει απομονωθεί σε φυσιολογικούς ιστούς ενηλίκων, συμπεριλαμβανομένου και του φυσιολογικού μαστικού αδένου(151). Πρόσφατες in vivo και in vitro μελέτες υποστηρίζουν ότι η έκφραση του EGFRvIII συμμετέχει στην διαδικασία της ογκογένεσης στον ανθρώπινο καρκίνο του μαστού(150). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας εκφράζεται σε μεγάλη ποικιλία ανθρώπινων όγκων και βέβαια στον καρκίνο του μαστού (στον τελευταίο σε ποσοστό 67-78%)(151). Σε πρόσφατη μελέτη, η ανίχνευση του EGFRvIII με nested RT-PCR σε περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού έδωσε πρώιμα ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη χρησιμοποίησή του ως δείκτη μικρομεταστατικής νόσου. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκε σε 10/33 ασθενείς (30%) με

καρκίνο του μαστού T1N0 και σε 7/11 ασθενείς (63,6%) με μεταστατικό καρκίνο του μαστού(92).

1.5.3.1.4. Survivin

Ο Yie και συνεργάτες έχουν δημοσιεύσει μια RT-PCR ELISA (2mL περιφερικού αίματος ανά ασθενή) για την ανίχνευση κυττάρων που εκφράζουν survivin στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Σε 17 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού, η παρουσία αυτών των κυττάρων σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου(115)

Οι ανωτέρω δείκτες ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων καθώς και άλλοι έχουν χρησιμοποιηθεί είτε μεμονωμένα είτε για την ανάπτυξη RT-PCR μεθόδων πολλαπλών δεικτών. Ο Taback και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), τον υποδοχέα c-Met, την 134-N-acetylgalactosaminyl- transferase, και το καρκινικό αντιγόνο MAGE-A3 για να αναπτύξουν μια RT-PCR πολλαπλών δεικτών την οποία συνδύασαν με ένα αυτόματο σύστημα ηλεκτροχημικής ανίχνευσης για την αναζήτηση CTCs στον καρκίνο του μαστού(78). Ο Zehentner και συνεργάτες διάλεξαν τέσσερις διαφορετικούς δείκτες, (Mammaglobin-A, B305D, GABRP and B726P), για να αναπτύξουν μια πολλαπλών δεικτών real time RT-PCR για την ανίχνευση CTCs στον καρκίνο του μαστού(152). Ωστόσο δεν έχει δημοσιευθεί η προγνωστική σημασία της ανίχνευσης CTCs στον καρκίνο του μαστού χρησιμοποιώντας τις ανωτέρω μεθόδους.

1.5.3.2. Μελέτη της δυνατότητας πολλαπλασιασμού των μικρομεταστατικών κυττάρων

Δύο διαφορετικές ομάδες ερευνητών διαπίστωσαν ότι η δυνατότητα πολλαπλασιασμού των DTCs του μυελού σε *ex vivo* καλλιέργειες συσχετίσθηκε με την κλινική έκβαση(153;154). Πράγματι, η σημαντική ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργεια συσχετίσθηκε με αυξημένη πιθανότητα θανάτου από καρκίνο.

1.5.3.3. Μέθοδοι για την διάκριση αποπτωτικών από μη αποπτωτικά μικρομεταστατικά κύτταρα

Γενικά, όταν χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων, η ανεύρεση mRNA αντιγράφων στο περιφερικό αίμα σημαίνει την παρουσία ζωντανών κυττάρων από τα οποία προέρχονται αυτά τα αντίγραφα, διότι η βιωσιμότητα του RNA που απελευθερώνεται από τα κύτταρα είναι πτωχή και η παρουσία mRNA μεταγράφων σημαίνει ότι τα αντίγραφα προέρχονται από ζωντανά κύτταρα τα οποία είναι ικανά να εκτελούν τη λειτουργία της μεταγραφής. Επιπλέον, η Alix-Panabieres και συνεργάτες χρησιμοποίησαν το EPISPOT, για να ανιχνεύσουν ζωντανά μη αποπτωτικά CTCs(155). Η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση έκκρισης συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου. Η Fehm και συνεργάτες ανίχνευσαν αποπτωτικά DTCs χρησιμοποιώντας ανοσοκυτταροχημεία σε 36 από 157 (23%) ασθενείς με καρκίνο του μαστού που έλαβαν νεο-συμπληρωματική χημειοθεραπεία(156). Είναι ενδιαφέρον ότι η απάντηση στη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού αποτυπώθηκε με την παρουσία αποπτωτικών DTCs.

1.5.3.4. Μελέτη της έκφρασης του φαινοτύπου των βλαστικών κυττάρων στα μικρομεταστατικά κύτταρα

Με δεδομένη την ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων του μαστού με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων με τον $CD44^+CD24^{-/low}$ φαινότυπο(157), είναι πιθανό μικρομεταστατικά κύτταρα με τον παραπάνω φαινότυπο να αντιπροσωπεύουν ένα υποπληθυσμό με ιδιαίτερη προγνωστική αξία. Ο Balic και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ανοσοϊστοχημεία τριπλής χρώσης, για να εκτιμήσουν 50 δείγματα μυελού των οστών θετικά στην κυτταροκερατίνη από ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού για την παρουσία του ανωτέρω φαινοτύπου(158). Αυτός ο φαινότυπος ανιχνεύθηκε σε όλα τα CK+ δείγματα και ο διάμεσος επιπολασμός του ήταν 65% των DTCs που ανιχνεύθηκαν ανά ασθενή, ενώ το ποσοστό ανίχνευσης του ανωτέρου φαινοτύπου σε πρωτοπαθείς όγκους ήταν <10% των κυττάρων(158). Αντίστοιχη μελέτη για την έκφραση του φαινοτύπου των βλαστικών κυττάρων στα CTCs έχει πρόσφατα ανακοινωθεί(159).

1.6. Μελέτη της προγνωστικής αξίας των μικρομεταστατικών κυττάρων στα πλαίσια διεθνών πολυκεντρικών μελετών

Ο Mikhitarian και συνεργάτες ανακοίνωσαν αποτελέσματα από μια προοπτική πολυκεντρική μελέτη στη οποία έλαβαν μέρος ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού(160). Από κάθε άρρωστο συνέλεξαν δείγματα από μυελό των οστών, περιφερικό αίμα και λεμφαδένα φρουρό. Οι ερευνητές ανακοίνωσαν δεδομένα μοριακής ανίχνευσης μικρομεταστατικών κυττάρων από 215 ασθενείς στο περιφερικό αίμα και από 177 ασθενείς στον μυελό των οστών. Στη μελέτη αυτή τα δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών είχαν αποσταλεί

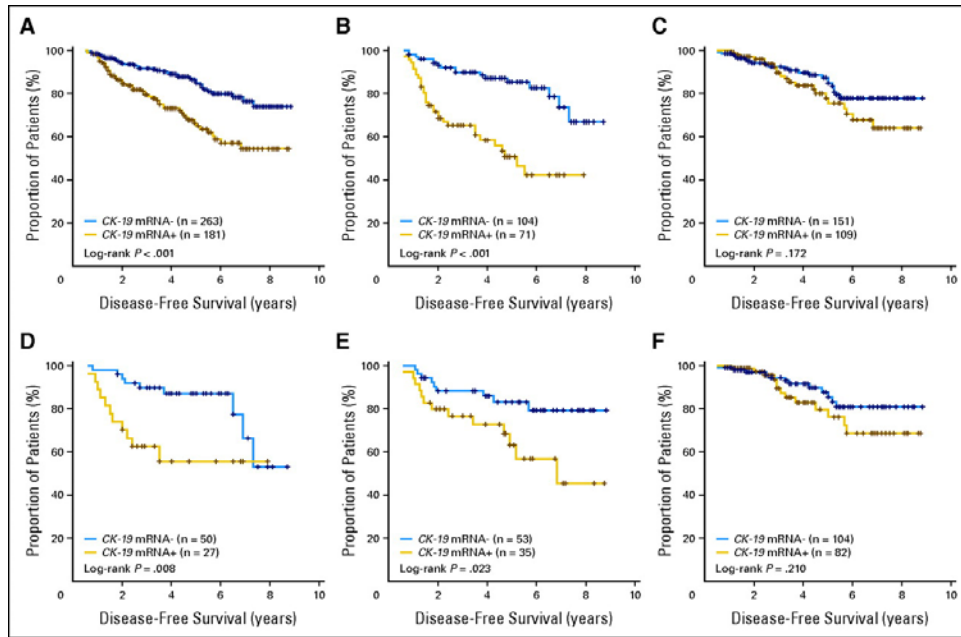
στο κεντρικό εργαστήριο για επεξεργασία σε EDTA tubes σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε 24-48 ώρες. Η μελέτη αυτή είναι σημαντική, γιατί είναι από τις πρώτες στην οποία η μοριακή ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων εξετάζεται στα πλαίσια διεθνούς πολυκεντρικής μελέτης. Αρχικά εφαρμόστηκε διαβαθμισμένη φυγοκέντριση Ficoll για την απομόνωση των μονοπυρήνων κυττάρων του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών και στη συνέχεια έγινε απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση του cDNA από 5μg ολικού RNA. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 7 γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού [mammaglobin-A, CEA, CK19, PIP, muc1, PSE, Erb (μυελός των οστών μόνο) ErCAM (περιφερικό αίμα μόνο)]. Από τους επτά αυτούς δείκτες η CK19, muc1 και ErbB2 δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση λόγω της αυξημένης έκφρασής τους σε φυσιολογικούς εθελοντές. Χρησιμοποιώντας ως όριο ανίχνευσης τις τρεις σταθερές αποκλίσεις από το μέσο όρο της έκφρασης σε φυσιολογικούς εθελοντές, 63% (136/215) των δειγμάτων αίματος και 11% (19/177) των δειγμάτων μυελού των οστών ήταν θετικά για ένα τουλάχιστο καρκινικό δείκτη. Η υπερέκφραση της mammaglobin-A είχε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας ($p = .0315$). Αντίθετα δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη θετικότητα του περιφερικού αίματος για τους ανωτέρω δείκτες και το παθολογικό (H&E) ή μοριακό (RT-PCR) status των μασχαλιαίων λεμφαδένων. Αποτελέσματα συσχέτισης της μοριακής ανίχνευσης μικρομεταστατικών κυττάρων με την κλινική έκβαση δεν δημοσιεύθηκαν ακόμη.

Η Reinholz και συνεργάτες έχουν ξεκινήσει να μελετούν τα CTCs στα πλαίσια μιας από τις μεγαλύτερες συνεργατικές ογκολογικές ομάδες στις ΗΠΑ, του NCCTG. Στις μελέτες αυτές οι περισσότεροι ασθενείς προέρχονται από νοσοκομεία της κοινότητας (διαφορετικά από τη Mayo Clinic στην οποία γίνεται η επεξεργασία των δειγμάτων). Από τον Αύγουστο του 2003 ως τον Αύγουστο του 2007, έχουν συλλεγεί περίπου 894 δείγματα αίματος για ανάλυση CTCs (από 271 ασθενείς) με επιτυχία σε 9 μελέτες φάσης II του NCCTG (8 μελέτες σε ασθενείς με μεταστατικό και 1 μελέτη σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού, M. Reinholz, προσωπική επικοινωνία). Τα δείγματα αίματος από τους παραπάνω ασθενείς έχουν υποστεί επεξεργασία συνήθως μέσα σε 24 ώρες από τη λήψη του αίματος. Επιπλέον η συμμόρφωση των διαφόρων νοσοκομείων του NCCTG για την λήψη και αποστολή διαδοχικών δειγμάτων αίματος έχει αυξηθεί από το 77% στις μελέτες που ξεκίνησαν το 2003-2005 στο 92% για τις μελέτες που ξεκίνησαν το 2006-2007. Η Reinholz και συνεργάτες χρησιμοποίησαν CD45-αρνητικό εμπλουτισμό CTCS και qRT/PCR, για να χαρακτηρίσουν CTCs από 10mL ολικού αίματος που ελήφθησαν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού που έλαβαν μέρος σε 3 μελέτες (N0234, N0336, N0338) φάσης II του NCCTG (161). Μετρήθηκε η σχετική γονιδιακή έκφραση ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ algorithm; ≥ 2 θετικό δείγμα) για την CK19, mammaglobin-A και την TTK (γονίδιο ρυθμιστικό του κυτταρικού κύκλου) μετά από κανονικοποίηση για τη $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη και για την έκφραση σε φυσιολογικούς δότες εθελοντές. Ένα 58% και 75% των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού είχαν ανιχνεύσιμη έκφραση της CK19 και της mammaglobin-A στο αρχικό δείγμα (161) Η προγνωστική σημασία της ανίχνευσης CTCS στα

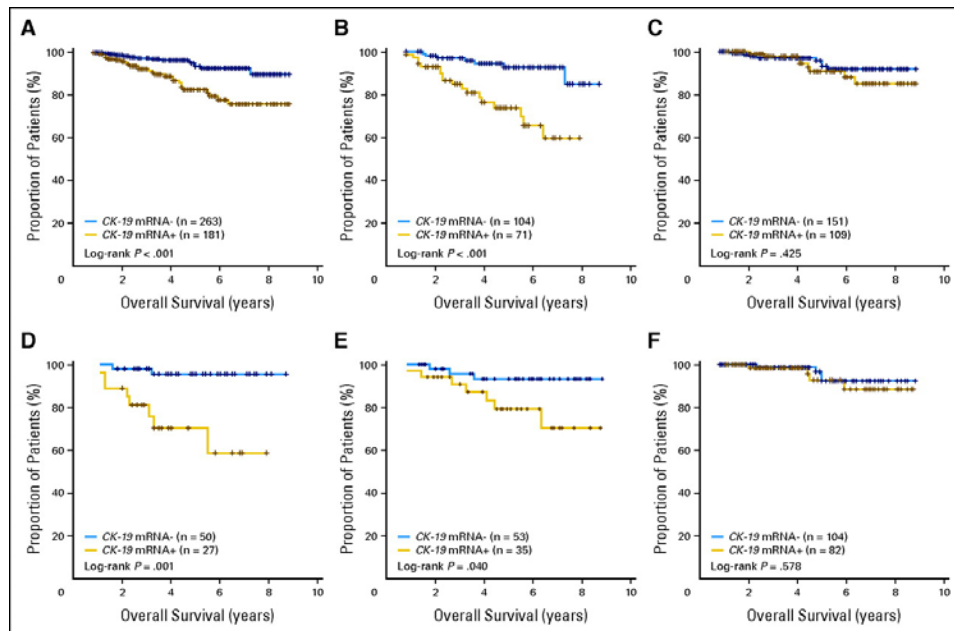
πλαίσια της παραπάνω μελέτης μένει να τεκμηριωθεί μετά από διάστημα παρακολούθησης.

1.7. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος και μοριακά πορτραίτα του καρκίνου του μαστού

Ο Ιγνατιάδης και συνεργάτες δημοσιεύσαν την πρώτη μελέτη που διερεύνησε την προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων σε σχέση με τα μοριακά πορτραίτα του πρώιμου καρκίνου του μαστού(41). Η παρουσία CK19mRNA-θετικών CTCs ήταν παράγοντας κακής πρόγνωσης σε γυναίκες με ER-αρνητικό αλλά όχι σε αυτές με ER-θετικό πρώιμο καρκίνο του μαστού, παρά το παρόμοιο ποσοστό ασθενών με CK19mRNA-θετικά κύτταρα στις δύο υποομάδες. Επιπλέον, η παρουσία CK19mRNA-θετικών κυττάρων σχετίσθηκε με ελαττωμένη DFS και OS στην «triple-negative» και HER2-θετική, αλλά όχι στην ER-θετική/HER2-αρνητική υποομάδα (Εικόνα 4 και 5) (41).



Εικ 4. A,B,C,D,E,F. Επιβίωση ελεύθερη νόσου σε ασθενείς με και χωρίς CK19mRNA-θετικά CTCs: (A) όλοι οι ασθενείς, (B) ER-αρνητική, (C) ER-θετική, (D) triple-negative, (E) HER2-θετική, and (F) ER-θετική/HER2-αρνητική υποομάδα. (Αναδημοσίευση από το Ignatiadis, M. et al. J Clin Oncol; 25:5194-5202, 2007).



Εικ 5. A,B,C,D,E,F. Ολική επιβίωση σε ασθενείς με και χωρίς CK19mRNA-θετικά CTCS: (A) όλοι οι ασθενείς, (B) ER-αρνητική, (C) ER-θετική, (D) triple-negative, (E) HER2-θετική, and (F) ER-θετική/HER2-αρνητική υποομάδα. (Αναδημοσίευση από το Ignatiadis, M. et al. J Clin Oncol; 25:5194-5202 2007).

Κατά τη διάρκεια του 5-ετούς διάμεσου διαστήματος παρακολούθησης της μελέτης οι ασθενείς με ER-αρνητικούς όγκους εμφάνισαν υποτροπή της νόσου πιο συχνά από ό,τι ασθενείς με ER-θετικούς όγκους (28% έναντι 16.5%, $p=0.004$). Αυτό συμφωνεί με την μεταανάλυση της Οξφόρδης, στην οποία ER-αρνητικοί ασθενείς εμφάνισαν υποτροπή πιο συχνά από ό,τι ER-θετικοί ασθενείς κατά τη διάρκεια των 5 πρώτων ετών μετά τη διάγνωση(162). Γι' αυτό, τα CK19mRNA+ κύτταρα σχετίσθηκαν με την ανάπτυξη «πρώιμων» μεταστάσεων μέσα στα πρώτα 5 χρόνια από τη διάγνωση στους ασθενείς με ER-αρνητικούς αλλά όχι ER-θετικούς όγκους. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι στους ασθενείς με ER-αρνητικούς όγκους, τα μικρομεταστατικά κύτταρα τα στοχεύει μόνο η συμπληρωματική χημειοθεραπεία, ενώ στους ασθενείς με ER-θετικούς όγκους τα στοχεύει επιπλέον και η συμπληρωματική ενδοκρινική θεραπεία. Παρ'όλα αυτά φαίνεται ότι οι καμπύλες επιβίωσης στους ασθενείς με ER-θετικούς όγκους τείνουν να διαφοροποιηθούν μετά από 5 χρόνια το οποίο είναι συμβατό με τα 5 χρόνια χορήγησης ταμοξιφαίνης, που έλαβαν οι ER-θετικοί ασθενείς. Γι' αυτό το λόγο μετά από μεγαλύτερο διάστημα παρακολούθησης, τα αρχικά επίπεδα του CK19mRNA μπορεί να έχουν προγνωστική αξία για τους ER-θετικούς ασθενείς και έτσι να μας βοηθήσουν να βρούμε τους ασθενείς εκείνους που μπορεί να ωφεληθούν από την χορήγηση ενδοκρινικής θεραπείας πέρα από τα 5 χρόνια. Έτσι το 5-ετές διάστημα παρακολούθησης είναι σχετικά μικρό για να εξαχθούν οριστικά συμπεράσματα για τους ER-Θετικούς ασθενείς. Επιπλέον, δεδομένου ότι όλοι οι ασθενείς στη μελέτη έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία με ή χωρίς ενδοκρινική θεραπεία, η πληροφορία της ανίχνευσης CK19mRNA+

κυττάρων δεν είναι αμιγώς προγνωστική. Με βάση τα αποτελέσματά μας θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα CK19mRNA-θετικά κύτταρα έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά σε ασθενείς με ER-αρνητικούς (“basal-like CTCs”) και ER-θετικούς (“luminal-like CTCs”) όγκους. Ωστόσο, ο μοριακός και ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των CK19mRNA+ κυττάρων σε ασθενείς με ER-αρνητικούς και ER-θετικούς όγκους απαιτείται για την επαλήθευση της ανωτέρω υπόθεσης. Επιπλέον θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η παρουσία CK19mRNA+ κυττάρων σε ένα δεδομένο ασθενή πιθανώς αντανάκλα τη βιολογία του πρωτοπαθούς όγκου, όπως αυτή καθορίζεται από τον ER. Όπως αναφέραμε με βάση τον Klein και συνεργάτες, τα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι ετερογενή σε έναν ασθενή με πρώιμο καρκίνο του μαστού(46). Με δεδομένη την ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων με κάποιες ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα βλαστικά/προγονικά κύτταρα (157) είναι ενδιαφέρον να εξετάσουμε αν υπάρχουν διαφορετικοί υποπληθυσμοί μικρομεταστατικών κυττάρων με ιδιότητες βλαστικών/προγονικών κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη μεταστάσεων σε ασθενείς με ER-αρνητικούς και ER-θετικούς όγκους.

Είναι ενδιαφέρον ότι, με βάση τις περισσότερες γονιδιακές υπογραφές, η πλειοψηφία των ER-αρνητικών όγκων χαρακτηρίζονται ως όγκοι πτωχής πρόγνωσης, ενώ οι ER-θετικοί όγκοι συνιστούν ένα μείγμα όγκων καλής και κακής πρόγνωσης(33;163). Γι αυτό είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί προοπτικά η υπόθεση ότι συνδυάζοντας την εξέταση του γονιδιακού προφίλ του πρωτοπαθούς όγκου με την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων μπορούμε περαιτέρω να βελτιώσουμε την πρόγνωση στον πρώιμο καρκίνο του μαστού.

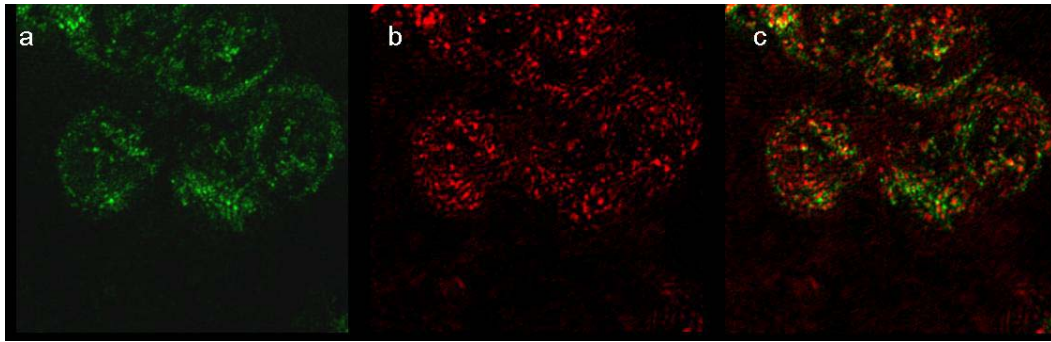
1.8. CTCs/DTCs και πρόβλεψη στον καρκίνο του μαστού

Πέρα από το ρόλο της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου ως εργαλείου πρόγνωσης, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος της ως εργαλείου πρόβλεψης. Ο Klein και συνεργάτες έχουν δείξει ότι τα μικρομεταστατικά κύτταρα έχουν πιο πρώιμο γενωμικό προφίλ από ό,τι τα κύτταρα του πρωτοπαθούς όγκου(44). Με το δεδομένο ότι τα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι ο στόχος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας είναι ίσως απαραίτητο οι παθολόγοι ογκολόγοι να λάβουν υπόψη τους τα χαρακτηριστικά όχι μόνο του πρωτοπαθούς όγκου αλλά και αυτά των μικρομεταστατικών κυττάρων, ώστε να βελτιωθεί η επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

1.8.1. Γονοτυπική και φαινοτυπική ανάλυση CTCs/DTCs

Διάφοροι ερευνητές έχουν προσπαθήσει να αναλύσουν φαινοτυπικά μεμονωμένα μικρομεταστατικά κύτταρα. Η Meng και συνεργάτες χρησιμοποίησαν μια ευαίσθητη μέθοδο, για να απομονώσουν CTCs από το αίμα και να εκτιμήσουν την έκφραση του HER-2 γονιδίου με *in situ* φθορίζοντα υβριδισμό(164). Σε δημοσίευση τους έδειξαν ότι 9 από 24 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και HER2-αρνητικό πρωτοπαθή όγκο, εμφάνισαν ενίσχυση του HER2 γονιδίου στα CTCs τους κατά τη διάρκεια που η νόσος τους εξελισσόταν(164). Επίσης η Meng και συνεργάτες έδειξαν ότι υπάρχει μια τάση για ταυτόχρονη ενίσχυση του HER2 και του υποδοχέα της ουροκινάσης ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (uPAR) σε μεμονωμένα CTCs(165). Η

Καλλέργη και συνεργάτες έδειξαν ότι παρατηρείται αυξημένη έκφραση ενεργοποιημένων κινασών και HER2 πρωτεΐνης σε μεμονωμένα CTCs (Εικόνα 6)(166).



Εικ.6. Αθροισμα HER2-θετικών CTCs από μια γυναίκα με καρκίνο του μαστού μετά από χρώση διπλού ανοσοφθορισμού.

Ο Smirnov και συνεργάτες χρησιμοποίησαν την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών, για να δημιουργήσουν το αποτύπωμα της γονιδιακής έκφρασης CTCs από ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο. Έτσι ανακάλυψαν μια λίστα από γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά σε CTCs(167). Επίσης έχει δημοσιευθεί ότι το αποτύπωμα της γονιδιακής έκφρασης μεμονωμένων κυττάρων είναι εφικτό σε μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων(168). Ο Watson και συνεργάτες μελέτησαν το συνολικό προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε ErCAM-εμπλουτισμένα κύτταρα μυελού των οστών από ασθενείς με καρκίνο του μαστού που έλαβαν νεοσυμπληρωματική χημειοθεραπεία(116). Βρήκαν μια υπογραφή μικρομεταστατικών κυττάρων μυελού των οστών μετά το τέλος της χημειοθεραπείας. Ανάμεσα στα μετάγραφα της παραπάνω υπογραφής ταυτοποιήθηκε και το TWIST1(116). Σε ανεξάρτητη σειρά δειγμάτων μυελού των οστών η έκφραση του TWIST1 σχετίστηκε με πρώιμη υποτροπή της νόσου.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι η φαινοτυπική και γονοτυπική ανάλυση των μικρομεταστατικών CTCs είναι απαραίτητη για τη ταυτοποίηση νέων στόχων για την αποτελεσματική στόχευση αυτών των κυττάρων.

1.8.2. CTCs/DTCs και χημειοθεραπεία/ενδοκρινική θεραπεία

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα CTCs/DTCs είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία(68;169-172), πιθανώς εξαιτίας της ελαττωμένης ικανότητάς τους για πολλαπλασιασμό(110). Ο Ξενίδης και συνεργάτες έδειξαν ότι η συνεχής ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων σε 119 ασθενείς με ορμονοευαίσθητους όγκους κατά τη χορήγηση ταμοξιφαίνης ήταν ένας ανεξάρτητος παράγοντας για ελαττωμένη DFS και OS. Για το λόγο αυτό η συνεχής ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων κατά τη χορήγηση συμπληρωματικής θεραπείας με ταμοξιφαίνη θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω ως ένας δείκτης αντίστασης στην ταμοξιφαίνη και ανάγκης για χορήγηση εναλλακτικής ορμονοθεραπείας, όπως οι αναστολείς της αρωματάσης.

1.8.3. Ανίχνευση CTCs και απάντηση στη νεοσυμπληρωματική χημειοθεραπεία

Επιπλέον, έχουν ανακοινωθεί αποτελέσματα από την προοπτική ανίχνευση CTCs με το CellSearch™ σε 7.5mL περιφερικού αίματος πριν από τη χορήγηση νεοσυμπληρωματικής χημειοθεραπείας στα πλαίσια της μελέτης GeparQuattro . Ανιχνεύθηκαν ≥ 1 CTCs σε 54 (22%) από τους 245 ασθενείς που εντάχθηκαν στην παραπάνω μελέτη. CTCs επίσης ανιχνεύθηκαν σε 7 από τους

67 ασθενείς (10.4%) μετά τη χορήγηση της χημειοθεραπείας(173). Σε μια άλλη μελέτη νεοσυμπληρωματικής χημειοθεραπείας ανιχνεύθηκαν CTCs με το CellSearch™ χρησιμοποιώντας 30mL περιφερικού αίματος ανά ασθενή πριν από τη χορήγηση νεοσυμπληρωματικής χημειοθεραπείας και μετά την ολοκλήρωσή της(174). Χρησιμοποιώντας ≥ 2 CTCs ως το cutoff για τον ορισμό αυξημένων CTCs, συσχετίστηκε η ανίχνευση CTCs μετά τη χημειοθεραπεία με την παθολογική πλήρη ύφεση (pathologic complete response, pCR). Όλοι οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα CTCs μετά τη νεοσυμπληρωματική χημειοθεραπεία είχαν υπολειπόμενη νόσο κατά τη διάρκεια του χειρουργείου, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν CTCs σε ασθενείς με παθολογική πλήρη ύφεση (pCR). Ωστόσο η απουσία CTCs μετά τη χορήγηση νεοσυμπληρωματικής χημειοθεραπείας δεν μπορούσε να αποτελέσει κριτήριο για να προβλεφθεί η πλήρης ύφεση(174). Η Pachmann και συνεργάτες χρησιμοποίησαν την MAINTRAC® ανάλυση και ανίχνευσαν κυκλοφορούντα επιθηλιακά κύτταρα σε όλους τους ασθενείς (n=30) που μελέτησαν πριν από την χορήγηση νεοσυμπληρωματικής χημειοθεραπείας, με αριθμό ανιχνεύσιμων κυττάρων από 600 έως 273,150 κύτταρα/mL (μέσος αριθμός 11,876 κύτταρα/mL)(175). Οι ερευνητές αυτοί έδειξαν ότι η ελάττωση στον αριθμό των ΚΕΚΚ μπορούσε με ακρίβεια να προβλέψει την ελάττωση του πρωτοπαθούς όγκου στο χειρουργείο(175).

1.8.4. CTCs/DTCs και νεώτερες στοχευμένες θεραπείες

Καθώς η χημειοθεραπεία και ενδοκρινική θεραπεία δεν μπορούν να εξαλείψουν όλα τα μικρομεταστατικά κύτταρα, αρκετοί ερευνητές στόχευσαν τα

DTCs/CTCs χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα. Το μονοκλωνικό αντίσωμα 17-1A (αντίσωμα εναντίον του επιθηλιακού μορίου προσκολλησεως ErCAM) είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική ελάττωση των ErCAM+/CK+ DTCs σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού(176;177). Επιπλέον, η Μποζιονέλλου και συνεργάτες σε δημοσίευση τους έδειξαν ότι η σύντομη χορήγηση trastuzumab μπορεί να εξαφανίσει χημειο- και ορμονοανθεκτικά CK19mRNA- και HER2mRNA-θετικά CTCs και DTCs σε 20 (67%) από 30 ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο του μαστού(178). Πρόσφατα ο Barok και συνεργάτες έδειξαν ότι το trastuzumab ελαττώνει τον αριθμό των CTCs και DTCs, ενώ ο πρωτοπαθής όγκος εμφανίζει αντίσταση στο trastuzumab σε μοντέλο αλλομοσχεύματος SCID επίμυος(179).

1.9. CTCs/DTCs ως εργαλείο πρόγνωσης και πρόβλεψης. Έτοιμο για κλινική εφαρμογή;

Τα CTCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια βιοψία σε πραγματικό χρόνο για την εκτίμηση και παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, καθώς η λήψη του αίματος μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, κάτι το οποίο δεν ισχύει για την αναρρόφηση μυελού των οστών. Γι αυτό οι περισσότερες σχεδιαζόμενες ή πραγματοποιούμενες κλινικές μελέτες χρησιμοποιούν CTCs περιφερικού αίματος αντί για DTCs μυελού των οστών, για να μελετήσουν την ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο ως εργαλείο πρόγνωσης και πρόβλεψης στον καρκίνο του μαστού. Παρ' ότι υπάρχουν δεδομένα ότι τα DTCs/CTCs έχουν την δυνατότητα να αποτελέσουν προγνωστικά και προβλεπτικά εργαλεία για την εξατομίκευση της θεραπείας στον καρκίνο του

μαστού αρκετά προβλήματα πρέπει να αντιμετωπισθούν πριν αυτά χρησιμοποιηθούν στην καθημερινή κλινική πράξη:

1.9.1 Η ανίχνευση DTCs/CTCs δεν είναι τυποποιημένη

Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια για την τυποποίηση της ανίχνευσης των DTCs/CTCs(180-182). Ωστόσο, αρκετοί ερευνητές έχουν ανιχνεύσει DTCs/CTCs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ξεκινώντας από διαφορετικό όγκο μυελού των οστών/περιφερικού αίματος, και έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικές τεχνικές εμπλουτισμού και διαφορετικές μεθόδους ή καρκινικούς δείκτες για την ανίχνευση τους, οπότε η σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη. DTCs έχουν κυρίως ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας ανοσοκυτταροχημεία με αντισώματα έναντι της κυτταροκερατίνης και του MUC1. Η ανίχνευση CTCs έχει βασισθεί στην χρησιμοποίηση κυτταροκερατινών ως καρκινικού δείκτη. Ωστόσο, ακόμη και σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος ανίχνευσης και ο ίδιος δείκτης δεν χρησιμοποιήθηκαν κοινές τυποποιημένες διαδικασίες (π.χ. διαφορετικοί εκκινητές, συνθήκες και πλατφόρμες ενίσχυσης για την RT-PCR, ή διαφορετικά αντισώματα, πρωτόκολλα και συστήματα ανίχνευσης για την ανοσοκυτταροχημεία και τον ανοσοφθορισμό). Γι' αυτό οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί χαρακτηρίζονται συχνά από χαμηλή τυποποίηση και επαναληψιμότητα, ενώ οι τιμές cut-off που έχουν επιλεγεί για τον καθορισμό του θετικού αποτελέσματος για DTCs/CTCs δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς σε ανεξάρτητες σειρές ασθενών.

1.9.2. Προβλήματα που παρουσιάζουν δημοσιευμένες μελέτες για DTCs/CTCs

Πολλές δημοσιευμένες μελέτες για CTCs είχαν πτωχό στατιστικό σχεδιασμό, μικρό δείγμα ασθενών, ήταν αναδρομικές και δεν δημοσιεύθηκαν με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες για τη δημοσίευση καρκινικών δεικτών(183).

1.9.3. Καμία δημοσιευμένη μελέτη δεν έχει δείξει μέχρι τώρα ότι χρησιμοποιώντας DTCs/CTCs ως προγνωστικό/προβλεπτικό εργαλείο μπορούμε να βελτιώσουμε την κλινική έκβαση ασθενών με καρκίνο του μαστού

Οι Henry και Hayes δημοσίευσαν ένα διάγραμμα ροής για την ανάπτυξη ενός καρκινικού δείκτη στο οποίο περιέγραψαν τη διαδικασία η οποία πρέπει να ακολουθηθεί, ώστε ένας καρκινικός δείκτης να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη. Αρχικά, θα πρέπει να αναπτυχθεί η μέθοδος που θα μετράει τον καρκινικό δείκτη με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Έπειτα μια αρχική υπόθεση-κλινικό σενάριο με βάση αυτόν τον δείκτη θα πρέπει να τεκμηριωθεί ιδανικά σε αρχειακό υλικό από προοπτικές μελέτες(184). Τελικώς, μια προοπτική κλινική μελέτη θα πρέπει να σχεδιασθεί έτσι, ώστε σε αυτήν οι θεραπευτικές αποφάσεις στο πειραματικό σκέλος της μελέτης θα πρέπει τουλάχιστον μερικώς να βασίζονται στα CTCs/DTCs. Με αυτό τον τρόπο, μπορεί ναδειχθεί με εγκυρότητα ότι χρησιμοποιώντας CTCs/DTCs μπορούμε να βελτιώσουμε την κλινική έκβαση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

1.10. Στόχοι της διατριβής

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος που προσβάλλει τις γυναίκες. Στην αντιμετώπιση του πρώιμου καρκίνου του μαστού ο παθολόγος ογκολόγος πρέπει καθημερινά στην κλινική πράξη να απαντήσει σε 2 ερωτήματα:

α. Μπορώ να εντοπίσω τις γυναίκες που έχουν καλή πρόγνωση και δεν χρειάζονται χημειοθεραπεία ως μέρος της συστηματικής τους θεραπείας;

β. Μπορώ να εντοπίσω ποιός συνδυασμός συστηματικής θεραπείας είναι ο καλύτερος για κάθε γυναίκα;

Για την απάντηση στο πρώτο ερώτημα οι παθολόγοι ογκολόγοι χρησιμοποιούν είτε τις κατευθυντήριες οδηγίες στις οποίες έχουν καταλήξει διάφορες ομάδες ειδικών(2) είτε αλγορίθμους, όπως το Nottingham Prognostic Index(3) και το Adjuvant Online(4;5). Τα ανωτέρω εργαλεία συνδυάζουν την προγνωστική πληροφορία από διάφορα καθιερωμένα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενή και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του όγκου, για να βοηθήσουν το γιατρό να εκτιμήσει την πρόγνωση του ασθενή. Για το δεύτερο ερώτημα δύο δείκτες χρησιμοποιούνται στην καθημερινή πράξη: Η έκφραση του υποδοχέα ER στον πρωτοπαθή όγκο καθορίζει αν θα δώσουμε ενδοκρινική θεραπεία, ενώ η έκφραση του υποδοχέα HER2 αν θα δώσουμε trastuzumab σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Για την απάντηση στα δύο ανωτέρω βασικά ερωτήματα διάφοροι δείκτες μετρώμενοι με διάφορες τεχνολογίες έχουν προταθεί και βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, αλλά κανένας από αυτούς δεν χρησιμοποιείται στην καθημερινή πράξη(22).

Τα τελευταία 10 χρόνια το Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου της Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου

Ηρακλείου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών μελετά τη μοριακή ανίχνευση CTCs στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού ως εργαλείο, για να βοηθήσει στην απάντηση των δύο ανωτέρω ερωτημάτων. Ο δείκτης ο οποίος έχει επιλεγεί για την μοριακή ανίχνευση των CTCs είναι η CK19. Η ανίχνευση CTCs χρησιμοποιώντας την CK19 βελτίωσε την ικανότητά μας να απαντούμε στο πρώτο ερώτημα προσφέροντας ανεξάρτητη προγνωστική πληροφορία πέρα από αυτή των καθιερωμένων κλινικών και παθολογοανατομικών εργαλείων που χρησιμοποιούμε στην κλινική πράξη(39-41). Ωστόσο είναι γνωστό ότι τα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι ετερογενή σε ένα συγκεκριμένο ασθενή(46) και έτσι πιθανώς ένας δείκτης δεν είναι αρκετός για τη μελέτη τους. Επιπλέον έχουμε δείξει ότι μόνο 30% από τους ασθενείς με CK19mRNA-θετικά κύτταρα υποτροπιάζουν, ενώ 15% των ασθενών στους οποίους τα ανωτέρω κύτταρα δεν ανιχνεύονται υποτροπιάζουν και πεθαίνουν από καρκίνο του μαστού μετά από ένα διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 5 ετών(41). **Ο στόχος της παρούσης διατριβής είναι να αυξήσει την ευαισθησία και την ειδικότητα της μοριακής ανίχνευσης μικρομεταστατικών κυττάρων ως εργαλείου, για να προβλέπει την υποτροπή της νόσου σε γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε την προγνωστική αξία της μοριακής ανίχνευσης μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού μετά τη χειρουργική αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και πριν από τη χορήγηση συστηματικής χημειοθεραπείας χρησιμοποιώντας 3 δείκτες: την CK19, την Mammaglobin-A (MGB1) και το**

HER2. Στην παρούσα διατριβή αναπτύξαμε ένα εργαλείο μοριακής ανίχνευσης CTCs το οποίο θα ελεγχθεί μελλοντικά για τη δυνατότητά του να μας βοηθήσει να απαντήσουμε καλύτερα στο δεύτερο ερώτημα, δηλαδή ποιος συνδυασμός συστηματικής θεραπείας είναι ο καλύτερος για κάθε γυναίκα. Ο στόχος αυτός είναι πέρα από τα όρια της παρούσης διατριβής.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οι Ασθενείς

Στην μελέτη εντάχθηκαν 175 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο, πρώιμο καρκίνο του μαστού που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Πριν από τη χειρουργική επέμβαση, όλες οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε απεικονιστικό έλεγχο, για να αποκλεισθεί η παρουσία μεταστατικών εστιών. Ο έλεγχος περιλάμβανε ακτινογραφία θώρακος, μαστογραφία, υπερηχογράφημα ήπατος και σπινθηρογράφημα οστών, ενώ όπου κρίθηκε απαραίτητο διενεργήθηκε περαιτέρω έλεγχος με υπολογιστική αξονική τομογραφία ή μαγνητική τομογραφία. Η χειρουργική θεραπεία ήταν μαστεκτομή ή ογκεκτομή με λεμφαδενικό καθαρισμό της μασχάλης. Ασθενείς που υποβλήθηκαν είτε σε ογκεκτομή είτε είχαν ≥ 4 διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες έλαβαν ακτινοθεραπεία.

Τρεις εβδομάδες, τουλάχιστον, μετά την χειρουργική επέμβαση και πριν από την έναρξη οποιασδήποτε συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, γινόταν ενημέρωση των ασθενών, τους δινόταν το έντυπο πληροφόρησης το οποίο εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή και την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και στη συνέχεια, μετά την έγγραφη συγκατάθεσή τους, εντάσσονταν στην μελέτη. Ακολουθούσε λήψη αίματος για έλεγχο παρουσίας CTCs πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας και μετά το τέλος της.

Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής :

- CMF (Cyclophosphamide 600mg/m², Methotrexate 40mg/m² και 5-Fluouracil 600mg/m², τις ημέρες 1 και 8, σε κύκλους 28 ημερών, για 6 κύκλους).
- FEC (5-Fluouracil 500mg/m², Cyclophosphamide 500mg/m² και Epirubicin 75mg/m² κάθε 21 ημέρες, για 6 κύκλους).
- T/EC (Docetaxel 100mg/m² κάθε 21 ημέρες, για 4 κύκλους ακολουθούμενο από Epirubicin 75mg/m² και Cyclophosphamide 700mg/m² κάθε 21 ημέρες, για 4 κύκλους).

Δεν υπήρχαν υποομάδες ασθενών που έλαβαν μόνο ορμονοθεραπεία ή που δεν έλαβαν καμία συστηματική θεραπεία. Ασθενείς με HER2 θετικό όγκο δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με trastuzumab, διότι όλοι οι ασθενείς εντάχθηκαν στην μελέτη πριν από τη δημοσίευση των θετικών αποτελεσμάτων των μελετών χορήγησης trastuzumab σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού (185-187). Όλοι οι ασθενείς ή με ER-θετικούς ή με PR-θετικούς όγκους έλαβαν είτε ταμοξιφαίνη 20 mg ημερησίως για 5 χρόνια είτε ταμοξιφαίνη για 2 χρόνια ακολουθούμενη από λετροζόλη για 3 χρόνια είτε μόνο λετροζόλη για 5 χρόνια. Όσες ασθενείς ήταν προεμμηνοπαυσιακές τέθηκαν σε φαρμακευτική ωοθηκική καταστολή με LHRH ανάλογα για 2 χρόνια.

Η παρακολούθηση των ασθενών έγινε στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής Ογκολογικής κλινικής, αρχικά κάθε τρεις μήνες για τα δυο πρώτα έτη, κάθε έξι μήνες έως τη συμπλήρωση πέντε ετών και στη συνέχεια μια φορά τον χρόνο. Ο έλεγχος περιελάμβανε κλινική εξέταση της ασθενούς, γενική αίματος, βιοχημικό έλεγχο, μέτρηση καρκινικών δεικτών, μαστογραφία, ακτινογραφία θώρακος και υπερηχογράφημα άνω κοιλίας (ή υπολογιστική

αξονική τομογραφία θώρακος και άνω-κάτω κοιλίας), σπινθηρογράφημα οστών ή όποια άλλη εξέταση κρίνόταν απαραίτητη.

2.2. Οι Μέθοδοι

2.2.1. Μοριακή ανίχνευση CK19mRNA+, MGB1mRNA+, HER2mRNA+ CTCs

2.2.1.1. Κλινικά δείγματα

Περιφερικό αίμα (20mL σε EDTA) είχε ληφθεί από κάθε ασθενή 3-4 εβδομάδες μετά το χειρουργείο και πριν από την έναρξη συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Για την αποφυγή επιμόλυνσης με επιθηλιακά κύτταρα από το δέρμα, αίμα για την ανάλυση μικρομεταστατικών κυττάρων λαμβανόταν στο μέσο της φλεβοκέντησης, αφού είχαν απορριφθεί τα πρώτα 5mL αίματος.

2.2.1.2. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)

Το αίμα (20mL) τοποθετείται σε σωληνάριο γενικής αίματος που περιέχει EDTA και ακολούθως μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 50mL. Στη συνέχεια, το αίμα αραιώνεται με ίσο όγκο στείρου διαλύματος PBS (8,0 g/L NaCl, 0,2g/L KCl, 1,15 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L K₂HPO₄, pH 7,3) και το διάλυμα επιστοιβάζεται σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου τύπου Falcon των 50mL, όπου έχει ήδη προστεθεί Ficoll με πυκνότητα 1,077g/mL (Ficoll-Histopaque 1077, Sigma) όγκου ίσου με 1/2 του όγκου του διαλύματος. Το αραιωμένο αίμα τοποθετείται με προσοχή πάνω στην επιφάνεια της Ficoll, ώστε να μην αναμειχθούν τα δυο υγρά και τελικά να σχηματισθούν δυο στιβάδες με αίμα και Ficoll.

Πραγματοποιείται διαβαθμισμένη φυγοκέντριση του δείγματος (στα 1.200 g, για 30 min, στους 4 °C). Μετά την φυγοκέντριση η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων βρίσκεται μεταξύ της στιβάδας της Ficoll και της στιβάδας ορού και PBS. Αφού συλλεγεί ο δακτύλιος των μονοπύρηνων σε ξεχωριστό αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρου με προσοχή, ώστε να αναρροφηθεί η ελάχιστη δυνατή ποσότητα Ficoll η οποία είναι κυτταροτοξική, τα μονοπύρηνια κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με PBS (50mL, φυγοκέντριση στα 1.600 g, για 10 min, στους 18 °C). Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα των κυττάρων είτε χρησιμοποιείται αμέσως, είτε φυλάσσεται στους -80 °C.

Μεταξύ των δυο εκπλύσεων με PBS γίνεται η καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων. Αναμειγνύονται 10μL από το διαλυμένο ίζημα με 90 μL χρωστικής κυανού του τρυπανίου (Sigma) και γίνεται μικροσκόπηση σε πλάκα κυτταρομέτρησης. Τα αποπτωτικά κύτταρα προσλαμβάνουν χρωστική (μπλε) και εξαιρούνται από την καταμέτρηση, όπως επίσης και τα ερυθρά με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους.

2.2.1.3. Απομόνωση ολικού RNA

Η μέθοδος που ακολουθείται για την απομόνωση του RNA αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi(188). Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να απομονωθεί το ολικό RNA από 0,1 έως 15 kb σε μήκος. Η εκχύλιση του RNA γίνεται χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol (Gibco, BRL). Η λύση των κυττάρων βασίζεται στην παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ενός αποδιατακτικού παράγοντα, ο

οποίος βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκα τους με το RNA και επιπλέον αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά τη λύση των κυττάρων. Η αναστολή αυτή επιτρέπει την απομόνωση μη αποδομημένου RNA. Η όλη προετοιμασία και ολοκλήρωση της μεθόδου, εκτός των φυγοκεντρίσεων, γίνεται σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής για εξασφάλιση συνθηκών ελεύθερων από μολύνσεις.

Αρχικά 1×10^6 κύτταρα αναμιγνύονται με 1 mL αντιδραστηρίου Trizol σε σωληνάρια από πολυπροπυλένιο και τα κύτταρα διασπώνται, αφού αναδευτούν και διαπεραστούν επανειλημμένως από σύριγγα ινσουλίνης (26 gauge needle). Όταν το διάλυμα γίνει διαυγές, επωάζεται για 5 min στους 15-30 °C και στη συνέχεια, αφού προστεθούν 200 μ L χλωροφορμίου, το μίγμα αναδεύεται μηχανικά για 15 sec. Το διάλυμα αφού επωαστεί για 10 min στους 15-30 °C, υποβάλλεται σε φυγοκέντρωση για 10 min στα 12.000 g, στους 4 °C.

Το διάλυμα κατά τη φυγοκέντρωση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: α. στην κατώτερη ερυθρωπή, οργανική φάση στην οποία παραμένουν οι πρωτεΐνες και όλα τα κυτταρικά υπολείμματα, β. στην λευκωπή μεσόφαση στην οποία παραμένει το DNA και γ. στην ανώτερη διαυγή, υδάτινη φάση στην οποία βρίσκεται το ολικό RNA των κυττάρων. Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε ένα στείρο, RNase-free σωληνάριο πολυπροπυλενίου, και προστίθεται ίση περίπου ποσότητα 100% ισοπροπανόλης (500 μ L) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 15 min και φυγοκέντρωση για 10 min στα

12.000g, στους 4 °C, οπότε η ισοπροπυλική αλκοόλη προκαλεί κατακρήμιση του RNA με τη μορφή ενός καθαρού πηκτώδους ιζήματος.

Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση του ιζήματος με 1 mL 75% αιθανόλη σε δισαπτεταγμένο νερό (ddH₂O) επεξεργασμένο με αναστολέα νουκλεασών DEPC (διεθυλπυροκαρβονικό άλας 97%, Sigma). Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και φυγοκέντρωση του για 5 min στα 7.500 g, στους 4 °C. Αν το ίζημα είναι έντονα λευκό επαναλαμβάνουμε την έκπλυση άλλη μια φορά.

Τέλος, αφού αποχυθεί το υπερκείμενο υγρό και στεγνώσει τελείως το ίζημα από την αιθανόλη (είτε εκτιθέμενο στο αέρα, είτε σε κενό αέρα για 5-10 min), επαναδιαλύεται σε 20-30 μL DEPC-ddH₂O, σε σωληνάριο τύπου eppendorf και τοποθετείται για 10 min στους 55-65 °C (είτε σε υδατόλουτρο, είτε σε κλίβανο), ώστε να ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση του RNA. Από το τελικό υδατικό διάλυμα χρησιμοποιείται 1 μL για ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA στη συσκευή nanodrop, ενώ το υπόλοιπο φυλάσσεται στους -80 °C, σε 2 κλάσματα, εάν είναι >20 μL, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.2.1.4. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) προς συμπληρωματικό DNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου «ανάστροφη μεταγραφάση» και χρησιμοποιείται το σύστημα Thermoscript RT-PCR (Gibco, BRL). Το ένζυμο για να ξεκινήσει την σύνθεση του cDNA χρειάζεται ένα αρχικό τμήμα συμπληρωματικό της 5'-3'-poly-(A) περιοχής του mRNA. Συνήθως, χρησιμοποιείται για τον ρόλο αυτό μια αλληλουχία πολυθυμίνης (oligo-dT). Η σύνθεση γίνεται με την προσθήκη ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs).

Αρχικά προετοιμάζεται σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf απαλλαγμένο από DNάσες (DNase-free), ένα μίγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει:

- α) δείγμα ολικού RNA (1-5 μg RNA, ανάλογα με την περίπτωση),
- β) εκκινητή (primer), όπου στην περίπτωση απλού πολυαδενυλικού RNA χρησιμοποιείται 1 μL Oligo (dT)₂₀ (50 μM) και
- γ) DEPC-H₂O σε ποσότητα που να συμπληρώνεται συνολικός όγκος του μίγματος 10 μL.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή επωάζοντας το μίγμα για 5 min στους 65 °C σε θερμικό κυκλοποιητή και άμεση τοποθέτησή του σε πάγο. Με τη διαδικασία αυτή, θέρμανσης και ψύξης, καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA.

Κατόπιν, αφού αναδευτεί το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφής για 5 sec σε κυκλικό αναδευτήρα (vortex), προετοιμάζεται το κύριο μίγμα της αντίδρασης σε τελικό όγκο 10 μL το οποίο περιλαμβάνει:

- α) 4 μL ρυθμιστικού διαλύματος για cDNA (5x),
- β) 1 μL διθειοθρεϊτόλης (DTT, 0.1 M),
- γ) 1 μL διαλύματος αναστολέα RNασών (RNaseOUT, 40 U/μL),
- δ) 1 μL DEPC-H₂O,
- ε) 2 μL μίγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTP mix, 10 mM), και
- στ) 1 μL αντίστροφης μεταγραφάσης (ThermOScript RT, 5 U/μL)

Το παραπάνω μίγμα προστίθεται στο αρχικό και στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση του δείγματος για 60 min στους 50 °C, όπου

υβριδοποιείται ο εκκινητής Oligo (dT)₂₀ και δρα η αντίστροφη μεταγραφάση, σε προθερμασμένο θερμικό κυκλοποιητή. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85 °C, όπου αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA-cDNA και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ τελικά στο διάλυμα προστίθεται 1 μL RNase H για την αποδόμηση του συμπληρωματικού RNA και ακολουθεί επώαση για 20 min στους 37 °C. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσεται στους -20 °C.

2.2.1.5. Δείκτες για την ανίχνευση CTCs

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή για την ανίχνευση των CTCs είναι η CK19, η MGB1 και το HER2.

2.2.1.6. Έλεγχος ποιότητας των RNA δειγμάτων της RT-PCR

Ο έλεγχος της ποιότητας των RNA δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με RT-PCR αντίδραση ενίσχυσης ενός γονιδίου βασικής λειτουργίας (housekeeping gene) της β-ακτίνης. Τα δείγματα με θετική ανίχνευση κατά την ηλεκτροφόρηση σε agarose gel 2%, θεωρούνται ότι βρίσκονται σε καλά διατηρημένη κατάσταση.

Στον πίνακα 2 περιγράφονται οι αλληλουχίες των 4 εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Στους πίνακες 3,4,5,6,7,8,9 και 10 περιγράφονται τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του cDNA της CK19, MGB1, HER2 και β-ακτίνης.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες των εκκινητών των 4 δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

Δείκτης	Μέθοδος	Εκκινητές	Αλληλουχία 5'-3'	Προϊόν	Ref
CK19	Real-time RT-PCR	Πρόσθιος1 Ανάστροφος1	GCACTACAGCCACTACTACACGA CTCATGCGCAGAGCCTGTT	159bp	(104)
		Ανιχνευτής υβριδισμού FL Ανιχνευτής υβριδισμού LC	TGTCCTGCAGATCGACAACGCCC-FL LCRed640-CTGGCTGCAGATGACTTCCGAACC		
MGB1	Nested RT-PCR	Πρόσθιος1 Ανάστροφος1	CAATCAATCCACAAGTGTCTAA AACATGTATAGCAGGTTTCAAC	1 st PCR 328bp	(81)
		Πρόσθιος2 Ανάστροφος2	ACGGATGAAACTCTGAGCAATG CAGTTCTGTGAGCCAAAGGT	2 nd PCR 106bp	
HER2	Nested RT-PCR	Πρόσθιος1 Ανάστροφος1	TCCTCCTCGCCCTCTTGC GCGGGTCTCCATTGTCTA	1 st PCR 330bp	(82)
		Πρόσθιος2 Ανάστροφος2	AGCCGCGAGCACCCAAGT TTGGTGGGCAGGTAGGTGAGT T	2 nd PCR 147bp	
β-ακτίνη	RT-PCR	Πρόσθιος Ανάστροφος	CATCCTGTCTGGCAATGCCAGG CTTCTTGGGCATGGAGTCCTG	154bp	

CK19: Κυτταροκερατίνη 19, MGB1: Mammaglobin- A, real time RT-PCR: Πραγματικού χρόνου, με ανάστροφη μεταγραφή, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, nested RT-PCR : Διπλή, με ανάστροφη μεταγραφή, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, bp:Ζεύγη βάσεων.

Πίνακας 3. Συνθήκες real-time PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA(104)

Στάδιο PCR	1 ^η PCR
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/5 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10sec
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	55 °C/20sec
Επέκταση εκκινητών	72 °C/20sec
Αριθμός κύκλων	50

Πίνακας 4. Συστατικά των αντιδράσεων real-time PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA(104)

Διαλύματα	Όγκος (μl)
	PCR
Πρόσθιος εκκινητής, (3 μM)	1
Ανάστροφος εκκινητής, (3 μM)	1
Ανιχνευτής υβριδισμού CK19-FL	1
Ανιχνευτής υβριδισμού CK19-LC	1
BSA (10μg/μl)	0.3
dNTPs, (10 μM)	0.4
MgCl ₂ , 50 mM	1
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς MgCl ₂),(10x)	2
cDNA	1
Ταq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2
DEPC-treated H ₂ O	11.1
Συνολικός όγκος, μL	20.0

Πίνακας 5. Συνθήκες διπλής PCR για την ενίσχυση του MGB1mRNA(81)

Στάδιο PCR	1 ^η PCR	2 ^η PCR
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 °C/5 min	94 °C/5 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 °C/45 s	94 °C/45 s
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	55 °C/30 s	62 °C/30 s
Επέκταση εκκινητών	72 °C/45 s	72 °C/45 s
Τελική επέκταση των εκκινητών	72 °C/5 min	72 °C/5 min
Αριθμός κύκλων	35	35

Πίνακας 6. Συστατικά των αντιδράσεων διπλής PCR για την ενίσχυση του MGB1mRNA(81)

Διαλύματα	Προστιθέμενος όγκος (μL)	
	1 ^η PCR	2 ^η PCR
Πρόσθιος εκκινητής, (3 μM)	1,25	1,25
Ανάστροφος εκκινητής, (3 μM)	1,25	1,25
dNTPs, (10 μM)	0,5	0,5
MgCl ₂ , 50 mM	1,25	1,25
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς MgCl ₂), (10x)	2,5	2,5
cDNA	1	-
Προϊόν 1 ^{ης} PCR	-	1
Ταq πολυμεράση, 5 U/μL	0,2	0,2
DEPC-treated H ₂ O	17,05	17,05
Συνολικός όγκος, μL	25,00	25,00

Πίνακας 7. Συνθήκες διπλής PCR για την ενίσχυση του HER2mRNA(82)

Στάδιο PCR	1 ^η PCR	2 ^η PCR
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/6min	94°C/3min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/50sec	94°C/30sec 72 °C/30sec (5cycles) 70 °C/30sec (5cycles)
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	58 °C/2.30min	68 °C/30sec (5cycles) 66 °C/30sec (5cycles) 64 °C/30sec (5cycles) 62°C/30sec (15cycles)
Επέκταση εκκινητών	72 °C/30sec	72 °C/30sec
Τελική επέκταση των εκκινητών	72 °C/10min	72 °C/7min
Αριθμός κύκλων	35	40

Πίνακας 8. Συστατικά των αντιδράσεων διπλής PCR για την ενίσχυση του HER2mRNA(82)

Διαλύματα	Προστιθέμενος όγκος (μL)	
	1 ^η PCR	2 ^η PCR
Πρόσθιος εκκινητής, (100 mM)	0.4	0.4
Ανάστροφος εκκινητής, (100 mM)	0.4	0.4
dNTPs, (10 μM)	1	1
MgCl ₂ , 50 mM	1.5	1.5
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς MgCl ₂), (10x)	5	5
cDNA	5	
Προϊόν 1 ^{ης} PCR		10
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.5	0.5
DEPC-treated H ₂ O	36.2	31.2
Συνολικός όγκος, μL	50	50

Πίνακας 9 Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης

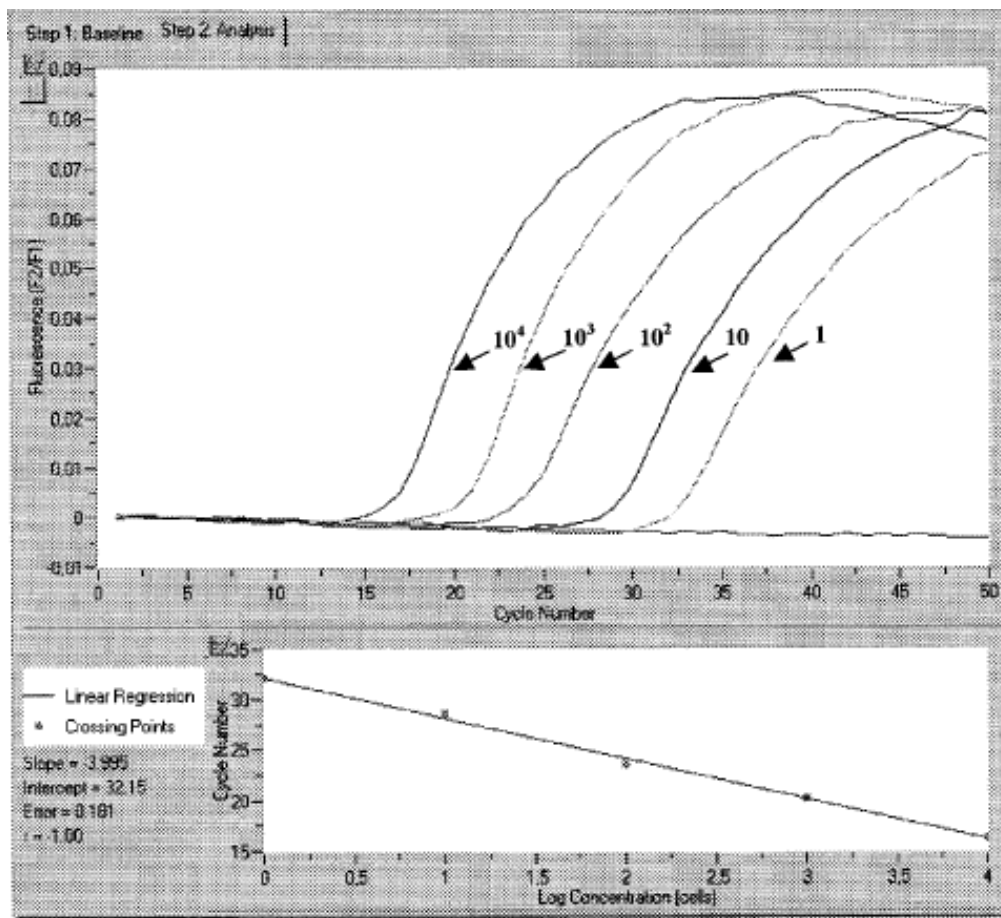
Στάδιο PCR	Συνθήκες
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 °C - 2 min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 °C - 30 sec
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	60 °C - 30 sec
Επέκταση εκκινητών	72 °C - 45 sec
Τελική επέκταση των εκκινητών	72 °C - 4 min
Αριθμός κύκλων	35

Πίνακας 10 Συστατικά της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης

Διαλύματα	Προστιθέμενος όγκος (μL)
Πρόσθιος εκκινητής, 10 μM	1
Ανάστροφος εκκινητής, 10 μM	1
dNTPs, 5 μM	2
MgCl ₂ , 50 mM	1,5
10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς MgCl ₂)	5
cDNA	1
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0,2
DEPC-treated H ₂ O	36,3
Συνολικός όγκος	50,0

2.2.1.7. Ευαισθησία και ειδικότητα RT-PCR πολλαπλών δεικτών

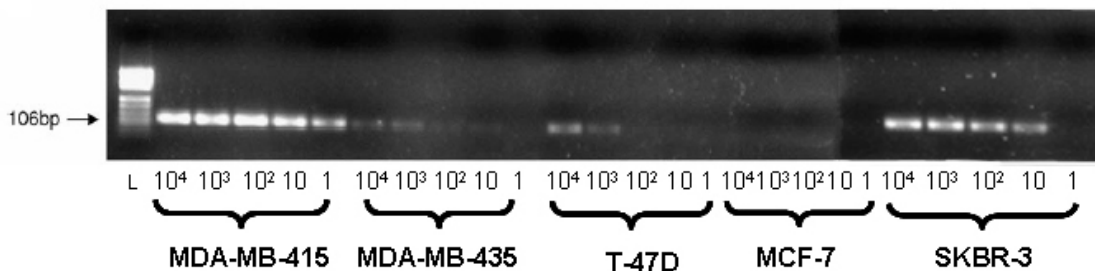
Η πραγματικού χρόνου RT-PCR μέθοδος για την ανίχνευση CK19mRNA+ αναπτύχθηκε από την Σταθοπούλου και συνεργάτες(104). Με βάση το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της μεθόδου, η παρουσία ≥ 0.6 MCF-7 ισοδυνάμων/5μg ολικού RNA θεωρήθηκε θετικό αποτέλεσμα (Εικ. 7).



Εικ 7. Χαρακτηριστικές καμπύλες πραγματικού χρόνου RT-PCR για τη CK19 χρησιμοποιώντας cDNA από διαδοχικές αραιώσεις RNA που αντιστοιχεί σε 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 MCF-7 κύτταρα, αντίστοιχα. (Αναδημοσίευση από το Stathopoulou et al Clin Cancer Res 2003; 9:5145-5151)

Χρησιμοποιώντας το ανωτέρω cut-off, μόνο 2 από τις 89 υγιείς γυναίκες ήταν θετικές (2.2%) (104). Επιπλέον χρησιμοποιώντας την παραπάνω μέθοδο καμία από τις 9 γυναίκες με καλοήγη νόσο του μαστού δεν είχε θετικό δείγμα αίματος.

Η διπλή RT-PCR για την ανίχνευση MGB1mRNA+ κυττάρων αναπτύχθηκε από την Ντούλια και συνεργάτες(81). Για τον καθορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου, διαδοχικές αραιώσεις RNA από 5 κυτταρικές σειρές, τις MDA-MB-415, MDA-MB-435, T-47D, SKBR-3 and MCF-7, που αντιστοιχούν σε 1, 10, 10², 10³ and 10⁴ κύτταρα για κάθε κυτταρική σειρά χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση cDNA. Η διπλή RT-PCR μπορούσε να ανιχνεύσει MGB1mRNA που αντιστοιχεί σε 1 MDA-MB-415, 10 SKBR-3, 10³ MDA-MB-435 και 10³ T-47D κύτταρα, αντίστοιχα (Εικ 8).

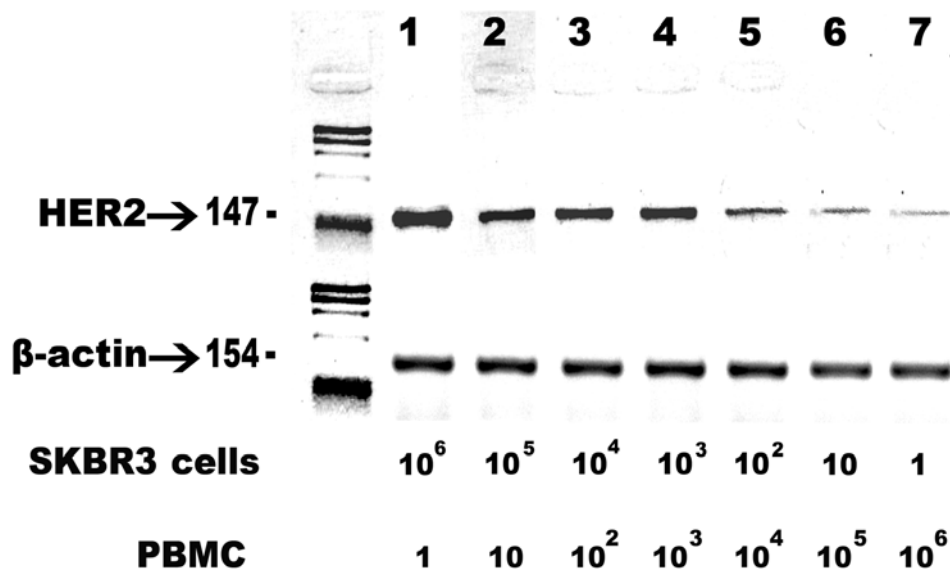


Εικ 8. Όριο ανίχνευσης της διπλής PCR για mRNA της mammaglobin-A σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose 2% w/v) με διπλή PCR, L-Δείκτης μοριακών βαρών 100 bp, Διαδοχικές αραιώσεις 10⁴-1/μl κύτταρο των κυτταρικών σειρών MDA-MB-415, MDA-MB-435, T-47D, MCF-7 και SK-BR-3.

Το MGB1mRNA είχε ασθενή έκφραση στην MCF-7 κυτταρική σειρά. Η μέθοδος ήταν εξαιρετικά ειδική καθώς καμία από τις 30 υγιείς γυναίκες, τις 20 γυναίκες με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο και τις 20 γυναίκες με μη

μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, οι οποίες ελέγχθηκαν, δεν είχε θετικό δείγμα(81).

Τέλος, η διπλή RT-PCR για την ανίχνευση των HER2mRNA+ κυττάρων αναπτύχθηκε από τις Αποστολάκη, Περράκη και συνεργάτες (189). Για να μελετηθεί η ευαισθησία της μεθόδου, αναμίχθηκαν MCF-7 και SKBR3 κύτταρα με φυσιολογικά PBMCs σε αναλογία από 1:10 σε 1:10⁶, απομονώθηκε ολικό RNA από αυτές τις κυτταρικές αραιώσεις και ελέγχθηκε για HER2mRNA με διπλή RT-PCR. Σε 3 από τα 3 πειράματα, η μέθοδος μπορούσε να ανιχνεύσει 1 MCF-7 κύτταρο σε 10⁵ και 1 SKBR3 κύτταρο σε 10⁶ φυσιολογικά PBMCs. Στην εικόνα 9 φαίνεται ένα δοσοεξαρτώμενο 147bp σήμα που αντιστοιχεί στο HER2 mRNA της σειράς SKBR3, ενώ το 154bp σήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο της β-ακτίνης, έχει την ίδια ένταση σε όλες τις αραιώσεις. HER2mRNA+ κύτταρα δεν ανιχνεύθηκαν σε καμιά από τις 31 υγιείς γυναίκες, τις 20 ασθενείς με μεταστατικό κολορθικό καρκίνο και τις 12 γυναίκες με καλοήθεις παθήσεις του μαστού (82;189).



Εικ 9. Δοσοεξαρτώμενο 147bp σήμα που αντιστοιχεί στο HER2 mRNA της σειράς SKBR3, ενώ το 154bp σήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο της β-ακτίνης, έχει την ίδια ένταση σε όλες τις αραιώσεις.

Συνολικά η ευαισθησία της RT-PCR πολλαπλών δεικτών ελέγχθηκε σε πειράματα ενοφθαλισμού αίματος υγιών δοτών με κύτταρα από τις κυτταρικές σειρές MCF-7 και SKBR3. Σε 3 από τα 4 πειράματα, η παραπάνω μέθοδος μπορούσε να ανιχνεύσει 1 MCF-7 ή 1 SKBR3 κύτταρα σε 10^6 φυσιολογικά PBMCs. Η ειδικότητα της RT-PCR πολλαπλών δεικτών ερευνήθηκε σε 31 υγιείς γυναίκες. Από αυτές, 30 ήταν αρνητικές και για τους 3 δείκτες, ενώ μια είχε το CK19mRNA+/MGB1mRNA-/HER2mRNA- μοριακό προφίλ.

2.2.2. Ανίχνευση CTCs με την τεχνική του ανοσοφθορισμού

PBMCs απομονώθηκαν με διαβαθμισμένη φυγοκέντριση χρησιμοποιώντας Ficoll-Hyraque ($d=1.077\text{g/mol}$) στα 1800rpm για 30min. Τα απομονωθέντα PBMCs εκπλύθηκαν με PBS και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντριση στα 1500rpm για 10min. Τελικά διάλυμα που περιείχε 250000 κύτταρα υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση σε θετικά φορτισμένη αντικειμενοφόρο πλάκα.

Με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού μελετήθηκε η έκφραση κυτταροκερατινών, της MGB1 και του HER2 σε cytopins από PBMCs 10 ασθενών με καρκίνο του μαστού. Δύο διαφορετικά αντισώματα παγκυτταροκερατίνης χρησιμοποιήθηκαν: το A45-B/B3 ένα anti-mouse μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για τη CK8, CK18 και CK19 (Micromet Munich, Germany) ή ένα anti-rabbit πολυκλωνικό αντίσωμα παγκυτταροκερατίνης (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ανάλογα με το δεύτερο αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως(166). Σε όλα τα πειράματα έχει χρησιμοποιηθεί 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, USA) για τη χρώση του πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, cytopins από PBMCs μονιμοποιήθηκαν με κρύο διάλυμα ακετόνης:μεθανόλης 9:1 για 20 min και υποβλήθηκαν σε χρώση για κυτταροκερατίνη με το απαραίτητο αντίσωμα. Στη συνέχεια, το ίδιο δείγμα επωάσθη με MGB1 anti-goat πολυκλωνικό (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ή με HER2 anti-mouse μονοκλωνικό αντίσωμα (Oncogene, Dermstadt, Germany), αντίστοιχα για 45 min. Στη συνέχεια εκθέσαμε τα κύτταρα για 1 h στο αντίστοιχο δευτερεύον αντίσωμα: Rhodamine anti-rabbit

(Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) για την παγκυτταροκερατίνη, FITC anti-mouse (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) για το A45-B/B3 ή το HER2 και Rhodamine anti-goat (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) για τη MGB1. Πειράματα διπλής χρώσης πραγματοποιήθηκαν επίσης για την MGB1 και το HER2 ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο. Τα slides εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας laser συνεστιακή μικροσκοπία (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) και οι εικόνες αναλύθηκαν με το αντίστοιχο λογισμικό. Κάθε δείκτης εξετάσθηκε επίσης σε συνδυασμό με anti-CD45 αντίσωμα (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), για να αποκλεισθεί η συνέκφραση των 2 δεικτών στα αιμοποιητικά κύτταρα.

2.2.3. Ανοσοϊστοχημεία στον πρωτοπαθή όγκο για την έκφραση του HER2 και της MGB1

Η έκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα CB11 (Novacastra, Newcastle Upon Tyne, UK), και το OPTIMAX αυτοματοποιημένο σύστημα (Biogenex Laboratories, San Ramon, CA, USA). Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων βασίσθηκε στα κριτήρια που προτείνει η DAKO A/S για το HercepTest.

Όσον αφορά την έκφραση της MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο, αυτή μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα MGB1 (Biologo Bioprime, Kronshagen, Germany) σε 1/50 αραιώση μετά από ολονύχτια επώαση και το AP polymer (Lab Vision, Fremont, CA, USA) σύστημα με Fast Red ως χρωμογόνο. Τομές από καρκίνο του μαστού γνωστής

θετικότητας χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Αρνητικοί μάρτυρες έγιναν αντικείμενο επεξεργασίας, αφού παραλείφθηκε το πρωτοπαθές αντίσωμα και αντικαταστάθηκε με μη άνοσο ορό. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα που χρησιμοποίησαν οι Watson και συνεργάτες (124): 0: αρνητική χρώση, 1: ασθενής σποραδική χρώση σε λιγότερο από 50% των καρκινικών κυττάρων, 2: ασθενής σποραδική χρώση σε περισσότερο από 50% των καρκινικών κυττάρων, 3: έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση σε λιγότερο από 50% των καρκινικών κυττάρων, και 4: έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση σε περισσότερο από 50% των καρκινικών κυττάρων. Μόνο το αποτέλεσμα 3 ή 4 θεωρήθηκε MGB1-θετικό.

2.3. Στατιστική ανάλυση

Δεδομένα περιγραφικής στατιστικής εκφράστηκαν ως μέσοι όροι (mean) και ως ποσοστά (%). Συνεχείς μεταβλητές συγκρίθηκαν ανάμεσα στις δύο υποομάδες με unpaired t-test, ενώ δίτιμες μεταβλητές συγκρίθηκαν με chi-square or Fisher's exact test. Ο χρόνος από την ένταξη στη μελέτη ως την υποτροπή της νόσου (Επιβίωση Ελεύθερη Νόσου, Disease Free Survival, DFS) και ο χρόνος από την ένταξη στην μελέτη ως το θάνατο (Ολική Επιβίωση, Overall Survival, OS) ήταν οι κύριες εξαρτημένες μεταβλητές της μελέτης. Οι καμπύλες της DFS και της OS για τις διάφορες υποομάδες των ασθενών δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier(190) και συγκρίθηκαν με το log-rank test για μια μονοπαραγοντική ανάλυση της προγνωστικής σημασίας της ανεύρεσης μικρομεταστατικών κυττάρων με τη χρήση διαφόρων δεικτών κατά την ένταξη

στην μελέτη. Γνωστοί προγνωστικοί κλινικο-παθολογικοί παράγοντες, όπως η εμμηνοπαυσιακή κατάσταση της γυναίκας (προεμμηνοπαυσιακή vs μετεμμηνοπαυσιακή), το μέγεθος του όγκου (T2-3 vs T1), η διήθηση μασχαλαίων λεμφαδένων (ναι vs όχι), ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (III vs I-II), ο υποδοχέας οιστρογόνων (αρνητικός vs θετικός), ο υποδοχέας προγεστερόνης (αρνητικός vs θετικός), η έκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο (αρνητική vs θετική), το σχήμα χημειοθεραπείας (FEC/EC-T vs CMF) και επιπλέον η ανίχνευση CK19mRNA+ κυττάρων (ναι vs όχι), MGB1mRNA+ κυττάρων (ναι vs όχι), και HER2mRNA+ κυττάρων (ναι vs όχι), ελέγχθησαν με μονοπαραγοντική ανάλυση. Μεταβλητές οι οποίες βρέθηκαν να είναι σημαντικές στη μονοπαραγοντική ανάλυση εντάχθηκαν σε πολυπαραγοντικό Cox μοντέλο αναλογικής παλινδρόμησης κινδύνου (stepwise multivariate Cox proportional hazards model), ώστε να ανευρεθούν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για DFS και OS (191). Είσοδος και απόσυρση από το μοντέλο ορίστηκε στο 5% και 10%, αντίστοιχα. Όλες οι στατιστικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν στο 5% επίπεδο σημαντικότητας. Το SPSS 15 στατιστικό πακέτο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση

2.4. Αποτελέσματα

2.4.1. Χαρακτηριστικά των ασθενών και ανίχνευση CTCs.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αποτυπώνονται στον Πίνακα 11. Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν 54 χρόνια (εύρος 28-75 χρόνια) και 66.9% υπεβλήθησαν σε ογκεκτομή. Από τις 175 ασθενείς, 41.1% ήταν

προεμμηνοπαυσιακές, 66.9% είχαν όγκο > 2cm, 44.6% είχαν όγκο με ιστολογικό βαθμό κακοήθειας III, 41.1% είχαν όγκο με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς και 68% είχαν διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων. Συνολικά, CK19mRNA+, MGB1mRNA+ και HER2mRNA+ κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε 72 (41.1%), 14 (8%) και 50 (28.6%) από τις 175 ασθενείς, αντιστοίχως. Η ανίχνευση CTCs δεν συσχετίστηκε με κανένα από τα γνωστά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, εκτός από την ανίχνευση MGB1mRNA+ κυττάρων, η οποία συσχετίστηκε σημαντικά με την παρουσία πρωτοπαθούς όγκου > 2cm (Πίνακας 11). Με βάση την ανίχνευση των 3 μοριακών δεικτών οι ασθενείς είχαν ένα από τα παρακάτω μοριακά προφίλ: CK19mRNA+ / MGB1mRNA+ / HER2mRNA+ (n=8), CK19mRNA+ / MGB1mRNA+ / HER2mRNA- (n=1), CK19mRNA+ / MGB1mRNA- / HER2mRNA+ (n=42), CK19mRNA+ / MGB1mRNA- / HER2mRNA- (n=21), CK19mRNA- / MGB1mRNA+ / HER2mRNA- (n=5), CK19mRNA- / MGB1mRNA- / HER2mRNA- (n=98).

Πίνακας 11. Χαρακτηριστικά των ασθενών

	Ασθενείς	CK19 mRNA+	MGB1 mRNA+	HER2 mRNA+
	No (%)	No (%)	No (%)	No (%)
Ασθενείς	175	72 (41.1)	14 (8)	50 (28.6)
Ηλικία				
Διάμεση (μέγιστη, ελάχιστη)	54 (28-75)	54.5 (28-74)	57.5 (37-75)	55 (28-74)
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση				
Προεμμηνοπαυσιακή	72 (41.1)	31 (43.1)	4 (5.6)	21 (29.2)
Μετεμμηνοπαυσιακή	103 (58.9)	41 (39.8)	10 (9.7)	29 (28.2)
Μέγεθος όγκου				
≤ 2.0cm	58 (33.1)	21 (36.2)	1 (1.7)	14 (24.1)
> 2.0cm	117 (66.9)	51 (43.6)	13 (11.1)	36 (30.8)
Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης				
I/II	84 (48)	35 (41.7)	8 (9.5)	24 (28.6)
III	78 (44.6)	31 (39.7)	4 (5.1)	23 (29.5)
Λοβιδιακό/άγνωστο	13 (7.4)	6	2	3
Διηθημένοι Λεμφαδένες				
0	56 (32)	24 (42.9)	4 (7.1)	16 (28.6)
1-3	49 (28)	19 (38.8)	4 (8.2)	14 (28.6)
≥ 4	70 (40)	29 (41.4)	6 (8.6)	20 (28.6)
Υποδοχέας οιστρογόνων				
Θετικός	101 (57.7)	41 (40.6)	7 (6.9)	29 (28.7)
Αρνητικός	72 (41.1)	31 (43.1)	7 (9.7)	21 (29.2)
Άγνωστος	2 (1.1)			
Υποδοχέας προγεστερόνης				
Θετικός	67 (38.3)	31 (46.3)	5 (7.5)	21 (31.3)
Αρνητικός	106 (60.6)	41 (38.7)	9 (8.5)	29 (27.4)
Άγνωστος	2 (1.1)			
HER2				
Αρνητικό 0, 1+, 2+ IHC	124 (70.9)	55 (44.4)	10 (8.1)	38 (30.6)
Θετικό 3+ IHC	48 (27.4)	16 (33.3)	3 (6.3)	11 (22.9)
Άγνωστο	3 (1.7)	1	1	1
Χειρουργείο				
Ογκεκτομή	117 (66.9)	47 (40.2)	9 (7.7)	33 (28.2)
Μαστεκτομή	58 (33.1)	25 (43.1)	5 (8.6)	17 (29.3)
Χημειοθεραπεία				
CMF	26 (14.9)	11 (42.3)	3 (11.5)	8 (30.8)
FEC	95 (54.3)	39 (41.1)	7 (7.4)	27 (28.4)
T/EC	54 (30.9)	22 (40.7)	4 (7.4)	15 (27.8)
Υποτροπές	49 (28)	32 (65.3)	9 (18.4)	25 (51)
Θάνατοι	26 (14.9)	16 (61.5)	5 (19.2)	11 (42.3)

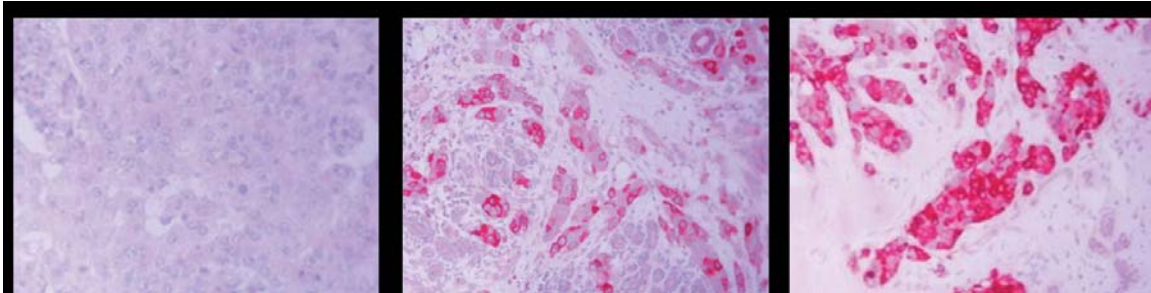
ER: υποδοχέας οιστρογόνων; PR: υποδοχέας προγεστερόνης; HER2: cerbB2, L: ογκεκτομή; M: μαστεκτομή, IHC: ανοσοϊστοχημεία; FEC: 5-φθοριουρακίλη, επιρουβικίνη, κυκλοφωσφαμίδη; EC-T: επιρουβικίνη, κυκλοφωσφαμίδη – δοσεταξέλη; CMF: κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη, 5-φθοριουρακίλη CK19: Κυτταροκερατίνη 19, MGB1: Mammaglobin-A

2.4.2. Έκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο και ανίχνευση CTCs

Από τις 175 ασθενείς, 48 (27.4%) είχαν HER2-θετικό πρωτοπαθή όγκο (IHC 3+). Ταυτόχρονη ανίχνευση CK19mRNA+ και HER2mRNA+ κυτάρων παρατηρήθηκε σε 11 από 48 (22.9%) ασθενείς με HER2-θετικό πρωτοπαθή όγκο και σε 38 από 124 (30.6%) ασθενείς με HER2-αρνητικό πρωτοπαθή όγκο. Όλοι οι ασθενείς που είχαν HER2mRNA+ δείγματα αίματος ήταν επίσης CK19mRNA+.

2.4.3. Έκφραση της MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο και ανίχνευση CTCs

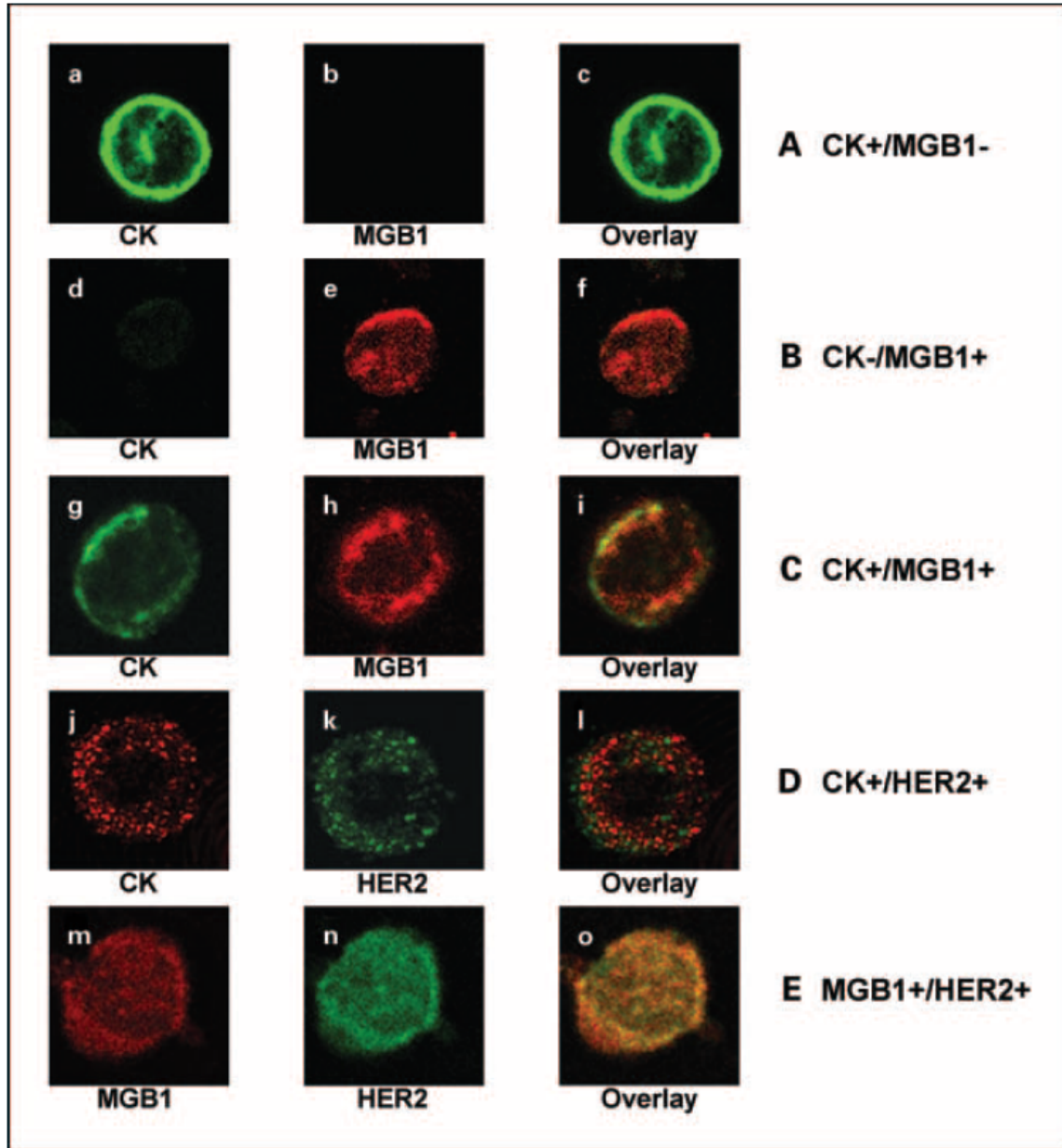
Από 28 ασθενείς στους οποίους ήταν διαθέσιμα μπλοκ παραφίνης από τον πρωτοπαθή όγκο, 9 ασθενείς ήταν MGB1-θετικοί: (score 3 και 4) και 19 ασθενείς χαρακτηρίστηκαν MGB1-χαμηλής έκφρασης/αρνητικοί (score 2, 1, 0). Χαρακτηριστικές φωτογραφίες χρώσης με MGB1 σε πρωτοπαθείς όγκους καρκίνου του μαστού από τους ανωτέρω ασθενείς απεικονίζονται στην εικόνα 10. Με ενδιαφέρον παρατηρήσαμε ότι τρεις από τους 19 ασθενείς με MGB1-χαμηλής έκφρασης/αρνητικούς όγκους είχαν ανιχνεύσιμα MGB1mRNA+ κύτταρα. Τα ανωτέρω αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών που εξετάστηκαν.



Εικ 10. Χαρακτηριστικά παραδείγματα χρώσης της mammaglobin-A σε 3 διαφορετικές περιπτώσεις πρωτοπαθούς όγκου καρκίνου του μαστού: αρνητική χρώση (A), ασθενής και σποραδική χρώση (B), έντονη διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση (C). (A,B,C: Μεγένθυση x40).

2.4.4. Ανοσοφαινότυπος CTCs

Πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού επιβεβαίωσαν την παρουσία των ακόλουθων φαινοτύπων CTCs: CK+/MGB1+, CK+/MGB1-, CK-/MGB1+, CK+/HER2+, CK+/HER2-, MGB1+/HER2- and MGB1+/HER2+. Πέντε χαρακτηριστικοί ανοσοφαινότυποι CTCs από 5 διαφορετικές ασθενείς απεικονίζονται στην Εικ11. Έξι από τις 10 ασθενείς που εξετάστηκαν είχαν πάνω από ένα ανοσοφαινότυπο CTCs. Υπήρχε 100% συμφωνία ανάμεσα στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων, όπως αυτός καθορίστηκε με ανοσοφθορισμό, και το μοριακό προφίλ, όπως διαπιστώθηκε με RT-PCR για τις 10 ανωτέρω ασθενείς.



Εικ 11. A,B,C,D,E. Πέντε διαφορετικοί ανοσοφαινότυποι CTCs από 5 διαφορετικούς ασθενείς: CK+/MGB1- (A), CK-/MGB1+ (B) CK+/MGB1+ (C), CK+/HER2+ (D), MGB1+/HER2+ (E).

(A,B,C): Αντιπροσωπευτική μικρογραφία με τη χρήση laser συνεστιακού μικροσκοπίου τομών από cytoprins μονοπυρήνων κυττάρων περιφερικού αίματος στα οποία εφαρμόστηκε διπλή χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα παγκυτταροκερατίνης A45-B/B3 (πράσινο, a,d,g), πολυκλωνικό αντίσωμα mamaglobin-A, (κόκκινο, b,e,h) και overlay τομές (c, f, i). (Μεγένθυση x600).

(D): Αντιπροσωπευτική μικρογραφία με τη χρήση laser συνεστιακού μικροσκοπίου τομών από cytoprins μονοπυρήνων κυττάρων περιφερικού αίματος στα οποία εφαρμόστηκε διπλή χρώση με πολυκλωνικό αντίσωμα παγκυτταροκερατίνης (κόκκινο, j) και HER2 μονοκλωνικό αντίσωμα (πράσινο, k) και overlay τομές (l). (Μεγένθυση x600).

(E): Αντιπροσωπευτική μικρογραφία με τη χρήση laser συνεστιακού μικροσκοπίου τομών από cytoprins μονοπυρήνων κυττάρων περιφερικού αίματος στα οποία εφαρμόστηκε διπλή χρώση με

πολυκλωνικό αντίσωμα mammaglobin-A, (κόκκινο, m), και HER2 μονοκλωνικό αντίσωμα (πράσινο, n) και overlay τομές (o). (Μεγένθυση x600).
(Αναδημοσίευση από το Ignatiadis et al Clin Cancer Res 2008;14: 2593-2600).

2.4.5. Μοριακό προφίλ CTCs και κλινική έκβαση

Κατά τη διάμεση περίοδο παρακολούθησης της μελέτης, 15 (15.3%) υποτροπές συνέβησαν στις 98 ασθενείς χωρίς κανένα θετικό δείκτη (CK19, MGB1, HER2) στο περιφερικό αίμα έναντι 8 (30.7%) υποτροπών στις 26 ασθενείς με 1 θετικό δείκτη, 20 (46.5%) υποτροπών στις 43 ασθενείς με 2 θετικούς δείκτες και 6 (75%) υποτροπών στις 8 ασθενείς με 3 θετικούς δείκτες (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Ομάδες ασθενών με βάση το μοριακό προφίλ των CTCs και κλινική έκβαση

Δείκτες (+) / 3 δείκτες	A	CK19 mRNA	MGB1 mRNA	HER2 mRNA	Υ	Θ	Διάμεση DFS χρόνια (95% CI)	P*	Διάμεση OS	P*
0	98	-	-	-	15	9	ΔΕ		ΔΕ	
1	26	+	-	-	8	5	ΔΕ	.092	ΔΕ	.202
2	43	-	+	-	20	9	7.25 (6-8.5)	<.001	ΔΕ	.104
3	8	+	+	+	6	3	2 (0-4.1)		ΔΕ	
Total	175				49	26	ΔΕ		ΔΕ	

A: Ασθενείς, CK19: Κυτταροκερατίνη 19, MGB1: Mammaglobin-A, Υ: Υποτροπές, Θ: Θάνατοι, DFS: Επιβίωση Ελεύθερη Νόσου, OS: Ολική επιβίωση, 95% CI: 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης, ΔΕ: Δεν επιτεύχθηκε

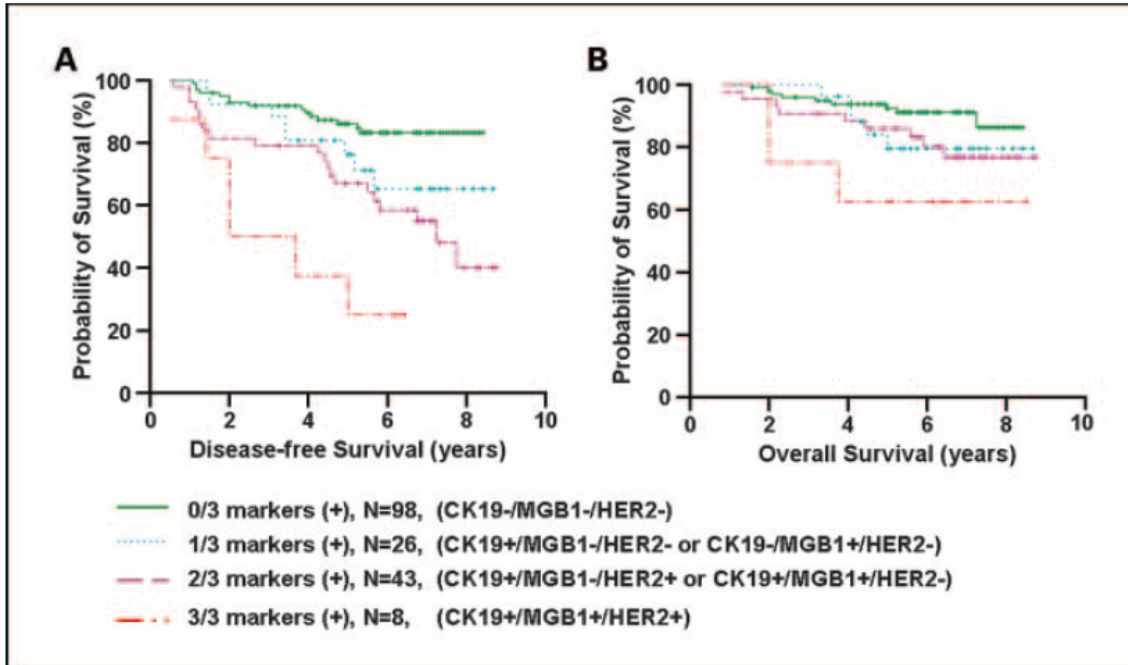
*P: αναφέρεται στη σύγκριση με την ομάδα στην οποία όλοι οι δείκτες είναι αρνητικοί (CK19mRNA-/MGB1mRNA-/HER2mRNA-),

Συγκρίσεις με τη χρήση του log-rank τεστ έγιναν μόνο ανάμεσα σε ομάδες που είχαν τουλάχιστον 20 ασθενείς η κάθε μια.

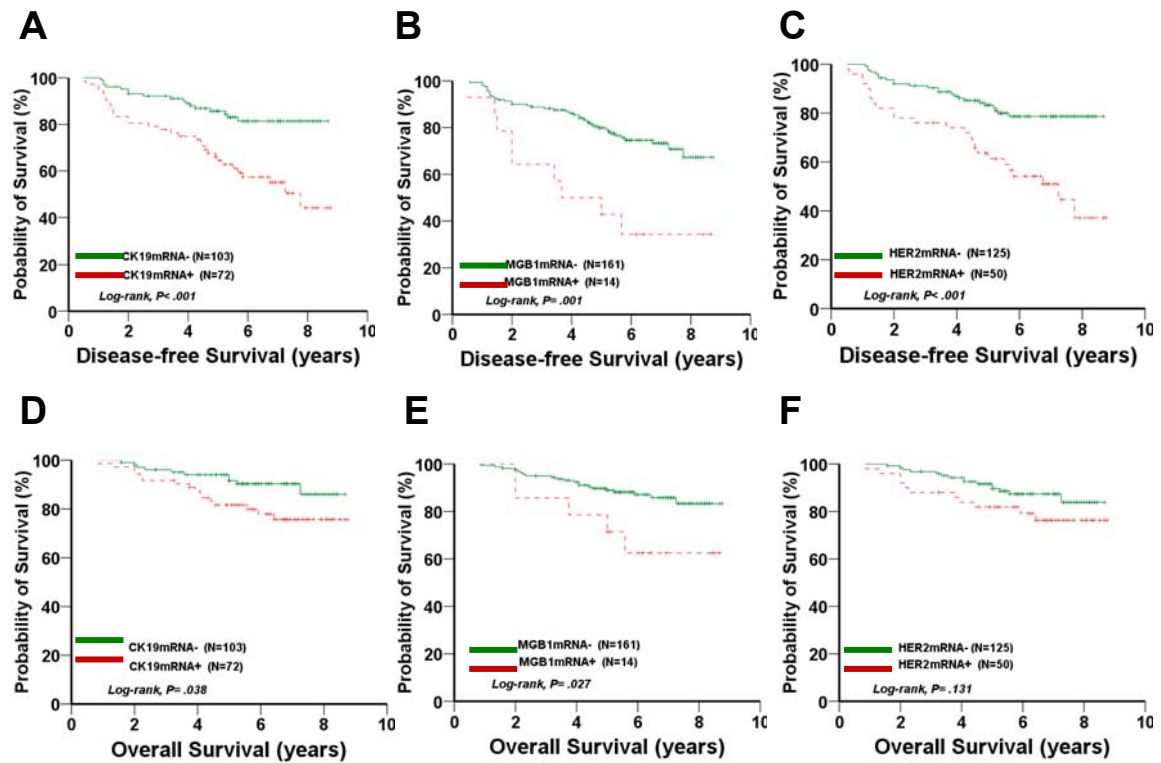
Η εκτιμώμενη διάμεση DFS ήταν 2 έτη (95% CI 0-4.079 χρόνια) για τις ασθενείς με 3 θετικούς δείκτες, 7.250 χρόνια (95% CI 5.994-8.506 χρόνια) για τις ασθενείς με 2 θετικούς δείκτες, ενώ η διάμεση DFS δε μπορεί να εκτιμηθεί ακόμη για τις ασθενείς με ένα ή κανένα θετικό δείκτη (Εικ. 12A). Επιπλέον, σε σχέση με τις ασθενείς χωρίς θετικό δείκτη, οι ασθενείς με ένα θετικό δείκτη είχαν μια μη στατιστικώς σημαντική τάση για μικρότερη DFS (log-rank test, $p=0.092$), ενώ οι ασθενείς με 2 και 3 θετικούς δείκτες είχαν στατιστικώς σημαντικά μικρότερη DFS (log-rank tests, $p<0.001$ και $p<0.001$, αντίστοιχα). Η εκτιμώμενη 5-ετής DFS για τις ασθενείς με 3,2,1 και 0 θετικό δείκτη ήταν 25%, 67%, 76.3% και 86%, αντίστοιχα.

Παρομοίως, 9 (9.1%) θάνατοι συνέβησαν από τις 98 ασθενείς χωρίς θετικό δείκτη, 5 (19.2%) από τις 26 ασθενείς με 1 θετικό δείκτη, 9 (20.9%) από τις 43 ασθενείς με 2 θετικούς δείκτες και 3 (37.5%) από τις 8 ασθενείς με 3 θετικούς δείκτες (Πίνακας 9). Η διάμεση OS για τις ανωτέρω υποομάδες ασθενών δεν μπορεί να εκτιμηθεί (Εικ. 12B). Ωστόσο σε σχέση με ασθενείς χωρίς θετικό δείκτη, ασθενείς με ένα και δύο θετικούς δείκτες είχαν μια μη στατιστικώς σημαντική τάση για χειρότερη OS (log-rank tests, $p=0.076$ και 0.104 , αντίστοιχα), ενώ ασθενείς με 3 θετικούς δείκτες είχαν στατιστικώς σημαντικά μικρότερη OS (log-rank test, $p=0.010$). Η εκτιμώμενη 5-ετής OS για τις ασθενείς με 3,2,1 και 0 θετικούς δείκτες ήταν 62.5%, 85.9%, 79.5% και 92.4%, αντίστοιχα.

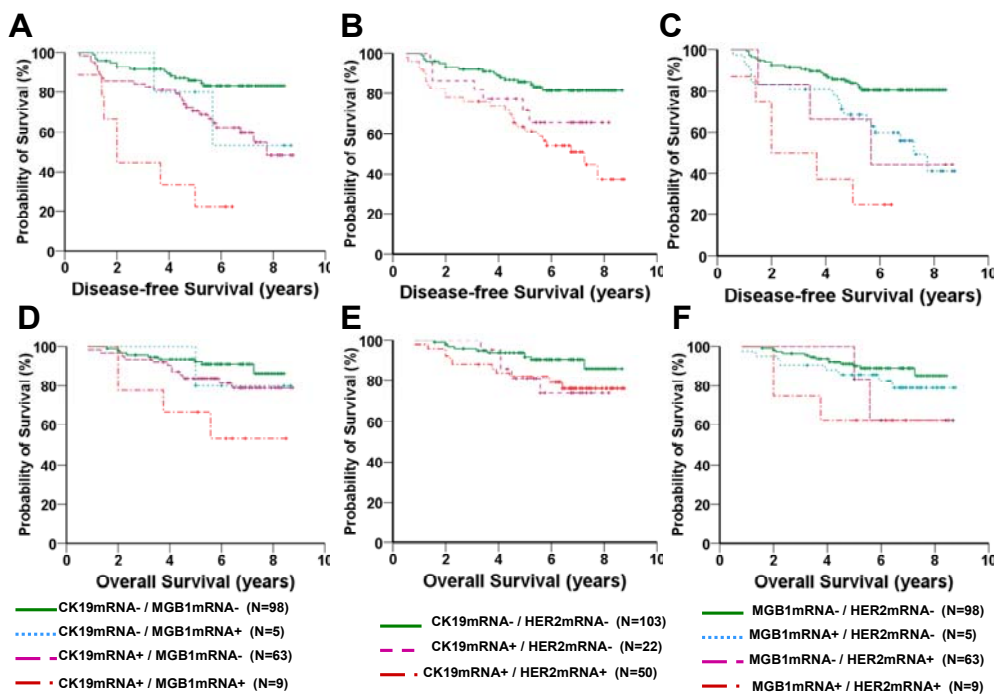
Η συσχέτιση ανάμεσα στην ανίχνευση ενός μόνο δείκτη (CK19, MGB1, HER2) ή συνδυασμού 2 δεικτών (CK19/MGB1, CK19/HER2, MGB1/HER2) και DFS/OS παρουσιάζονται στις Εικ.13,14 αντίστοιχα.



Εικ 12. A,B. Ελεύθερη νόσου επιβίωση (A) και ολική επιβίωση (B) σε υποομάδες ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με βάση τη μοριακή ανίχνευση CTCs χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό 3 δεικτών (CK19, MGB1 και HER2). (Αναδημοσίευση από το Ignatiadis et al Clin Cancer Res 2008;14: 2593-2600).



Εικ. 13. A,B,C,D,E,F. Ελεύθερη νόσου επιβίωση (A,B,C) και ολική επιβίωση (D,E,F) σε υποομάδες ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με βάση τη μοριακή ανίχνευση CTCs χρησιμοποιώντας έναν μόνο από τους 3 δείκτες (CK19, MGB1 και HER2), κάθε φορά. (Αναδημοσίευση από το Ignatiadis et al Clin Cancer Res 2008;14: 2593-2600).



Εικ. 14. A,B,C,D,E,F. Ελεύθερη νόσου επιβίωση (A,B,C) και ολική επιβίωση (D,E,F) σε υποομάδες ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με βάση τη μοριακή ανίχνευση CTCs χρησιμοποιώντας 3 ζεύγη δεικτών (CK19, MGB1), (CK19, HER2), (MGB1, HER2), κάθε φορά. (Αναδημοσίευση από το Ignatiadis et al Clin Cancer Res 2008;14: 2593-2600).

2.4.6. Μονοπαραγοντική και Πολυπαραγοντική ανάλυση

Στη μονοπαραγοντική ανάλυση, παράγοντες που σχετίστηκαν με στατιστικώς σημαντικά ελαττωμένη DFS ήταν το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου >2cm, όγκοι με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, η ανίχνευση CK19mRNA+ κυτάρων, MGB1mRNA+ κυτάρων και HER2mRNA+ κυτάρων, ενώ η ανίχνευση CK-19mRNA+ κυτάρων και MGB1mRNA+ κυτάρων επίσης σχετίστηκε σημαντικά με ελαττωμένη OS (Πίνακας13).

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, όγκοι με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς και η ανίχνευση CK19mRNA+ κυττάρων και MGB1mRNA+ κυττάρων ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για χειρότερη DFS (Πίνακας14). Η ανίχνευση CK19mRNA+ κυττάρων και MGB1mRNA+ κυττάρων δεν ήταν οριακά ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένη OS (Πίνακας14).

Πίνακας 13. Μονοπαραγοντική ανάλυση για την επιβίωση ελεύθερη νόσου και την ολική επιβίωση σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Παράμετρος	Hazard Ratio	95% CI	p
DFS			
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση (προ vs μετά)	0.739	0.410-1.331	0.313
Μέγεθος του όγκου (T2-3 vs T1)	2.292	1.112-4.725	0.025
Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (III vs I/II)	1.661	0.911-3.030	0.098
Διηθημένοι λεμφαδένες (ναι vs όχι)	1.587	0.827-3.046	0.165
Υποδοχέας οιστρογόνων (αρνητικός vs θετικός)	2.446	1.375-4.350	0.002
Υποδοχέας προγεστερόνης (αρνητικός vs θετικός)	1.072	0.597-1.923	0.816
HER2, πρωτοπαθής όγκος (αρνητικός vs θετικός)	1.651	0.920-2.963	0.093
Συμπληρωματική χημειοθεραπεία (FEC/T-EC vs CMF)	1.708	0.677-4.310	0.257
CK19 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	2.967	1.647-5.344	<0.001
MGB1 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	3.275	1.586-6.763	0.001
HER2 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	2.869	1.638-5.025	<0.001
OS			
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση (προ vs μετά)	1.032	0.474-2.246	0.938
Μέγεθος του όγκου (T2-3 vs T1)	2.670	0.920-7.750	0.071
Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (III vs I/II)	1.806	0.781-4.173	0.167
Διηθημένοι λεμφαδένες (ναι vs όχι)	2.836	0.977-8.234	0.055
Υποδοχέας οιστρογόνων (αρνητικός vs θετικός)	2.122	0.973-4.626	0.058
Υποδοχέας προγεστερόνης (αρνητικός vs θετικός)	1.040	0.472-2.293	0.922
HER2, πρωτοπαθής όγκος (αρνητικός vs θετικός)	1.249	0.539-2.896	0.604
Συμπληρωματική χημειοθεραπεία (FEC/T-EC vs CMF)	1.459	0.438-4.863	0.538
CK19 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	2.257	1.024-4.977	0.044
MGB1 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	2.867	1.081-7.606	0.034
HER2 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	1.806	0.828-3.938	0.137

CK19: Κυτταροκερατίνη 19, MGB1: Mammaglobin-A, 95% CI: 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης,

Πίνακας 14. Ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες με πολυπαραγοντική ανάλυση για DFS και OS σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού

Παράμετρος	Hazard Ratio	95% CI	P
DFS			
Μέγεθος του όγκου (T2-3 vs T1)	1.954	0.899-4.248	0.091
Υποδοχέας οιστρογόνων (αρνητικός vs θετικός)	2.459	1.375-4.398	0.002
CK19 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	3.085	1.687-5.642	<0.001
MGB1 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	2.633	1.251-5.541	0.011
HER2 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	1.781	0.750-4.229	0.191
OS			
CK19 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	2.102	0.947-4.665	0.068
MGB1 mRNA+ κύτταρα (ναι vs όχι)	2.521	0.942-6.745	0.066

CK19: Κυτταροκερατίνη 19, MGB1: Mammaglobin-A, 95% CI: 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης, DFS: Επιβίωση Ελεύθερη Νόσου, OS: Ολική επιβίωση,

2.5. Συζήτηση

Σε προηγούμενη μας δημοσίευση δείξαμε ότι η ανίχνευση στο περιφερικό αίμα με real-time RT-PCR, CK19mRNA+ κυττάρων πριν την έναρξη συμπληρωματικής χημειοθεραπείας είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη DFS και OS σε γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού(40;41). Στην παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι χρησιμοποιώντας μια RT-PCR με 3 δείκτες, η ανίχνευση CK19mRNA+ και MGB1mRNA+ κυττάρων ήταν και οι δύο ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για ελαττωμένη OS. Η ανίχνευση HER2mRNA+ κυττάρων ήταν προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη DFS σε μονοπαραγοντική ανάλυση, αλλά δεν διατήρησε ανεξάρτητη προγνωστική αξία για μειωμένη DFS στην πολυπαραγοντική ανάλυση.

Επιπλέον, η RT-PCR πολλαπλών δεικτών, που χρησιμοποιήθηκε εμφάνισε ελαφρώς αυξημένη ευαισθησία για την ανίχνευση CTCs σε σχέση με την RT-PCR ενός δείκτη (CK19), ανιχνεύοντας 5 επιπλέον CK19-/MGB1+/HER2- ασθενείς. Δύο από αυτές τις 5 ασθενείς υποτροπίασαν και μια πέθανε από καρκίνο του μαστού. Σε μία από αυτές τις 5 ασθενείς, cytopins από PBMCS ήταν διαθέσιμα και η παρουσία CK-/MGB1+ κυττάρων επιβεβαιώθηκε με ανοσοφθορισμό (Eικ11B). Ο φαινότυπος CK-/MGB1+ έχει ήδη δημοσιευθεί ως ένας σπάνιος ανοσοφαινότυπος των CTCs(192). Επιπλέον οι ακόλουθοι φαινότυποι CTCs παρατηρήθηκαν σε 10 ασθενείς που μελετήθηκαν: CK+/MGB1+, CK+/MGB1-, CK+/HER2+, CK+/HER2-, MGB1+/HER2- και

MGB1+/HER2+. Υπήρχε 100% συμφωνία ανάμεσα στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων, όπως αυτός καθορίστηκε με ανοσοφθορισμό, και το μοριακό προφίλ, όπως διαπιστώθηκε με RT-PCR για τις 10 ανωτέρω ασθενείς. Ωστόσο, τα ανωτέρω αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών που μελετήθηκαν.

Αν και στη μελέτη μας, η ανίχνευση της MGB1 αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη DFS, η χαμηλή της ευαισθησία (μόνο 8% θετικοί ασθενείς) περιορίζει την περαιτέρω ανάπτυξή της ως δείκτη με κλινική σημασία. Η ανίχνευση της MGB1 θα μπορούσε να βελτιωθεί, αν προσθέσουμε ένα στάδιο εμπλουτισμού επιθηλιακών κυττάρων με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια, όπως έχει ήδη δημοσιευθεί από άλλους ερευνητές(66). Τα ποσοστά ανίχνευσης της MGB1 στον πρώιμο καρκίνο του μαστού ποικίλλουν σημαντικά στις δημοσιευμένες μελέτες από 2 σε 22% (86;90;91;145). Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης που έχουν χρησιμοποιηθεί με διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα, στους διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών που έχουν μελετηθεί και πιθανώς στην έλλειψη δεδομένων που συγκρίνουν την έκφραση MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο και την έκφραση της στο αίμα. Ένα από τα μειονεκτήματα της παρούσας μελέτης είναι η έλλειψη στοιχείων για την έκφραση της MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο. Μόνο πρωτοπαθείς όγκοι από 28 ασθενείς, στους οποίους το μπλοκ παραφίνης ήταν διαθέσιμο, εξετάστηκαν και η MGB1 βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε 9 (32%) από αυτούς. Ήταν ενδιαφέρον ότι MGB1mRNA+ κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε 3 από τους 19 ασθενείς των οποίων ο πρωτοπαθής

όγκος δεν υπερέκφραζε MGB1. Κατά πόσο αυτή η διαφοροποίηση στην έκφραση της MGB1 μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και του περιφερικού αίματος οφείλεται στις διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ή στο γεγονός ότι υπάρχει διαφορά στην έκφραση μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των μικρομεταστατικών κυττάρων, όπως έχει ήδη αναφερθεί για την έκφραση του HER2 (178), δεν μπορεί να διευκρινιστεί λόγω του χαμηλού αριθμού των ασθενών που εξετάστηκαν. Η ανίχνευση της έκφρασης της MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο με ανοσοϊστοχημεία έχει διαπιστωθεί από άλλους ερευνητές σε ένα ποσοστό μόνο των ασθενών με καρκίνο του μαστού 48-80% (193). Ομοίως, στο επίπεδο του mRNA, αν και η MGB1 έχει βρεθεί να εκφράζεται στο 93% των ασθενών με καρκίνο του μαστού, τα επίπεδα έκφρασης της MGB1 ποικίλλουν πάνω από 10,000 φορές (125). Υψηλά επίπεδα έκφρασης της MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο έχουν σχετισθεί με όγκους με λιγότερο επιθετικό φαινότυπο (χαμηλού βαθμού κακοήθειας, ER-θετικοί όγκοι) (125). Προς το παρόν, δεν είναι γνωστό αν η διαφορετική έκφραση της MGB1 στον πρωτοπαθή όγκο επηρεάζει την ανίχνευση κυκλοφορούντων MGB1mRNA+ κυττάρων.

Με δεδομένο ότι η έκφραση της ογκοπρωτεΐνης του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο έχει σχετισθεί με πτωχή πρόγνωση, διάφοροι ερευνητές έχουν μελετήσει την έκφραση του HER2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα (73;74;82;83). Στην παρούσα διατριβή από τους 77 ασθενείς, που είχαν ανιχνεύσιμα μικρομεταστατικά κύτταρα με την RT-PCR πολλαπλών δεικτών, 50 (64.9%) είχαν HER2-θετικά κύτταρα. Οι ασθενείς αυτοί είχαν χειρότερη πρόγνωση από τους ασθενείς με HER2-αρνητικά μικρομεταστατικά κύτταρα. Αν και οι ανωτέρω

μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικές μεθόδους για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό του HER2 status των CTCs/DTCs, έχουν ανιχνευθεί HER2-θετικά κύτταρα από όλους τους ερευνητές στους μισούς περίπου ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα μικρομεταστατικά κύτταρα. Οι ασθενείς αυτοί έχουν χειρότερη πρόγνωση από ό,τι οι ασθενείς με CTCs/DTCs που δεν εκφράζουν HER2.

Παρότι η RT-PCR των 3 δεικτών βελτίωσε σε μικρό βαθμό την ευαισθησία ανίχνευσης CTCs σε σχέση με την RT-PCR ενός δείκτη (CK19), η παρουσία 2 ή 3 θετικών δεικτών στο περιφερικό αίμα σχετίστηκε με προοδευτικά χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με την παρουσία ενός θετικού δείκτη. Γι' αυτό η RT-PCR των 3 δεικτών έχει προγνωστική αξία για τη διαστρωμάτωση των ασθενών σε μελέτες χορήγησης συμπληρωματικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Έχουν δημοσιευθεί από άλλους ερευνητές διάφορες RT-PCR πολλαπλών δεικτών για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Οι Taback και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), τον υποδοχέα c-Met, την 134-N-acetylgalactosaminyl-transferase, και το καρκινικό αντιγόνο MAGE-A3, για να αναπτύξουν μια RT-PCR πολλαπλών δεικτών την οποία συνδύασαν με ένα αυτόματο σύστημα ηλεκτροχημικής ανίχνευσης για την αναζήτηση CTCs στον καρκίνο του μαστού (78). Οι Zehentner και συνεργάτες διάλεξαν 4 διαφορετικούς δείκτες, (Mammaglobin-A, B305D, GABRP and B726P), για να αναπτύξουν μια πολλαπλών δεικτών πραγματικού χρόνου RT-PCR για την ανίχνευση CTCs στον καρκίνο του μαστού (152). Οι Bosma και

συνεργάτες χρησιμοποίησαν ποσοτική RT-PCR 4 δεικτών (*p1B*, *PS2*, *CK19*, και *EGP2*), για να ανιχνεύσουν μικρομεταστατικά κύτταρα στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού. Ο Chen και συνεργάτες ανέπτυξαν μια μέθοδο βασισμένη σε συστοιχίες για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών mRNA δεικτών για την διάγνωση του καρκίνου του μαστού(67). Σε καμιά από τις παραπάνω δημοσιεύσεις η ανίχνευση CTCs με τη χρήση RT-PCR πολλαπλών δεικτών δεν έχει συσχετισθεί με την κλινική έκβαση των ασθενών. Η δημοσίευση της παρούσας διατριβής είναι η πρώτη μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία στην οποία η ανίχνευση CTCs με τη χρήση μιας RT-PCR πολλαπλών δεικτών έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού (80).

Όσον αφορά τη χρήση της RT-PCR πολλαπλών δεικτών ως εργαλείου πρόβλεψης, η παρουσία HER2mRNA+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα, στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή ασθενών που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από θεραπείες έναντι του HER2(178). Πρώιμα αποτελέσματα από μια υποανάλυση της μελέτης NSABP B-31 έχουν δείξει ότι το όφελος από τη συμπληρωματική χορήγηση trastuzumab μπορεί να μη περιορίζεται αποκλειστικά στους ασθενείς με IHC3+ or FISH-θετικούς πρωτοπαθείς όγκους (194). Το όφελος από τη χορήγηση trastuzumab σε ασθενείς με HER2-αρνητικό πρωτοπαθή όγκο μπορεί να σχετίζεται με την αποτελεσματική στόχευση HER2-θετικών CTCs (178). Στη μελέτη μας, CK19mRNA+ και HER2 mRNA+ κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε 38 από τις 124 (30.6%) γυναίκες με HER2-αρνητικούς πρωτοπαθείς όγκους και αυτές οι γυναίκες δε θα μπορούσαν, με βάση τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες, να

λάβουν trastuzumab. Η ομάδα μας, όπως και άλλες ερευνητικές ομάδες, έχουν δείξει ότι το trastuzumab μπορεί να εκκαθαρίσει με αποτελεσματικότητα τα CTCs και DTCs που υπερεκφράζουν το HER2, ανεξάρτητα από την έκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο σε γυναίκες με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο του μαστού (164;178). Επιπλέον, δεν είναι σαφές αν ασθενείς με HER2-θετικό πρωτοπαθή όγκο, χωρίς όμως την ανίχνευση HER2-θετικών CTCs και/ή DTCs, ωφελούνται λιγότερο από τη συμπληρωματική χορήγηση trastuzumab, καθώς η παρουσία μικρομεταστατικών κυττάρων δεν μελετήθηκε στις κλινικές μελέτες του trastuzumab στον πρώιμο καρκίνο του μαστού(185-187). Ομοίως, η παρουσία στο περιφερικό αίμα, MGB1mRNA+ κυττάρων στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή ασθενών που θα μπορούσαν δυνητικά να ωφεληθούν από ένα εμβόλιο εναντίον MGB1+ κυττάρων(195).

Ο ρόλος της ανωτέρω RT-PCR πολλαπλών δεικτών ως προγνωστικού εργαλείου στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, καθώς και ως εργαλείου πρόβλεψης για ανταπόκριση σε θεραπείες έναντι του HER2 και της MGB1, θα πρέπει να εκτιμηθεί σε προοπτικές μελέτες όπου η προγνωστική και / ή η προβλεπτική αξία της ανίχνευσης CTCs θα είναι ο πρωταρχικός στόχος της μελέτης (184).

3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η μελέτη της προγνωστικής αξίας της μοριακής ανίχνευσης Κυκλοφορούντων Καρκινικών Κυττάρων (CTCs) χρησιμοποιώντας 3 δείκτες [Cytokeratin(CK) 19, Mammaglobin A (MGB1) και HER2] στον πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Πειραματικός σχεδιασμός: Ανιχνεύθηκαν CK19mRNA+, MGB1mRNA+, και HER2mRNA+ κύτταρα χρησιμοποιώντας real-time (CK19) και nested (MGB1 and HER2) RT-PCR, στο περιφερικό αίμα 175 γυναικών με καρκίνο του μαστού σταδίου I-III πριν την χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Η ανίχνευση CTCs σχετίστηκε με την κλινική έκβαση. Σε 10 ασθενείς πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού, για να μελετηθεί η συνέκφραση της CK, MGB1 και του HER2 στα CTCs.

Αποτελέσματα: Στους 175 ασθενείς ανιχνεύθηκαν CK19mRNA+, MGB1mRNA+ και HER2mRNA+ κύτταρα σε 41.1%, 8% και 28.6% αντίστοιχα. Οι ασθενείς είχαν ένα από τα ακόλουθα μοριακά προφίλ: CK19mRNA+/MGB1mRNA+/HER2mRNA+ (n=8), CK19mRNA+/MGB1mRNA+/HER2mRNA- (n=1), CK19mRNA+/MGB1mRNA-/HER2mRNA+ (n=42), CK19mRNA+/MGB1mRNA-/HER2mRNA- (n=21), CK19mRNA-/MGB1mRNA+/HER2mRNA- (n=5), CK19mRNA-/MGB1mRNA-/HER2mRNA- (n=98). Πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού επιβεβαίωσαν την παρουσία των ακόλουθων φαινοτύπων CTCs: CK+/MGB1+, CK+/MGB1-, CK-/MGB1+, CK+/HER2+, CK+/HER2-, MGB1+/HER2- and MGB1+/HER2+. Σε

μονοπαραγοντική ανάλυση, η ανίχνευση CK19mRNA+, MGB1mRNA+ και HER2mRNA+ κυττάρων σχετίσθηκε με ελαττωμένη επιβίωση ελεύθερη νόσου (DFS), ($p < 0.001$, $p = 0.001$ και $p < 0.001$, αντίστοιχα), ενώ η ανίχνευση CK19mRNA+ and MGB1mRNA+ CTCs σχετίσθηκε με μειωμένη συνολική επιβίωση ($p = 0.044$ και $p = 0.034$, αντίστοιχα). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, οι όγκοι αρνητικοί για τον υποδοχέα οιστρογόνων και η ανίχνευση CK19mRNA+ και MGB1mRNA+ κυττάρων ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες ελαττωμένης DFS.

Συμπέρασμα: Η ανίχνευση στο περιφερικό αίμα CK19mRNA+ και MGB1mRNA+ κυττάρων πριν την χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας είναι προγνωστικός παράγοντας ελαττωμένης DFS σε γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού.

3.2. SUMMARY

Purpose: To investigate the prognostic value of the molecular detection of Circulating Tumor Cells (CTCs) using 3 markers [Cytokeratin(CK) 19, Mammaglobin A (MGB1) and HER2] in early breast cancer.

Experimental design: CK19mRNA+, MGB1mRNA+, and HER2mRNA+ cells, were detected using real-time (CK19) and nested (MGB1 and HER2) RT-PCR, in the peripheral blood of 175 women with stage I-III breast cancer before the initiation of adjuvant chemotherapy. CTCs' detection was correlated with clinical outcome. In 10 patients, immunofluorescence staining experiments were performed to investigate the co-expression of CK, MGB1 and HER2 in CTCs.

Results: CK19mRNA+, MGB1mRNA+ and HER2mRNA+ cells were detected in 41.1%, 8% and 28.6% of the 175 patients, respectively. Patients had one of the following molecular profiles: CK19mRNA+/MGB1mRNA+/HER2mRNA+ (n=8), CK19mRNA+/MGB1mRNA+/HER2mRNA- (n=1), CK19mRNA+/MGB1mRNA-/HER2mRNA+ (n=42), CK19mRNA+/MGB1mRNA-/HER2mRNA- (n=21), CK19mRNA-/MGB1mRNA+/HER2mRNA- (n=5), CK19mRNA-/MGB1mRNA-/HER2mRNA- (n=98). Double immunofluorescence experiments confirmed the following CTC phenotypes: CK+/MGB1+, CK+/MGB1-, CK-/MGB1+, CK+/HER2+, CK+/HER2-, MGB1+/HER2- and MGB1+/HER2+. In univariate analysis, the detection of CK19mRNA+, MGB1mRNA+ and HER2mRNA+ cells was associated with shorter disease-free survival (DFS), ($p < 0.001$, $p = 0.001$ and $p < 0.001$, respectively), whereas the detection of CK19mRNA+ and

MGB1mRNA+ cells was associated with worse overall survival ($p=0.044$ and $p=0.034$, respectively). In multivariate analysis, estrogen receptor-negative tumors and the detection of CK19mRNA+ and MGB1mRNA+ cells were independently associated with worse DFS.

Conclusion: The detection of peripheral blood CK19mRNA+ and MGB1mRNA+ cells before adjuvant chemotherapy predicts poor DFS in women with early breast cancer.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Reference List

- (1) Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18(3):581-592.
- (2) Goldhirsch A, Wood W, Gelber R, Coates A, Thurlimann B, Senn HJ et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007; 18(7):1133-1144.
- (3) Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22(3):207-219.
- (4) Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N et al. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):980-991.
- (5) Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(12):2716-2725.
- (6) Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12(5):888-894.
- (7) Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr* 1994;(16):35-42.
- (8) Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63(1):181-187.
- (9) Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17):3628-3636.
- (10) Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of

patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983; 52(9):1551-1557.

- (11) Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 1996; 276(22):1818-1822.
- (12) Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology* 2008; 75:104-111.
- (13) Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19(5):403-410.
- (14) de M, I, Bonichon F, Durand M, Mauriac L, MacGrogan G, Soubeyran I et al. Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. *Eur J Cancer* 1998; 34(1):58-65.
- (15) Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Save-Soderbergh J, Davis BW, Reed R et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10(5):696-705.
- (16) Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(27):2817-2826.
- (17) Gong Y, Yan K, Lin F, Anderson K, Sotiriou C, Andre F et al. Determination of oestrogen-receptor status and ERBB2 status of breast carcinoma: a gene-expression profiling study. *Lancet Oncol* 2007; 8(3):203-211.
- (18) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472):1687-1717.
- (19) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 351(9114):1451-1467.
- (20) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(1):118-145.

- (21) Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(8):2334-2356.
- (22) Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(33):5287-5312.
- (23) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797):747-752.
- (24) Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19):10869-10874.
- (25) Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(14):8418-8423.
- (26) Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(18):10393-10398.
- (27) van't Veer LJ, Dai H, van dV, He YD, Hart AA, Mao M et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415(6871):530-536.
- (28) van de Vijver, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(25):1999-2009.
- (29) Buyse M, Loi S, van't VL, Viale G, Delorenzi M, Glas AM et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(17):1183-1192.
- (30) Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(4):262-272.

- (31) Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W et al. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2006.
- (32) Marchionni L, Wilson RF, Wolff AC, Marinopoulos S, Parmigiani G, Bass EB et al. Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Ann Intern Med* 2008; 148(5):358-369.
- (33) Ignatiadis M, Desmedt C. Predicting risk of breast cancer recurrence using gene-expression profiling. *Pharmacogenomics* 2007; 8(1):101-111.
- (34) Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355(6):560-569.
- (35) Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(12):913-920.
- (36) Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von MG, Solomayer EF et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(22):1652-1658.
- (37) Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(8):525-533.
- (38) Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(8):793-802.
- (39) Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002; 20(16):3404-3412.
- (40) Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24(23):3756-3762.
- (41) Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M et al. Different prognostic value of Cytokeratin-19 mRNA-positive

Circulating Tumor Cells according to estrogen receptor and HER2 status in early breast cancer . J Clin Oncol 2007; 25:5194-5202.

- (42) Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. Nat Rev Cancer 2008; 8(5):329-340.
- (43) Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. Cancer Cell 2008; 13(1):58-68.
- (44) Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C et al. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. Cancer Cell 2005; 8(3):227-239.
- (45) Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(8):4494-4499.
- (46) Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. Lancet 2002; 360(9334):683-689.
- (47) Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. Clin Cancer Res 2002; 8(7):2073-2084.
- (48) Slade MJ, Coombes RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. Nat Clin Pract Oncol 2007; 4(1):30-41.
- (49) Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. Endocr Relat Cancer 2006; 13(4):1033-1067.
- (50) Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer 2004; 4(6):448-456.
- (51) Ignatiadis M, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating tumor cells in breast cancer. Curr Opin Obstet Gynecol 2008; 20(1):55-60.
- (52) Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. Br J Cancer 2005; 92(5):906-912.
- (53) Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD 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. *J Clin Oncol* 2000; 18(7):1432-1439.
- (54) Kagan M, Howard D, Bendele T, Mayes J, Silvia J, Repollet M et al. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *J Clin Ligand Assay* 2002; 25:104-110.
- (55) Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, Hsieh HB, Kuhn P, Bergsrud DE et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29):10501-10504.
- (56) Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(6):617-627.
- (57) Pantel K, Otte M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin Cancer Biol* 2001; 11(5):327-337.
- (58) Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450(7173):1235-1239.
- (59) Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(13):1113-1124.
- (60) Jung R, Kruger W, Hosch S, Holweg M, Kroger N, Gutensohn K et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998; 78(9):1194-1198.
- (61) Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5(2):79-88.
- (62) Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 1997; 15(7):2701-2708.
- (63) Kowalewska M, Chechlinska M, Markowicz S, Kober P, Nowak R. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer* 2006; 42(16):2671-2674.
- (64) Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the

- quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(7):1654-1659.
- (65) Benoy IH, Elst H, Van Dam P, Scharpe S, Van Marck E, Vermeulen PB et al. Detection of circulating tumour cells in blood by quantitative real-time RT-PCR: effect of pre-analytical time. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(9):1082-1087.
- (66) Reinholz MM, Nibbe A, Jonart LM, Kitzmann K, Suman VJ, Ingle JN et al. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10):3722-3732.
- (67) Chen CC, Hou MF, Wang JY, Chang TW, Lai DY, Chen YF et al. Simultaneous detection of multiple mRNA markers CK19, CEA, c-Met, Her2/neu and hMAM with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Lett* 2006; 240(2):279-288.
- (68) Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de WJ, Willgeroth F et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18(1):80-86.
- (69) Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005; 103(5):884-891.
- (70) Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):960-971.
- (71) Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49(1):27-33.
- (72) Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 1999; 354(9174):197-202.
- (73) Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G et al. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61(5):1890-1895.

- (74) Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Kramer B, Vogel U et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98(2):179-184.
- (75) Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(8):781-791.
- (76) Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Prunzel R, Hart AA et al. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res* 2002; 8(6):1871-1877.
- (77) Wong NS, Kahn HJ, Zhang L, Oldfield S, Yang LY, Marks A et al. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99(1):63-69.
- (78) Taback B, Chan AD, Kuo CT, Bostick PJ, Wang HJ, Giuliano AE et al. Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: correlation with clinical stage of disease. *Cancer Res* 2001; 61(24):8845-8850.
- (79) Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP et al. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5(5):971-975.
- (80) Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multi-marker RT-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; in press.
- (81) Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V et al. Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem* 2006; 39(9):879-887.
- (82) Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Bozionelou V, Agelaki S, Kanellou P et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007; 18(5):851-858.
- (83) Wulfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zanker KS, Kiesel L et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6):1715-1720.

- (84) Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118(8):2013-2019.
- (85) Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de CP, Nos C, Blin N et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10(4):1392-1400.
- (86) Benoy IH, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van DP, Scharpe S et al. 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; 94(5):672-680.
- (87) Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* 2002; 8(5):1085-1091.
- (88) Kahn HJ, Yang LY, Blondal J, Lickley L, Holloway C, Hanna W et al. RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 60(2):143-151.
- (89) De Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Bourstyn E, Nos C et al. Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000; 6(8):3117-3122.
- (90) Silva AL, Tome MJ, Correia AE, Passos-Coelho JL. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol* 2002; 13(3):422-429.
- (91) Zach O, Kasparu H, Wagner H, Krieger O, Lutz D. Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients. *Acta Med Austriaca Suppl* 2002; 59:32-34.
- (92) Silva HA, Abraul E, Raimundo D, Dias MF, Marques C, Guerra C et al. Molecular detection of EGFRvIII-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2006; 42(15):2617-2622.
- (93) Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(21):6403-6409.

- (94) Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14 Pt 1):4218-4224.
- (95) Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer* 2007; 7(6):471-479.
- (96) Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3):920-928.
- (97) Baker MK, Mikhitarian K, Osta W, Callahan K, Hoda R, Brescia F et al. Molecular detection of breast cancer cells in the peripheral blood of advanced-stage breast cancer patients using multimarker real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and a novel porous barrier density gradient centrifugation technology. *Clin Cancer Res* 2003; 9(13):4865-4871.
- (98) Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Dieras V, Mathiot C, Mignot L et al. Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 2008; .
- (99) Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9(10):1749-1756.
- (100) Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998; 16(2):557-566.
- (101) Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Jaeger W, Mitze M. Micrometastases in axillary lymph nodes and bone marrow of lymph node-negative breast cancer patients--prognostic relevance after 10 years. *Anticancer Res* 2003; 23(5b):4319-4324.
- (102) Savtchenko ES, Freedberg IM, Choi IY, Blumenberg M. Inactivation of human keratin genes: the spectrum of mutations in the sequence of an acidic keratin pseudogene. *Mol Biol Evol* 1988; 5(1):97-108.
- (103) Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 80(1):119-125.

- (104) Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5145-5151.
- (105) Xenidis N, Apostolaki S, Perraki M, Politaki E, Kalbakis K, Ignatiadis M et al. Circulating CK-19 mRNA (+) cells in patients with stage I and II breast cancer after the completion of adjuvant chemotherapy: evaluation of their prognostic relevance. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106(Suppl 1):abst 109.
- (106) Rack B, Schindlbeck C, Hofmann S, Schneeweiss A, Rezai M, Beckmann M et al. Circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of primary breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; Part I. Vol 25, No. 18S:abstr 10595.
- (107) Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008; 26(8):1208-1215.
- (108) Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(9):744-749.
- (109) guirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11):834-846.
- (110) Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(17):1419-1424.
- (111) Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. 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. *J Clin Oncol* 1999; 17(7):2015-2019.
- (112) 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):1883-1890.
- (113) Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998; 76(6):824-828.

- (114) Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bode S, Wallwiener D et al. Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49(2):145-154.
- (115) Yie SM, Luo B, Ye NY, Xie K, Ye SR. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23(5-6):279-289.
- (116) Watson MA, Ylagan LR, Trinkaus KM, Gillanders WE, Naughton MJ, Weilbaecher KN et al. Isolation and molecular profiling of bone marrow micrometastases identifies TWIST1 as a marker of early tumor relapse in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13(17):5001-5009.
- (117) Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230(4730):1132-1139.
- (118) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235(4785):177-182.
- (119) Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10(7):1044-1048.
- (120) Ignatiadis M, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Xenidis N, Kafousi M et al. Molecular detection and prognostic value of circulating CK-19 mRNA- and HER2 mRNA- positive cells in the peripheral blood of women with early breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2007; 7(11):883-889.
- (121) Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56(4):860-865.
- (122) Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene* 1998; 16(6):817-824.
- (123) Hesselbrock DR, Kurpios N, Hassell JA, Watson MA, Fleming TP. PEA3, AP-1, and a unique repetitive sequence all are involved in transcriptional regulation of the breast cancer-associated gene, mammaglobin. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89(3):289-296.

- (124) Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59(13):3028-3031.
- (125) Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A et al. Elevated mammaglobin (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):R65-R70.
- (126) Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA et al. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J Clin Oncol* 2004; 22(4):691-698.
- (127) Grunewald K, Haun M, Fiegl M, Urbanek M, Muller-Holzner E, Massoner A et al. Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 2002; 82(9):1147-1153.
- (128) Zafrakas M, Petschke B, Donner A, Fritzsche F, Kristiansen G, Knuchel R et al. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer* 2006; 6:88.
- (129) Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Troup S, Hiller-Hitchcock T et al. Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis. *J Pathol* 1999; 189(1):28-33.
- (130) Ooka M, Sakita I, Fujiwara Y, Tamaki Y, Yamamoto H, Aihara T et al. Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients. *Oncol Rep* 2000; 7(3):561-566.
- (131) 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(20):4581-4584.
- (132) Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G, Angelucci D et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J Pathol* 2001; 195(2):186-190.
- (133) Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA et al. Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem* 2002; 48(8):1225-1231.

- (134) Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, Zurrída S, Mazzarol G, Viale G. 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(5):307-312.
- (135) Kataoka A, Mori M, Sadanaga N, Ueo H, Tsuji K, Rai Y et al. RT-PCR detection of breast cancer cells in sentinel lymph nodes. *Int J Oncol* 2000; 16(6):1147-1152.
- (136) Viale G, Dell'Orto P, Biasi MO, Stufano V, Brito Lima LN, Paganelli G et al. Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg* 2008; 247(1):136-142.
- (137) Bossolasco P, Ricci C, Farina G, Soligo D, Pedretti D, Scanni A et al. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-pCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detect Prev* 2002; 26(1):60-63.
- (138) Zach O, Kasparu H, Wagner H, Krieger O, Lutz D. Mammaglobin as a marker for the detection of tumor cells in the peripheral blood of breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923:343-345.
- (139) Zach O, Wagner H, Kasparu H, Krieger O, Lutz D. Statistical validation of the mammaglobin-nested RT-PCR assay for tumor cell detection in blood of breast cancer patients. *Biotechniques* 2001; 31(6):1358-1362.
- (140) Suchy B, Austrup F, Driesel G, Eder C, Kusiak I, Uciechowski P et al. Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients. *Cancer Lett* 2000; 158(2):171-178.
- (141) Lin YC, Wu Chou YH, Liao IC, Cheng AJ. The expression of mammaglobin mRNA in peripheral blood of metastatic breast cancer patients as an adjunct to serum tumor markers. *Cancer Lett* 2003; 191(1):93-99.
- (142) Lin YC, Chen SC, Hsueh S, Lo YF, Chow-Wu YH, Liaw IC 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.
- (143) Grunewald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Muller-Holzner E, Gunsilius E et al. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest* 2000; 80(7):1071-1077.
- (144) Marques AR, Teixeira E, Diamond J, Correia H, Santos S, Neto L et al. Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood

samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence. *Breast Cancer Res Treat* 2008; .

- (145) Gargano G, Agnese V, Calo V, Corsale S, Augello C, Bruno L et al. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cancer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol* 2006; 17 Suppl 7:vii41-vii45.
- (146) Bernstein JL, Godbold JH, Raptis G, Watson MA, Levinson B, Aaronson SA et al. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(18):6528-6535.
- (147) Fiegl M, Haun M, Massoner A, Krugmann J, Muller-Holzner E, Hack R et al. Combination of cytology, fluorescence in situ hybridization for aneuploidy, and reverse-transcriptase polymerase chain reaction for human mammaglobin/mammaglobin B expression improves diagnosis of malignant effusions. *J Clin Oncol* 2004; 22(3):474-483.
- (148) Carletti AM, Roncella S, Canessa PA, Pratico L, Maggiani R, Bacigalupo B et al. Expression of human mammaglobin gene in pleural effusions of patients with malignant mesothelioma. *Thorax* 2006; 61(3):271.
- (149) Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, Kurpad SN et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995; 55(14):3140-3148.
- (150) Tang CK, Gong XQ, Moscatello DK, Wong AJ, Lippman ME. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60(11):3081-3087.
- (151) Ge H, Gong X, Tang CK. Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. *Int J Cancer* 2002; 98(3):357-361.
- (152) Zehentner BK, Secrist H, Hayes DC, Zhang X, Ostenson RC, Loop S et al. 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):41-47.
- (153) Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4):2246-2251.

- (154) Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, Vincent-Salomon A, Nos C, Pouillart P et al. Clinical significance of proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(3):539-545.
- (155) Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Pelle O, Rebillard X, Riethdorf S, Muller V et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem* 2007; 53(3):537-539.
- (156) Fehm T, Becker S, Becker-Pergola G, Sotlar K, Gebauer G, Durr-Storzer S et al. Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8(5):R60.
- (157) Al-Hajj M, Wicha MS, Ito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7):3983-3988.
- (158) Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006; 12(19):5615-5621.
- (159) Theodoropoulos P.A, Polioudaki E., Sanidas E, Agelaki S, Mavroudis D, Georgoulas V. Detection of circulating tumor cells with breast cancer stem cell-like phenotype in blood samples of patients with breast cancer. *AACR annual meeting 2008; abstr 2008.*
- (160) Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, Gillanders WE, Hoda R, Schutte dH et al. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study. *BMC Cancer* 2008; 8:55.
- (161) Reinholz MM, Kitzmann K, Hillman D, Lingle WL, Hobday T, Moreno A. et al. Differential gene expression in circulating tumor cells between primary and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat Supp1* 2007; 106:abstr 5022.
- (162) EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472):1687-1717.
- (163) Sotiriou C, Piccart MJ. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer* 2007; 7(7):545-553.

- (164) Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(25):9393-9398.
- (165) Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B et al. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(46):17361-17365.
- (166) Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, Stournaras C. Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells. *Mol Med* 2007; 13(1-2):79-88.
- (167) Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2005; 65(12):4993-4997.
- (168) Hartmann CH, Klein CA. Gene expression profiling of single cells on large-scale oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(21):e143.
- (169) Xenidis N, Mavroudis D, Apostolaki S, Perraki M, Stathopoulou A, Lianidou E et al. Effect of adjuvant treatment on the circulating CK19mRNA positive tumor cells in patients with early stage breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2006; 24(No18S):abstr 20012.
- (170) Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos N et al. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol* 2003; 14(6):849-855.
- (171) Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106(2):239-243.
- (172) Slade MJ, Singh A, Smith BM, Tripuraneni G, Hall E, Peckitt C et al. Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years. *Int J Cancer* 2005; 114(1):94-100.
- (173) Mueller V, Riethdorf S, Loibl S, Komor M, Houber J, Schrader I et al. Prospective monitoring of circulating tumor cells in breast cancer patients treated with primary systemic therapy--A translational project of the German Breast Group study GeparQuattro. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; Part I. Vol 25, No 18S:abstr 21085.
- (174) Smerage J.B., Hayes DF, Doyle GV, Terstappen LW, Brown EM, Schott AF. Assessment of circulating tumor cells in breast cancer patients

undergoing neoadjuvant chemotherapy. Proc Am Soc Clin Oncol 2006; Part I. Vol 24, No. 18S:abstr 10079.

- (175) Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schunemann S, Hoffken K. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. Breast Cancer Res 2005; 7(6):R975-R979.
- (176) Braun S, Hepp F, Kantenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G et al. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. Clin Cancer Res 1999; 5(12):3999-4004.
- (177) Kirchner EM, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells. Ann Oncol 2002; 13(7):1044-1048.
- (178) Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. Clin Cancer Res 2004; 10(24):8185-8194.
- (179) Barok M, Balazs M, Nagy P, Rakosy Z, Treszl A, Toth E et al. Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor. Cancer Lett 2008; 260(1-2):198-208.
- (180) Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K., Fodstad O et al. Standardization of the Immunocytochemical Detection of Cancer Cells in BM and Blood: I. Establishment of Objective Criteria for the Evaluation of Immunostained Cells. Cytotherapy 1999; 1(5):377-388.
- (181) Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. Cytotherapy 2005; 7(2):171-185.
- (182) Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. Cancer 2006; 107(5):885-892.
- (183) McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. J Clin Oncol 2005; 23(36):9067-9072.

- (184) Henry NL, Hayes DF. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. *Oncologist* 2006; 11(6):541-552.
- (185) Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(16):1659-1672.
- (186) Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(16):1673-1684.
- (187) Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(8):809-820.
- (188) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-159.
- (189) Mavroudis D, Perraki M, Kallergi G, Pallis A, Kanellou P, Kalmanti L et al. Molecular detection of HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; Part I, Vol 23, No16S:abstr 668.
- (190) Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:457-481.
- (191) Collett D. *Modeling Survival Data in Medical Research*. London, United Kingdom, Chapman and Hall/CRC 1999.
- (192) Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24):8152-8162.
- (193) Sasaki E, Tsunoda N, Hatanaka Y, Mori N, Iwata H, Yatabe Y. Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers. *Mod Pathol* 2007; 20(2):208-214.
- (194) Paik S, Kim C, Jeong J, Geyer CE, Jr., Romond EH, Mejjia-Mejia O et al. Benefit from adjuvant trastuzumab may not be confined to patients with IHC 3+ and/or FISH-positive tumors: Central testing results from NSABP B-31. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; Part I. Vol 25, No. 18S.
- (195) Narayanan K, Jaramillo A, Benshoff ND, Campbell LG, Fleming TP, Dietz JR et al. Response of established human breast tumors to

vaccination with mammaglobin-A cDNA. J Natl Cancer Inst 2004;
96(18):1388-1396.

5. ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

Συντομογραφία	Επεξήγηση	Μετάφραση
ADM	Automated Digital Microscopy	Αυτοματοποιημένη Ψηφιακή Μικροσκοπία
AJCC	American Joint Committee on Cancer	
ASCO	American Society of Clinical Oncology	Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας
BCSS	Breast Cancer Specific Survival	Επιβίωση Ελεύθερη Καρκίνου του Μαστού
BM	Bone Marrow	Μυελός των Οστών
BP	Base Pairs	Ζεύγη Βάσεων
CA 15-3	Cancer Antigen 15-3	Καρκινικό Αντιγόνο 15-3
CA 27.29	Cancer Antigen 27.29	Καρκινικό Αντιγόνο 27.29
cDNA	Complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
CEA	Carcinoembryonic Antigen	Καρκινοεμβρυϊκό Αντιγόνο
CETCs	Circulating Epithelial Tumor Cells	Κυκλοφορούντα Επιθηλιακά Καρκινικά Κύτταρα
CI	Confidence Interval	Διάστημα Εμπιστοσύνης
CK	Cytokeratin	Κυτταροκερατίνη
CK19	Cytokeratin 19	Κυτταροκερατίνη 19
CMF	Cyclophosphamide Methotraxate Fluorouracil	
Ct	Cycle Threshold	Όριο του Κύκλου
CTCs	Circulating Tumor Cells	Κυκλοφορούντα Καρκινικά Κύτταρα
DDFS	Distant Disease Free Survival	Επιβίωση Ελεύθερη Απομακρυσμένης Νόσου
DFI	Disease Free Interval	Διάστημα Ελεύθερο Νόσου
DFS	Disease Free Survival	Επιβίωση Ελεύθερη Νόσου
DMFS	Distant Metastasis Free Survival	Επιβίωση Ελεύθερη Απομακρυσμένων Μεταστάσεων
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTPs	Deoxynucleosides	Δεοξυνουκλεοσίδια
DTCs	Disseminated Tumor Cells	Διάσπαρτα Καρκινικά Κύτταρα
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group	
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Υποδοχέας Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα
EL	Erythrocyte Lysis	Λύση ερυθρών αιμοσφαιρίων
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition	
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Μόριο Προσκόλλησης Επιθηλιακών Κυττάρων
ER	Estrogen Receptor	Υποδοχέας Οιστρογόνων
FAST	Fiber-optic Array Scanning Technology	
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FEC	Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamide	
FISH	Fluorescent In situ Hybridization	Φθορίζων <i>in situ</i> Υβριδισμός
hCG	Human Chorionic Gonadotropin	Ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2	Υποδοχέας Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα-2

HLA	Human Leucocyte Antigen	Ανθρώπειο Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο
ICC	Immunocytochemistry	Ανοσοκυτταροχημεία
IF	Immunofluorescence	Ανοσοφθορισμός
IHC	Immuohistochemistry	Ανοσοϊστοχημεία
IS	Immunomagnetic Separation	Ανοσομαγνητικός Διαχωρισμός
MGB1	Mammaglobin-1	Μαστοσφαιρίνη Α
mL	Milliliter	
MNCs	Mononuclear Cells	Μονοπύρρηνα Κύτταρα
MRD	Minimal Residual Disease	Ελάχιστη Υπολειπόμενη Νόσος
mRNA	Messenger RNA	Αγγελιοφόρο RNA
NED	Non Evidence of Disease	Απουσία νόσου
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project	
OS	Overall Survival	Ολική Επιβίωση
PB	Peripheral Blood	Περιφερικό Αίμα
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Μονοπύρρηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος
PBS	Phosphate Buffered Saline	
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PFS	Relapse Free Survival	Επιβίωση Ελεύθερη Υποτροπής
PR	Progesterone Receptor	Υποδοχέας Προγεστερόνης
Q-RT-PCR	Quantitative RT-PCR	Ποσοτική RT-PCR
RF	References	Βιβλιογραφικές Αναφορές
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RS	Recurrence Score	Σκορ υποτροπής
RT	Radiotherapy	Ακτινοθεραπεία
SE	Standard Error	Τυπικό σφάλμα
SWOG	Southwest Oncology Group	
T/EC	Docetaxel / Epirubicin Cyclophosphamide	
TNM	Tumor Node Metastasis	Όγκος Λεμφαδένας Μετάσταση
TTP	Time to Progression	Διάστημα ως την Υποτροπή
uPA/PAI-1	Urokinase-type Plasminogen Activator / Plasminogen Activator Inhibitor 1	Ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης / Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1

6. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Μιχαήλ Γεωργίου Ιγνατιάδης

Ημερομηνία γεννήσεως 15/02/1973
Διεύθυνση κατοικίας Avenue du General de Gaulle, 20
Brussels, Belgium
Τηλέφωνα επικοινωνίας 00306974198869
0032476996008
e-mail Michail.Ignatiadis@bordet.be
Michail.Ignatiadis@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ :

16/04/07-εως τώρα Παθολόγος-Ογκολόγος, Medical Oncology Department, Translational Research Unit, Jules Bordet Institute, Brussels
03/2007 Τίτλος ειδικότητας Παθολογικής Ογκολογίας
11/10/06-15/12/06 Ειδικευόμενος ιατρός Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Κρήτη
11/04/06 – 11/10/06 Fellow in the Medical Oncology Department, Translational Research Unit, Jules Bordet Institute, Brussels
15/12/03 – 10/04/06 Ειδικευόμενος ιατρός Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Κρήτη
30/10/00-29/10/03 Ειδικευόμενος ιατρός Α' Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη
15/03/1999 U.S.A. ECFMG (United States of America Educational Commission for Foreign Medical Graduates) certificate (Score : Basic science 90, clinical science 86)
1990-1996 Πτυχίο Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Βαθμός πτυχίου 'Άριστα' (9) Εννιά - (8.86)
1987-1990 Πειραματικό Σχολείο Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Βαθμός απολυτηρίου 19 και 7/11

ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ / ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

16/06/04-18/06/04 **EORTC fellow**, course on Clinical Trial Statistics for Non Statisticians, Brussels
24/11/03-28/11/03 **EORTC fellow**, course on Organization and Implementation of Cancer Clinical Trials, Brussels
11/08/03-29/08/03 **Erasmus Summer Programme fellow**, Principles of research in medicine and epidemiology Erasmus Medical Center, Rotterdam
07/1994-10/1994 **Erasmus network fellow**, Department of pathology, University Hospital of Utrecht

ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ / ΣΥΝΕΔΡΙΑ / ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

06/2008	5ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας, Αθήνα
05/2008	10 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη
05/2008	14 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα
04/2008	Breast International Group and North American Breast Cancer Cooperative Groups Meeting, Bruges, Belgium
04/2008	The 6 th European Breast Cancer Conference (EBCC-6), Berlin
03/2008	EORTC strategy meeting
02/2008	5 th Breast Cancer Meeting, post SABCS for Medical Oncologists in Belgium, Brussels
12/2007	30 th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, Texas
11/2007	Future Forum in Breast Cancer, New York
11/2007	15 ^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη
09/2007	ECCO 14, Barcelona
09/2007	6 th International Symposium on minimal residual cancer, Hamburg
06/2007	43rd ASCO annual meeting, Chicago, Illinois
12/2006	29 th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas
10/2006	14 ^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη
08/2006	A joint EMBL/Ambion practical course on miRNA profiling, Heidelberg
01/2006	17 th International Congress on Anti-Cancer Treatment, Paris
12/2005	28 th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas
11/2005	13 ^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη
10/2005	4 th Symposium on new molecules in cancer therapeutics, Athens
09/2005	Εκπαιδευτική ημερίδα Ανασκόπηση ASCO 2005, Αθήνα
05/2005	41 st ASCO annual meeting, Orlando, Florida
03/2005	2 ^ο Διαιτητικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα
02/2005	16 th International congress on anti-cancer treatment, Paris
11/2004	Faslodex Clinical Experience-Physicians meeting. Cheshire
11/2004	12 ^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη
29/10/04-	29 th ESMO Congress, Vienna
02/11/04	
10/2004	3 rd Symposium on new molecules in cancer therapeutics, Athens
09/2004	4 ^ο Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο: 'Καρκίνος του μαστού, από το γονίδιο στη θεραπεία', Θεσσαλονίκη
06/2004	3 rd Postgraduate Workshop "Breast Cancer : the global approach", Anticancer Institute "Theagenio", Thessaloniki
04/2004	12 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Αθήνα
02/2004	Συμπόσιο ογκολογίας εφήβων και νεαρών ενηλίκων, Μέτσοβο
11/2003	11 ^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη
10/2003	23 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη
10/2003	3 ^ο Ετήσιο σεμινάριο κλινικής ογκολογίας, ΑΝΘ Θεαγένειο, Θεσσαλονίκη
06/2003	Inflammatory bowel disease from the bench to bedside, Crete.
06/2003	13 th Alzheimer Europe Conference and 3 rd Hellenic National Alzheimer disease and related disorders conference, Thessaloniki
06/2003	2 nd Postgraduate Workshop: "Colorectal cancer: the global approach", Theagenio Anticancer Institute, Thessaloniki.
06/2003	2 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο ιδιοπαθών φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου, Αθήνα
05/2003	18 ^ο Βορειοελλαδικό ιατρικό συνέδριο, Θεσσαλονίκη
05/2003	8 ^ο Πανελλήνιο ηπατολογικό συνέδριο, Θεσσαλονίκη

- 04/2003 Μετεκπαιδευτικά μαθήματα ελληνικής γαστρεντερολογικής εταιρείας: 'Παθήσεις λεπτού εντέρου', Θεσσαλονίκη
- 03/2003 1^ο Διαιτητικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα
- 11/2002 10^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη
- 09/2002 2^ο Ετήσιο Σεμινάριο Κλινικής Ογκολογίας, Α.Ν.Θ. Θεαγένειο, Θεσσαλονίκη
- 09/2002 3^ο Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο: 'Καρκίνος του μαστού, από το γονίδιο στη θεραπεία', Θεσσαλονίκη
- 04/2002 17^ο Βορειοελλαδικό ιατρικό συνέδριο, Θεσσαλονίκη
- 04/2002 11^ο Πανελλήνιο συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Θεσσαλονίκη
- 03/2002 Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα: 'Επίκαιρα Θέματα Γαστρεντερολογίας', Ελληνική γαστρεντερολογική εταιρεία, Θεσσαλονίκη
- 03/2002 2^ο Πανελλήνιο συμπόσιο για την υπέρταση και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, Θεσσαλονίκη
- 03/2002 Successfully managing total patient health, Stresa
- 01/2002 'Advances in the treatment of solid tumors', Interbalkan European medical center, Thessaloniki
- 12/2001 2^η Πανελλήνια ημερίδα: 'Μελάνωμα, η έρευνα στην Ελλάδα σήμερα', Θεσσαλονίκη
- 12/2001 7^ο Πανελλήνιο συνέδριο χειρουργικής ενδοκρινών αδένων, Θεσσαλονίκη
- 12/2001 'Τα αυτοάνοσα νοσήματα για το μη ειδικό', Γ.Π.Ν Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη
- 09/2001 1^ο Ετήσιο Σεμινάριο Κλινικής Ογκολογίας, Α.Ν.Θ.Θεαγένειο, Θεσσαλονίκη
- 09/2000 Recent Advances in the Management of Breast and Colorectal Cancer, European School of Oncology, Thessaloniki
- 04/2000 Πανελλήνιο Ογκολογικό Συνέδριο: Διάγνωση και αντιμετώπιση του καρκίνου, νεότερες εξελίξεις και εμπειρίες. Α' Προπαιδευτική Χειρουργική κλινική, Γ.Π.Ν.ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη
- 05/1996 2^ο Πανευρωπαϊκό συμπόσιο φοιτητών Ιατρικής, επιστημονική εταιρεία φοιτητών ιατρικής Ελλάδας, Θεσσαλονίκη
- 11/1996 15^ο Πανελλήνιο συνέδριο γαστρεντερολογίας, Ελληνική γαστρεντερολογική εταιρεία, Θεσσαλονίκη
- 11/1995 Seminar in nephrology, B' Propedeutic Clinic of Internal Medicine, Ippokration General Hospital, Thessaloniki
- 04/1995 1^ο Πανευρωπαϊκό συμπόσιο φοιτητών ιατρικής, επιστημονική εταιρεία φοιτητών ιατρικής Ελλάδας, Αθήνα
- 03/1994 Παρόν και μελλοντικές προοπτικές στις μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων, επιστημονική εταιρεία φοιτητών ιατρικής Ελλάδας, Αθήνα
- 03/1993 3^ο Πανελλήνιο επιστημονικό συνέδριο φοιτητών ιατρικής, Θεσσαλονίκη
- 04/1991 2^ο Πανελλήνιο επιστημονικό συνέδριο φοιτητών ιατρικής

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 2008 **Ignatiadis M**, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology* **2008**;75:104-111.
- 2008 **Ignatiadis M**, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulas V, Mavroudis D Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multi-marker RT-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* **2008**;14: 2593-2600.
- 2008 **Ignatiadis M**, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* **2008**; 20:55-60.

- 2007 **Ignatiadis M**, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Xenidis N, Kafousi M, Stathopoulos E, Lianidou E, Sotiriou C, Georgoulis V, Mavroudis D. Molecular detection and prognostic value of circulating CK19 mRNA- and HER2 mRNA- positive cells in the peripheral blood of women with early breast cancer. *Clin Breast Cancer* **2007** ;7:883-889.
- 2007 **Ignatiadis M**, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, Stathopoulos E, Stathopoulou A, Lianidou E, Chlouverakis G, Sotiriou C, Georgoulis V, Mavroudis D. Different prognostic value of Cytokeratin-19 mRNA-positive Circulating Tumor Cells according to estrogen receptor and HER2 status in early breast cancer *J Clin Oncol* **2007**; 25:5194-5202.
- 2007 Karampeazis A, Vamvakas L, Agelaki S, Kentepozidis N, Papadimitraki E, Gkioulbasanis I, Vardakis N, **Ignatiadis M**, Mavroudis D, Georgoulis V. A Dose Escalation Study of Biweekly Oral Vinorelbine and Gemcitabine in Patients with Solid Tumors. *Oncology* **2007** ;71:347-353.
- 2007 **Ignatiadis M**, Polyzos A, Stathopoulos GP, Tselepatiotis E, Christophylakis C, Kalbakis K, Vamvakas L, Kotsakis A, Potamianou A, Georgoulis V. A multicenter phase II study of docetaxel in combination with gefitinib in gemcitabine pretreated patients with advanced/metastatic breast cancer. *Oncology* **2007**; 71:159-163.
- 2007 Kalykaki A, Vamvakas L, Agelaki S, Kalbakis K, Vardakis N, Sfakiotaki G, **Ignatiadis M**, Saridaki Z, Karabeazis A, Mavroudis D, Georgoulis V. A Dose Escalation Study of Gemcitabine plus Pemetrexed Administered Biweekly in Patients with Solid Tumors. *Oncology* **2007** ;71:197-203.
- 2007 Gkioulbasanis I, Souglakos J, Vardakis N, Kotsakis A, Saridaki Z, Kentepozidis N, Polyzos A, Giassas S, **Ignatiadis M**, Bozionelou V, Christophylakis C, Georgoulis V. Dose escalating clinical study of high dose infusional 5-fl uorouracil and leukovorin (AIO regimen) plus alternate weekly administration of oxaliplatin and irinotecan in patients with advanced tumors of the gastrointestinal tract. *J BUON* **2007** ;12:197-202.
- 2007 **Ignatiadis M**, Desmedt C. Predicting risk of breast cancer recurrence using gene-expression profiling. *Pharmacogenomics* **2007** ; 8:101-111.
- 2006 Fountzilias G, Karkavelas G, Kalogera-Fountzila A, Karina M, **Ignatiadis M**, Koukoulis G, Plataniotis G, Misailidou D, Bobos M, Pectasides D, Razis E, karavelis A, Selviaridis P. Post-operative combined radiation and chemotherapy with temozolomide and irinotecan in patients with high-grade astrocytic tumors. A phase II study with biomarker evaluation. *Anticancer Res.* **2006** Nov-Dec;26:4675-86.
- 2006 Ntoulia M, Stathopoulou A, **Ignatiadis M**, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulis V, Lianidou ES. Detection of Mammaglobin-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem* **2006** ; 39:879-87.
- 2005 **Ignatiadis M**, Mavroudis D, Veslemes M, Boukovinas J, Syrigos K, Agelidou M, Agelidou A, Gerogianni A, Pavlakou G, Tselepatiotis E, Nikolakopoulos J, Georgoulis V. Sequential versus alternating administration of cisplatin-etoposide and topotecan, as first line treatment in patients with extensive stage small cell lung cancer. Preliminary results of phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Clin Lung Cancer* **2005**;7:183-9.
- 2005 Ziotopoulos P, Androulakis N, Mylonaki E, Chandrinou V, Zachariadis E, Boukovinas I, Agelidou A, Kentepozidis N, **Ignatiadis M**, Vossos A, Georgoulis V; for the Lung Cancer Committee of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). Front-line treatment of advanced non-small cell lung cancer with irinotecan and docetaxel: a multicenter phase II study. *Lung Cancer* **2005**;50:115-22.
- 2004 Briasoulis E, Karavasillis V, Kostadima L, **Ignatiadis M**, Fountzilias G, Pavlidis N.

- Metastatic breast carcinoma confined to bone. *Cancer* **2004**;101:1524-1528.
- 2003 Σοφός Α, Νικολαΐδης Π, Μελλίδης Χ, **Ιγνατιάδης Μ**, Μεταλλίδης Σ, Τάσκος Ν, Καρκαβέλας Γ, Τουρκαντώνης Α. Γλυκογονίαση τύπου V (νόσος McArdle) : Περιγραφή μιας περίπτωσης. *Ελληνική Ιατρική* **2003**;69:324-327.
- 2003 **Ιγνατιάδης Μ**, Μητελουδής Γ, Βαλαγκούτη Δ, Μελλίδης Χ, Κιοσές Β, Τουρκαντώνης Α. Γαλακτική οξέωση σε δύο ασθενείς με λοίμωξη από ιό επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV). *Ελληνική Ιατρική* **2003**;69:328-331.
- 2003 Parissis D, Mellidis C, Boutis A, Apostolidis K, **Ignatiadis M**, Kiosses V, Milonas I. Neurological findings in a case of coma secondary to Datura stramonium poisoning. *European Journal of Neurology* **2003**, 10:745-746.
- 2003 **Ignatiadis M**, Karvounis H, Kalogera-Fountzila A, Louridas G. Retroperitoneal hematoma and tinzaparin. *Curr Med Res Opin* **2003**;19:238-239.
- 1998 Κωτακίδης Γ, Χατζημαλιάκας Π, Κατσαμάκας Μ, **Ιγνατιάδης Μ**, Μεταξάς Γ, Καλλινδέρης Κ, Μικρούδη Κ, Ντόνας Γ, Μήτρας Σ. Πολεμικά τραύματα ουροποιογεννητικού συστήματος. *Ελληνική ουρολογία* **1998**;1:100-105.
- 1997 De Weger R.A, Verdonck L, Bosboom-Kalsbeek E, Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Tilanus M. Optimal microsatellite analysis for donor and recipient cells after bone marrow transplantation. *The immunologist* **1997**, Supplement 1, 120.
- 1997 De Weger R.A, Verdonck L, Bosboom-Kalsbeek K, Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Tilanus M. Optimal microsatellite analysis for donor and recipient chimerism after bone marrow transplantation. *Pathology Research and Practice* **1997**;193:422.

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ (ΒΙΒΛΙΑ / ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ)

- 2005 **Ιγνατιάδης Μ**. Αναστολείς της Farnesyl Transferase. Τόμος πρακτικών 13ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας Ηράκλειο Κρήτης σελ 163-175.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

- 2008 **Ιγνατιάδης Μ**. Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού, διάλεξη, 5ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας.
- 2008 Sotiriou C, Equeter C, El Ouriaghli F, Haine-Kains B, Durbecq V, Larsimont D, **Ignatiadis M**, Desmedt C, Willard-Gallo K, Piccart M. Correlation of gene expression analysis of tumor-infiltrating CD4+ cells with immune function and survival according to different breast cancer molecular subtypes, poster discussion, 44th ASCO annual meeting, Chicago, Illinois.
- 2008 **Ιγνατιάδης Μ**. Μελέτη του προφίλ γονιδιακής έκφρασης στον καρκίνο του μαστού, διάλεξη, 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Ογκολογίας Ηράκλειο, Κρήτη.
- 2008 Ξενίδης Ν, **Ιγνατιάδης Μ**, Αποστολάκη Σ, Περράκη Μ, Καλμπάκης Κ, Ανδρουλάκης Ν, Βαμβακάς Λ, Αγγελάκη Σ, Σταθόπουλος Ε, Λιανίδου Ε, Κακούρης Σ, Γεωργούλιας Β, Μαυρουδής Δ. Κυκλοφορούντα CK19 mRNA+ κύτταρα σε ασθενείς με στάδιο I και II καρκίνο του μαστού μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας: εκτίμηση της προγνωστικής τους αξίας, ελεύθερη ανακοίνωση, 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα.
- 2008 **Ιγνατιάδης Μ**. “Επιγενετική: Διαφορετικός ή συμπληρωματικός στόχος.”, διάλεξη στο στρογγυλό τραπέζι νέων ογκολόγων, 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα.
- 2008 **Ignatiadis M**, Piccart M, Sotiriou C. Anti-HER2 agent as secondary adjuvant treatment strategy in women with HER2-negative early breast cancer and detectable Circulating Tumor Cells (CTCs), oral presentation, EORTC strategy meeting, Brussels.

- 2008 **Ignatiadis M.** Genomics and Expression Arrays, lecture, 5th Breast Cancer post SABCS Meeting for Medical Oncologists in Belgium, Brussels.
- 2008 Rothé F, **Ignatiadis M**, Bopp B, Haibe-Kains B, Harris A, Piccart M, Desmedt C, Sotiriou C. miR210: a potential biomarker for predicting clinical outcome in breast cancer, poster, San Diego, AACR.
- 2007 **Ignatiadis M**, Kallergi G, Ntoulia M, Apostolaki S, Perraki M, Xenidis N, Stathopoulou A, Lianidou E, Georgoulas V, Mavroudis D. Prognostic value of the detection of circulating tumor cells using a multimarker RT-PCR (CK19, mammaglobin A, HER2/neu) in early breast cancer, poster discussion, 30th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas.
- 2007 Xenidis N, Apostolaki S, Perraki M, Politaki E, Kalbakis K, **Ignatiadis M**, Kalykaki A, Agelaki S, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating CK19 mRNA+ cells in patients with stage I and II breast cancer after the completion of adjuvant chemotherapy: evaluation of their prognostic relevance, poster discussion, 30th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas.
- 2007 **Ignatiadis M.** MicroRNAs in breast cancer: basic biology and clinical potential, lecture, 15^o Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη.
- 2007 **Ignatiadis M**, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, Stathopoulos E, Sotiriou C, Georgoulas V, Mavroudis D. Different prognostic value of Cytokeratin-19 mRNA-positive Circulating Tumor Cells according to estrogen receptor status in early breast cancer, oral presentation, 6th International Symposium on minimal residual cancer, Hamburg.
- 2007 **Ignatiadis M**, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, Stathopoulos E, Sotiriou C, Georgoulas V, Mavroudis D. Different prognostic value of Cytokeratin-19 mRNA-positive Circulating Tumor Cells according to estrogen receptor status in early breast cancer, oral presentation, 43rd ASCO annual meeting, Chicago, Illinois.
- 2007 Pallis A, Apostolaki S, Perraki M, Kalmanti L, Xenidis N, Bozionellou V, Kalbakis K, Kotsakis A, Agelaki S, **Ignatiadis M**, Saridaki Z, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulas V, Mavroudis D. HER2 mRNA-positive circulating tumor cells in patients with stage I and II breast cancer: evaluation of their prognostic significance, oral presentation, 18th ICACT, Paris.
- 2006 **Ignatiadis M**, Ntoulia M, Apostolaki S, Perraki M, Konsolakis G, Xenidis N, Stathopoulou A, Lianidou E, Georgoulas V, Mavroudis D. Detection of Circulating Tumor Cells using RT-PCR for CK19 and Mammaglobin-A in women with operable breast cancer, poster 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas.
- 2006 **Ignatiadis M**, Polyzos A, Stahopoulos G, Tselepatiotis E, Christophyllakis C, Argyraki K, Androulakis N, Vardakis N, Potamianou A, Georgoulas V. A phase II study of docetaxel in combination with gefitinib in gemcitabine-pretreated patients with advanced/metastatic pancreatic cancer, poster, 31st ESMO Congress, Istanbul, Turkey.
- 2005 **Ιγνατιάδης Μ.** Αντιμετώπιση ασθενών με νεοπλασματική μηνιγγίτιδα, διάλεξη, 13^o Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη.
- 2005 **Ignatiadis M**, Kalbakis K, Vardakis N, Giassas S, Sfakiotaki G, Saridaki Z, V.Bozionellou, J.Gioulbasanis, A.Pallis, V.Georgoulas. First line chemotherapy with docetaxel plus gemcitabine in elderly or poor performance status patients with advanced non-small cell lung cancer: The experience of the Hellenic Oncology Research Group (HORG), poster, ECCO 13, Paris.
- 2005 Kentepozidis N, Agelaki S, Vamvakas L, Kotsakis A, Saridaki Z, Gioulbasanis J, Kalykaki A, **Ignatiadis M**, Sfakiotaki G, Mavroudis D. First-line treatment with docetaxel and cisplatin in non-small cell lung cancer patients: A retrospective

- analysis, poster, 11th World Conference in Lung Cancer, Barcelona.
- 2005 Κουρούσης Χ, Ανδρουλάκης Ν, Μπουκοβίνας Ι, Αγγελάκη Α, Βαμβακάς Λ, Συρίγος Κ, Ποταμιάνου Α, Χριστοφυλλάκης Χ, Τσελεπατιώτης Ε, Χέλης Λ, **Ιγνατιάδης Μ**, Κεντεποζίδης Ν, Πολύζος Α. Δοσεταξέλη, πλατίνα και γεμισαμπίνη ως χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής σε ασθενείς με προχωρημένο/μεταστατικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, poster, 2^ο Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα.
- 2004 **Ιγνατιάδης Μ**. Αναστολείς Farnesyl Transferase, διάλεξη στο Στρογγυλό τραπέζι: Μοριακοί στόχοι-Βιολογικές Θεραπείες, 12^ο Μετεκπαιδευτικό συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Ηράκλειο, Κρήτη.
- 2004 Καραβασίλης Β, Μπριασούλης Ε, Κωσταδήμα Λ, **Ιγνατιάδης Μ**, Φούντζηλας Γ, Παυλίδης Ν. Κατεχοχίν οστική μεταστατική νόσος σε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Αναγνώριση και μελέτη μιας ιδιαίτερης κλινικής οντότητας, poster, 12 Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα.
- 2004 Καρίνα Μ, **Ιγνατιάδης Μ**, Χριστοφορίδης Τ, Σελβιαρίδης Π, Μισαηλίδου Δ, Φούντζηλας Γ. Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα. Μελέτη μετεγχειρητικής χορήγησης ταυτόχρονης ακτινοθεραπείας και συστηματικής χημειοθεραπείας με τεμοζολαμίδη και ιρινotecάνη σε ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα εγκεφάλου, poster, 12 Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα.
- 2003 Selviaridis P, **Ignatiadis M**, Karina M, Karkavelas G, Misailidou D, Kontopoulos V, Fountzilias G. Postoperative combined radiation and chemotherapy with temozolomide and irinotecan in patients with malignant gliomas. A phase II study, poster, 12th European Congress of Neurosurgery, Lisboa.
- 2003 Nikopoulos A, **Ignatiadis M**, Stefanidis S, Papadidaskalou F, Theocharidis A, Basdanis G, Chatzichristos E, Giannoulis E. Infliximab for the treatment of perianal fistulas in Crohn disease, report of two cases, poster, Inflammatory bowel disease from the bench to bedside, Crete.
- 2003 **Ιγνατιάδης Μ**, Νικόπουλος Α, Στεφανίδης Σ, Παπαδιδασκάλου Φ, Θεοχαρίδης Α, Μπασδάνης Γ, Χατζηχρήστος Ε, Γιαννούλης Ε. Αντιμετώπιση περιεδρικών συριγγίων στη νόσο του Crohn με infliximab, περιγραφή δύο περιπτώσεων, ελεύθερη ανακοίνωση, 2^ο Πανελλήνιο συνέδριο ιδιοπαθών φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου, Αθήνα.
- 2003 Μελλίδης Χ, Μπούτης Α, Αποστολίδης Κ, **Ιγνατιάδης Μ**, Παρίσης Δ, Κιοσές Β. Οξεία δηλητηρίαση από σπόρια στραμωνίου (Str) και αλκοόλη, poster, 18^ο Βορειοελλαδικό ιατρικό συνέδριο, Θεσσαλονίκη.
- 2002 Καλεβρόσογλου Ι, Γρέκας Δ, Αγγελούδη Μ, Παπαδόπουλος Α, Οικονομοπούλου Χ, **Ιγνατιάδης Μ**, Βασιλείου Σ, Τουρκαντώνης Α. Ανθεκτικές και υποτροπιάζουσες περιπτώσεις θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας: Θεραπευτική πλάσμαφαίρεση, poster, 12^ο Πανελλήνιο συνέδριο Νεφρολογίας, Ιωάννινα.
- 2002 **Ιγνατιάδης Μ**, Βαλαγκούτη Δ, Μητελούδης Γ, Αγγελόπουλος Ι, Λάζοβιτς Ζ, Κιοσές Β, Τουρκαντώνης Α. Η γαλακτική οξέωση στην HIV/AIDS νόσο, οι τρεις πρώτες περιπτώσεις στην Ελλάδα, ελεύθερη ανακοίνωση, 17^ο Βορειοελλαδικό ιατρικό συνέδριο, Θεσσαλονίκη.
- 2002 Μητελούδης Γ, Βαλαγκούτη Δ, Αγγελόπουλος Ι, **Ιγνατιάδης Μ**, Λάζοβιτς Ζ, Μανδραβέλλη Κ, Κιοσές Β, Τουρκαντώνης Α. Οι Θάνατοι στην HIV/AIDS νόσο την περίοδο 1990-2001, ελεύθερη ανακοίνωση, 17^ο Βορειοελλαδικό ιατρικό συνέδριο, Θεσσαλονίκη.
- 2002 Καρανικιώτης Χ, **Ιγνατιάδης Μ**, Σπανός Γ, Δημητριάδης Α. Αγγειοσάρκωμα μυοκαρδίου, poster, 11^ο πανελλήνιο συνέδριο κλινικής ογκολογίας, Θεσσαλονίκη.
- 2001 Σωφρονιάδου Σ, Γκούβερης Π, Σμυρλόγλου Δ, Λήμου Μ, Μπίτζα Μ, Φαρμάκης Δ, **Ιγνατιάδης Μ**, Μυλωνάκης Ν, Καλόφωνος Χ, Μπαφαλούκος Δ, Καραμπέλης Α. Συσχέτιση της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση τις

- ταξάνες με την έκφραση ορμονικών υποδοχέων στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, poster, 11^ο Πανελλήνιο συνέδριο ογκολογίας, Αθήνα.
- 2001 Πολυζούλης Γ, Τσιλχοροζίδου Τ, **Ιγνατιάδης Μ**, Βαφειάδου Ε, Μούσλεχ Τ, Γιώβος Ι. Θεραπευτικές προσεγγίσεις μεταστατικού μυελοειδούς καρκίνου θυρεοειδούς, ελεύθερη ανακοίνωση, 7^ο Πανελλήνιο συνέδριο Χειρουργικής ενδοκρινών αδένων, Θεσσαλονίκη.
- 1997 De Weger R, Verdonck L, Bosboom-Kalsbeek K, Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Tilanus M. Optimal microsatellite analysis for donor and recipient chimerism after bone marrow transplantation, poster, 5th Basic Sciences symposium of the transplantation Society, Chautauqua, New York.
- 1997 De Weger R, Verdonck L, Bosboom-Kalsbeek K, Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Tilanus M. Optimal microsatellite analysis for donor and recipient chimerism after bone marrow transplantation, poster, XVIth European congress of pathology, Maastricht.
- 1997 De Weger R, Verdonck L, Bosboom-Kalsbeek E, Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Tilanus M. Optimal microsatellite analysis for donor and recipient cells after bone marrow transplantation, poster, 4th International symposium on clinical immunology, Amsterdam.
- 1997 De Weger R, Verdonck L, Bosboom-Kalsbeek E, Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Tilanus M. Optimal methode voor het bepalen van chimerisme na beenmerg transplantatie, poster, Bootcongress van Nederlandse Transplantatie Vereniging, Texel.
- 1996 Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Bosboom E, Verdonck L, Tilanus M, de Weger R. An optimal microsatellite analysis for donor and recipient cells after bone marrow transplantation, poster, Nederlandse Vereniging voor haematologie, Lunteren
- 1996 Van Blockland M, **Ignatiadis M**, Bosboom E, Tilanus M, de Weger R. An optimal microsatellite analysis for donor and recipient cells after bone marrow transplantation, oral presentation and poster, 12th International Histocompatibility Workshop and Conference, St.Malo and Paris.
- 1995 **Ignatiadis M**, Bosboom-Kalsbeek L, Tilanus M, De Weger R. Development of polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)-Application to Bone Marrow Transplantation, PCR polymorphisms at 2 VNTR loci, oral presentation, 1st european medical students symposium, Athens.
- 1994 Αποστόλου Α, **Ιγνατιάδης Μ**, Σκένδρος Π, Τσιάκαλος Κ, Αντωνιάδης Α. Πτωματικοί δότες οργάνων προς μεταμόσχευση. Αναζήτηση αιτιών περιορισμένου αριθμού μοσχευμάτων, poster, Ημερίδα: Παρόν και μελλοντικές προοπτικές στις μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων, Επιστημονική εταιρεία φοιτητών ιατρικής Ελλάδας, Αθήνα.