ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
FACULTY OF MEDICINE

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής

Τομέας Παθολογίας

Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου

Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Μαυρουδής

Μελέτη της αντινεοπλασματικής δράσης των αναστολέων των τυροσινικών κινασών [ZD1839 (Gefitinib) και GW572016 (Lapatinib)] στα κυκλοφορούντα μικρομεταστατικά κύτταρα του αίματος σε ασθενείς με καρκίνο μαστού

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αντωνία Καλυκάκη

Παθολόγος

Ηράκλειο 2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
FACULTY OF MEDICINE

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής

Τομέας Παθολογίας

Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου

Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Μαυρουδής

Μελέτη της αντινεοπλασματικής δράσης των αναστολέων των τυροσινικών κινασών [ZD1839 (Gefitinib) και GW572016 (Lapatinib)] στα κυκλοφορούντα μικρομεταστατικά κύτταρα του αίματος σε ασθενείς με καρκίνο μαστού

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αντωνία Καλυκάκη

Παθολόγος

Ηράκλειο 2015

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
FACULTY OF MEDICINE

Μελέτη της αντινεοπλασματικής δράσης των αναστολέων των τυροσινικών κινασών [ZD1839 (Gefitinib) και GW572016 (Lapatinib)] στα κυκλοφορούντα μικρομεταστατικά κύτταρα του αίματος σε ασθενείς με καρκίνο μαστού

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δημήτριος Μαυρουδής Καθηγητής Παθολογικής- Ογκολογίας

Δ/ντης Παθολογικής- Ογκολογικής Κλινικής

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Δημήτριος Μαυρουδής Καθηγητής Παθολογικής- Ογκολογίας

Βασίλειος Γεωργούλιας, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας

Ευστάθιος Σταθόπουλος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Σοφία Αγγελάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής- Ογκολογίας

Γεώργιος Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας (με έμφαση στις λοιμώξεις)

Οδυσσέας Ζώρας, Καθηγητής Χειρουργικής

Παναγιώτης Θεοδωρόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Στα παιδιά μου Κωνσταντίνο και Εμμανουέλα

Στον Βαγγέλη

Στους γονείς μου

Στους δασκάλους μου
... με σεβασμό και ευγνωμοσύνη..

Πίνακας Περιεχομένων

σελ.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1

1. Εισαγωγή 2

2. Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού 3

3. Προγνωστικοί παράγοντες στο μεταστατικό καρκίνο μαστού 4

4. Προβλεπτικοί παράγοντες στο μεταστατικό καρκίνο μαστού 4

5. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (Minimal Residual Disease, MRD) 5

6. Διάσπαρτα καρκινικά (DTCs) και κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) 6

7. Μέθοδοι ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων 7

8. Διασπορά των καρκινικών κυττάρων - Επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή των CTCs 14

9. CTCs με φαινότυπο βλαστικών κυττάρων 18

10. Διαφορές γενοτύπου/φαινοτύπου των CTCs από τον πρωτοπαθή όγκο 19

11. Επιβίωση και πολ/σμος των CTCs 20

12. Έκφραση HER2 στα CTCs 21

13. Ορμονικοί υποδοχείς και CTCs 24

14. EGFR και CTCs 26

15. Κλινική σημασία της ανίχνευσης των διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων (DTCs) στον καρκίνο του μαστού 26

16. Προγνωστική σημασία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) στον πρώιμο καρκίνο του μαστού 28

17. Προγνωστική αξία των CTCs στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού 34

18. Προβλεπτική αξία των CTCs 40

19. CTCs ή DTCs 42

20. Erb υποδοχείς και καρκίνος του μαστού 43

21. Στόχος της διατριβής 49

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 51

1. Ασθενείς/κριτήρια ένταξης/θεραπεία 52

2. Μέθοδοι 54

2.1 Μοριακή ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα 54

α. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) 54

β. Απομόνωση ολικού RNA 55

γ. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) 57

δ. Έλεγχος της ποιότητας των RNA δειγμάτων της RT-PCR 58

ε. Ανίχνευση του CK19mRNA με nested RT-PCR 58

στ. Ανίχνευση του CK19mRNA με real-time RT-PCR 62

2.2 Ανίχνευση των CTCs με την τεχνική του ανοσοφθορισμού 66

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 69

1. Ομάδα των ασθενών που έλαβε gefitinib (iressa) 70

Δραστικότητα του gefitinib (iressa) στα CTCs 72

Δραστικότητα του gefitinib στα EGFR-θετικά CTCs 74

Κλινική έκβαση με βάση την επίδραση της θεραπείας με gefitinib στα CTCs 78

Τοξικότητα του gefitinib 79

2. Ομάδα των ασθενών που έλαβε lapatinib 79

Δραστικότητα του lapatinib στα HER-2 θετικά CTCs 82

Κλινική έκβαση με βάση τη δραστικότητα του lapatinib στα CTCs 85

Αξιολόγηση της έκφρασης HER2 και EGFR στα CTCs πριν την έναρξη της θεραπείας και κατά την τεκμηρίωση προόδου (κλινική ή με βάση την αύξηση του αριθμού των CTCs) 87

Τοξικότητα του lapatinib 88

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 92

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 102

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ 123

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 137

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος του μαστού είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου και η δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες.[1] Η πλειοψηφία των γυναικών με καρκίνο του μαστού διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο, εξαιτίας της διάδοσης της μαστογραφίας στα πλαίσια προληπτικού ελέγχου, όμως ένα ποσοστό έως 5% παρουσιάζονται με μεταστάσεις εξ' αρχής.

Επιπλέον, ποσοστό μέχρι 30% των γυναικών που εμφανίζονται με αρχικό στάδιο νόσου θα αναπτύξουν μεταστατική νόσο.[2] Ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού δεν είναι ιάσιμος και οι στόχοι της θεραπείας είναι η παράταση της επιβίωσης και η βελτίωση της ποιότητας ζωής μέσω του ελέγχου των συμπτωμάτων της νόσου. Η χημειοθεραπεία και η ορμονοθεραπεία αποτελούν τις κυριότερες θεραπείες στον πρώιμο και στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

Ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού αποτελεί μια ετερογενή νόσο που ποικίλλει από τη παρουσία μονήρων μεταστάσεων μέχρι τη διάχυτη διήθηση πολλαπλών οργάνων. Η διάμεση επιβίωση κυμαίνεται μεταξύ 18 έως 24 μηνών, αν και ποικίλλει ανάλογα με τον υπότυπο του καρκίνου, τις θέσεις των μεταστάσεων και το φορτίο της νόσου, με αποτέλεσμα κάποιες ασθενείς να έχουν μακρά επιβίωση.[3-7] Η επιβίωση στη μεταστατική νόσο φαίνεται να βελτιώνεται τα τελευταία χρόνια [8] και πιθανώς αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη και ευρεία εφαρμογή νεότερων θεραπειών.[7] Βιολογικοί δείκτες, όπως η έκφραση ορμονικών υποδοχέων και του υποδοχέα HER-2 είναι προβλεπτικοί και προγνωστικοί παράγοντες ανταπόκρισης στη θεραπεία και της κλινικής πορείας της νόσου.

2. Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες στον πρώιμο καρκίνο του μαστού

Η πρόγνωση, δηλαδή η έκβαση των ασθενών με καρκίνο μαστού αρχικού σταδίου όπως αυτή εκτιμάται μέσω του διαστήματος επιβίωσης χωρίς πρόοδο της νόσου (DFS) και της συνολικής επιβίωσης (OS), εξαρτάται από τους γνωστούς κλινικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, η διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων, η έκφραση ορμονικών υποδοχέων (ER, PR), και η έκφραση του HER- 2 στα νεοπλασματικά κύτταρα. Ακόμα, η παρουσία λεμφαγγειακών διηθήσεων, ειδικά σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης, και ο ιστολογικός τύπος αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες.

Η ανάλυση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων του καρκινικού κυττάρου επιβεβαίωσε την ετερογένεια της νόσου. Έτσι παρατηρήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι: a) Ο Luminal-A, ο οποίος αφορά όγκους με υψηλή έκφραση του ER, χαμηλή έκφραση του HER-2, χαμηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας και χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού. Αυτοί οι όγκοι έχουν την καλύτερη πρόγνωση. β) Ο Luminal-B, ο οποίος αφορά όγκους που είναι ER-θετικοί, με ποικίλη έκφραση του HER-2, αλλά με υψηλότερο βαθμό ιστολογικής κακοήθειας και δείκτη πολλαπλασιασμού απ’ότι οι Luminal-A. γ) Οι HER-2 θετικοί όγκοι εκτός από την υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα, μπορεί να μην εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς (ER, PR αρνητικοί) και χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δ) οι ER-αρνητικοί όγκοι που περιλαμβάνουν πολλούς υπότυπους όπως τους Basal-like, claudin -low και interferon-rich. Οι περισσότεροι από αυτούς τους όγκους εμπίπτουν στην κατηγορία του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού γιατί είναι ER, PR και HER-2 αρνητικοί. Αυτοί οι υπότυποι έχουν μοριακά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τόσο την πρόγνωση τους όσο και τη θεραπεία που θα χρησιμοποιηθεί, ανάλογα με την έκφραση των

υποδοχέων.

Τέλος, η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στο αίμα και στο μυελό των οστών φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων στον καρκίνο του μαστού. Σε αντίθεση με την εμφάνιση κλινικά εμφανών μεταστάσεων που αντιπροσωπεύουν όψιμο συμβάν στη πορεία του καρκίνου, η παρουσία καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ή/και στο μυελό των οστών διαπιστώνεται και πρώιμα και θεωρείται ως δείκτης καρκινικής διασποράς.[9]

3. Προγνωστικοί παράγοντες στο μεταστατικό καρκίνο μαστού

Στη μεταστατική νόσο εκτός από την έκφραση των ER, PR, HER-2 υποδοχέων, άλλοι κλινικοί προγνωστικοί παράγοντες είναι το διάστημα από την ολοκλήρωση της αρχικής θεραπείας μέχρι την υποτροπή της νόσου, ο αριθμός των μεταστατικών θέσεων, και η παρουσία σπλαχνικών μεταστάσεων. Οι ασθενείς με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς έχουν καλύτερη πρόγνωση και ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς με θετικούς και τους δύο ορμονικούς υποδοχείς παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση συγκριτικά με τις ασθενείς που έχουν όγκους που εκφράζουν τον ένα μόνο ορμονικό υποδοχέα (ER+/PR- ή ER-/PR+).[10] Ασθενείς με υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα ή με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, έχουν μικρότερη επιβίωση.[11-13] Το διάμεσο διάστημα μέχρι την υποτροπή της νόσου είναι επίσης σημαντικός προγνωστικός παράγοντας και, αν είναι μεγαλύτερο από 2 έτη, η πρόγνωση είναι καλύτερη.[11, 14-16] Οι ασθενείς με υποτροπή στο θωρακικό τοίχωμα, στα οστά ή στους λεμφαδένες έχουν μεγαλύτερο PFS (επιβίωση χωρίς πρόοδο της νόσου) και συνολική επιβίωση συγκριτικά με αυτές που έχουν ηπατικές μεταστάσεις ή λεμφαγγειακή διασπορά στους πνεύμονες.[14, 15, 17]

Επιπλέον, αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες στη μεταστατική νόσο είναι η πτωχή λειτουργική κατάσταση (PS), η απώλεια βάρους και τα υψηλά επίπεδα LDH στον ορό.[14,

18]

4. Προβλεπτικοί παράγοντες στο μεταστατικό καρκίνο μαστού

Η υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα και των ER, PR υποδοχέων είναι οι πιο σημαντικοί προβλεπτικοί παράγοντες ανταπόκρισης στη θεραπεία. Το ποσοστό ανταπόκρισης σε ορμονοθεραπεία προσεγγίζει το 70% σε ασθενείς με όγκους που εκφράζουν ER και PR ορμονικούς υποδοχείς, 40% σε όγκους που είναι ER+/PR- ή ER-/PR+ και είναι μικρότερο από 10% σε ER-/PR- όγκους.[19, 20] Επιπλέον, παράγοντες που προβλέπουν την ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία είναι το μακρό χρονικό διάστημα από τη διάγνωση της νόσου μέχρι την εμφάνιση μεταστατικής υποτροπής, η ύπαρξη μόνο οστικών μεταστάσεων χωρίς σπλαχνικές εντοπίσεις ή μεταστάσεις στα μαλακά μόρια καθώς επίσης και η ανταπόκριση σε προηγούμενη χορήγηση ορμονοθεραπείας.[21, 22]

Η υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα ανταπόκρισης στο εξανθρωποποιημένο αντίσωμα trastuzumab και pertuzumab καθώς και στο lapatinib που είναι διπλός εκλεκτικός αναστολέας των τυροσινικών κινασών EGFR και HER-2. Επίσης ο θεραπευτικός παράγοντας που έδωσε πρόσφατα θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία του μεταστατικού HER-2 θετικού καρκίνου του μαστού είναι το Ado-trastuzumab emtansine.[23]

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

Παρά την πλήρη χειρουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου, στα αρχικά στάδια της νόσου, ο καρκίνος του μαστού συχνά υποτροπιάζει. Αυτό μπορεί να συμβεί ακόμη και σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, και έτσι φαίνεται ότι η λανθάνουσα αιματογενής διασπορά εμφανίζεται πολύ πριν οι μεταστάσεις γίνουν κλινικά ανιχνεύσιμες. Άρα το σύστημα TNM, που χρησιμοποιείται για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού, αδυνατεί να εντοπίσει με ακρίβεια την ομάδα των ασθενών που θα υποτροπιάσουν

και, τελικά, θα καταλήξουν από τη νόσο.[24] Μετά τη χερουργική εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου, η διασπορά των καρκινικών κυττάρων δημιουργεί την ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο (MRD), και ο στόχος της επιτυχούς επικουρικής θεραπείας πρέπει να είναι η πλήρης εξάλειψή της. Η ανίχνευση μικρομεταστάσεων στο μυελό των οστών (DTCs) ή στο περιφερικό αίμα(CTCs) αποτελούν, εξ'ορισμού, ένδειξη παρουσίας MDR. Κατά συνέπεια, η παρακολούθηση αυτών των κυττάρων θα μπορούσε να παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της ανταπόκρισης της ασθενούς στη θεραπεία.

Όμως η μελέτη της μικρομεταστατικής νόσου παραμένει σε ερευνητικό επίπεδο, χωρίς να έχει ακόμη καθιερωθεί στη κλινική πράξη ως βασικό εργαλείο για τη λήψη θεραπευτικής απόφασης και την παρακολούθηση των ασθενών.[25] Σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση της American Joint Committee on Cancer (AJCC) του 2010, η παρουσία κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα (CTCs) και διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (≤ 0.2 mm) στο μυελό των οστών (DTCs) ή σε άλλους ιστούς πλην των περιοχικών λεμφαδένων ταξινομείται σε μια νέα (M) κατηγορία με τον όρο M0(i+). Όμως η σταδιοποίηση των ασθενών δεν αλλάζει και γίνεται με βάση το σύστημα TNM, δεδομένου ότι δεν υπάρχει κλινικά ή/και απεικονιστικά μεταστατική νόσος.

6. Διάσπαρτα καρκινικά (DTCs) και κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)

Διάσπαρτα καρκινικά κύτταρα (Disseminated Tumor Cells-DTCs) ορίζονται ως "κρύφια" επιθηλιακά κύτταρα τα οποία ανιχνεύονται στο μυελό των οστών γυναικών με καρκίνο μαστού. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs) ορίζονται ως "κρύφια" επιθηλιακά κύτταρα τα οποία ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού. Τέτοια "κρύφια" επιθηλιακά κύτταρα ανιχνεύονται σπάνια στο μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα υγιών ατόμων.[26]

Η παρουσία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Thomas Ashworth.[27] Είκοσι χρόνια αργότερα, ο Steve Paget περιέγραψε στο πρώτο τεύχος του Lancet τη θεωρία ‘με το σπόρο και το έδαφος' σύμφωνα με την οποία, η μετάσταση εξαρτάται από τη διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ επιλεγμένων καρκινικών κυττάρων (ο σπόρος) και ειδικών συστατικών του μικροπεριβάλλοντος (το χώμα), μια υπόθεση που επανήλθε πολλά χρόνια αργότερα από τον Fidler.[28]

Στις μέρες μας, η μελέτη των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων είναι ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα που απασχολεί πολλούς ερευνητές και στο οποίο επικεντρώνεται μεγάλος αριθμός σύγχρονων δημοσιεύσεων.

7. Μέθοδοι ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων

Η ανίχνευση μεμονωμένων μικρομεταστατικών καρκινικών κυττάρων, τόσο στο περιφερικό αίμα (*Circulating Tumor Cells, CTCs*) όσο και στο μυελό των οστών (*Disseminated Tumor Cells, DTCs*) ασθενών με πρώιμο ή και μεταστατικό καρκίνο του μαστού, δεν είναι δυνατή με την καθιερωμένη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης δεδομένου ότι η συχνότητά τους είναι ιδιαίτερα χαμηλή της τάξης του 1 κυττάρου/10^7–10^8 κύτταρα του περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells_PBMCs). Η χρησιμοποίηση διαφόρων μεθοδολογιών εμπλουτισμού των PBMCs σε CTCs/DTCs οι οποίες βασίζονται στο μέγεθος των κυττάρων, το ηλεκτρικό τους φορτίο ή πιο συχνά την έκφραση διαφόρων αντιγόνων στη κυτταρική επιφάνεια, έχουν επιτρέψει την απομόνωση των μικρομεταστατικών κυττάρων σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου. Από τις μεθόδους αυτές οι πλέον διαδεδομένες είναι αυτές οι οποίες βασίζονται σε διαβαθμιζόμενη φυγοκέντριση με τη χρήση Ficoll/Hypaque, OncoQuick, τεχνικές ανοσομαγνητικού διαχωρισμού των κυττάρων - όπως διαχωρισμός με τη χρήση μαγνητικού

πεδίου και μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με ειδικά αντισώματα.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων *βασίζονται είτε στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ή είναι μοριακές τεχνικές.* Η ανοσοκυτταροχημεία, ο ανοσοφθορισμός και η κυτταρομετρία ροής είναι τεχνικές που βασίζονται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών - που εκφράζονται μεν στα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης αλλά όχι στα κύτταρα μεσεγχυματογενούς προέλευσης όπως τα αιμοποιητικά κύτταρα του αίματος και του μυελού των οστών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν ειδικά καρκινικά αντιγόνα τα οποία να εκφράζονται αποκλειστικά και μόνο στα καρκινικά κύτταρα ώστε να επιτραπεί η άμεση ανίχνευσή τους. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σαν δείκτες πρωτεΐνες επιθηλιακής προέλευσης όπως κυτταροκερατίνες ή μόρια προσκόλλησης (EpCAM), οι οποίες εκφράζονται, κατά κύριο λόγο, στα καρκινικά κύτταρα αλλά όχι στα μεσεγχυματικά αιμοποιητικά κύτταρα.[29-31] Η παρουσία κυττάρων που εκφράζουν αυτές τις πρωτεΐνες στο περιφερικό αίμα ή/και το μυελό των οστών, αποτελεί ισχυρή ένδειξη αιματογενούς διασποράς νεοπλασματικών κυττάρων επιθηλιακής προέλευσης.[32] Με βάση τα δεδομένα αυτά, τα CTCs μπορούν να ανιχνευθούν από το μοτίβο της χρώσης τους (staining pattern) καθώς και κριτήρια βασισμένα σε κατευθυντήριες οδηγίες.[33] Τα μορφολογικά αυτά κριτήρια περιγράφονται σαν κριτήρια της Meng και είναι: μεγάλος λόγος πυρήνα προς κυτταρόπλασμα, μεγαλύτερα κύτττταρα από τα λευκά αιμοσφαίρια και ο πυρήνας είναι συνήθως κοκκιώδης ή διάστικτος.

Επιπλέον, η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων επιτρέπει την άμεση ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των CTCs/DTCs με ανοσοσφθορισμό ή ανοσο-κυτταροχημεία.

Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, οι κυτταροκερατίνες που έχουν περισσότερο μελετηθεί είναι οι CK-8,18,19 ενώ μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία φαίνεται να παρουσιάζει η κυτταροκερατίνη-19 (CK-19).[34]

Ανοσοκυτταροχημικά έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία καρκινικών κυττάρων στο

μυελό των οστών σε ποσοστό 20-30% των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού.[34] Η ευαισθησία της μεθόδου εκτιμάται σε περίπου 1 καρκινικό κύτταρο ανά 10^4 έως 10^5 φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα.[35, 36] Ο περιορισμός στη διαγνωστική αξία της μεθόδου οφείλεται στη διασταυρούμενη αντίδραση των χρησιμοποιούμενων μονοκλωνικών αντισωμάτων με τα φυσιολογικά κύτταρα του μυελού.[37-39]

Μια τεχνική που βασίζεται στον ανοσοφθορισμό και την κυτταρομετρία ροής αποτελεί τη βάση του ημι-αυτοματοποιημένου συστήματος, CellSearch system (Veridex, Warren, New Jersey, USA). Το σύστημα αυτό επιτρέπει την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των CTCs. Μετά από ένα αρχικό στάδιο εμπλουτισμού με τη χρήση σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι του EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), ακολουθεί χρώση των EpCAM-θετικών κυττάρων τόσο με ένα αντίσωμα έναντι των κυτταροκερατινών 8,18,19, όσο και με ένα αντίσωμα ειδικό για το CD45 (πρωτείνη που εκφράζεται σε όλα τα PBMCs) και με 4΄6-diamidino-2-phenylindole-2 (DAPI-το οποίο χρωματίζει τους πυρήνες των κυττάρων).[40] Ως CTC χαρακτηρίζεται ένα κύτταρο θετικό για κυτταροκερατίνη και DAPI και αρνητικό για το CD45.

Έχουν δημοσιευθεί επίσης μέθοδοι με τις οποίες επιτυγχάνεται ανίχνευση CTCs από ολικό αίμα χωρίς να προηγηθεί άλλο στάδιο εμπλουτισμού παρά μόνο λύση ερυθρών αιμοσφαιρίων.[41, 42] Όσον αφορά στον ανοσοφθορισμό, η προτιμώμενη μέθοδος ανίχνευσης είναι η αυτοματοποιημένη ψηφιακή μικροσκοπία (automated digital microscopy, ADM), που όμως είναι πολύ αργή στη σάρωση. Έχει δημοσιευθεί η χρήση 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.[41] Με τη FAST κυτταρομετρία, μπορεί να γίνει διέγερση φθοριζουσών 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 τη τεχνική της ADM με παρόμοια ευαισθησία και αυξημένη ειδικότητα.[41] Οι ερευνητές προτείνουν τη συνδυασμένη χρήση της τεχνολογίας FAST και της ADM για την ανίχνευση σπάνιων CTCs σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο καρκίνου.[41] Εκτιμάται ότι σε πρώιμα στάδια καρκίνου, μικρομεταστατικά κύτταρα ανευρίσκονται στη κυκλοφορία σε συγκεντρώσεις $1/10^6$ - 10^7 PBMCs [43] Αν λάβουμε υπόψη μας το κατώτερο όριο ανίχνευσης, απαιτείται ένα δείγμα με 100 εκατομμύρια αιμοποιητικά κύτταρα για να ανιχνευθεί τουλάχιστον 1 CTC με υψηλή πιθανότητα (99,995%). Για την ανάλυση με ADM ενός τέτοιου δείγματος, ένας κυτταρολόγος θα χρειαζόταν 18 ώρες για να αναλύσει 3000-30000 εικόνες. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία FAST, μια πρώτη σάρωση 100 εκατομμυρίων κυττάρων καταλήγει σε 1500 εικόνες, οι οποίες μετά από επανασάρωση με ADM μειώνονται σε 300 και έτσι ο ίδιος κυτταρολόγος χρειάζεται τελικά μόνο 5 λεπτά 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.

Μια άλλη προτεινόμενη μέθοδος για την ανίχνευση κυκλοφορούντων επιθηλιακών κυττάρων (Circulating Epithelial Tumor Cells, CETCs) χωρίς να προηγηθεί στάδιο εμπλουτισμού αποτελεί η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) μετά από χρώση των κυττάρων με αντισώματα έναντι του EpCAM και CD45 σεσημασμένα με φθορίζουσες ουσίες.[42]

Πρόσφατα, οι Nagrath και συνεργάτες δημοσίευσαν την ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής (“CTC-chip”) ικανής για την αποτελεσματική ανίχνευση και επιλεκτική απομόνωση ανέπαφων CTCs από ολικό αίμα. Η τεχνολογία βασίζεται στην αντίδραση ανάμεσα σε CTCs και μικροβοθρία (microposts) επικαλυμμένα με αντίσωμα έναντι του EpCAM κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μικροροής, και δεν απαιτεί προηγουμένως

σήμανση ή άλλη επεξεργασία των δειγμάτων.[44]

Οι μοριακές τεχνικές βασίζονται κυρίως στην ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων (mRNA μεταγράφων με RT-PCR). Οι μέθοδοι της PCR και RT-PCR βασίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών στα μικρομεταστατικά κύτταρα, σε επίπεδο DNA και mRNA αντίστοιχα, που τα διαφοροποιούν από τα αιμοποιητικά κύτταρα.[29-31] Διάφοροι δείκτες έχουν καθοριστεί για τον προσδιορισμό των CTCs μοριακά όπως οι EpCAM, οι κυτταροκερατίνες και η μαστοσφαιρίνη (mammaglobin).[45]

Διάφοροι ερευνητές έχουν συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων.[46, 47] 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. Με τη χρήση της PCR, «ενισχύεται» το DNA του δείγματος, παρέχοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης ενός εξαιρετικά μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων από ένα συνολικό κυτταρικό πληθυσμό. Επομένως, τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα περιορίζονται και βελτιώνεται η ευαισθησία της μεθόδου. Συγκεκριμένα, η RT-PCR έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης 1 CTC/10^6 μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού, δηλαδή ευαισθησία τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή της ανοσοκυτταροχημείας. Ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι η μικρή ειδικότητα, λόγω της έλλειψης ειδικών για τον κάθε τύπο επιθηλιακού όγκου αλληλουχιών, που περιορίζει τη διαγνωστική αξία της μεθόδου.[30]

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί χρησιμοποιώντας είτε τις μεθόδους που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα είτε αυτές που βασίζονται στα αντισώματα.[48] Η επιμόλυνση με γενωμικό DNA κατά τη διάρκεια της απομόνωσης ολικού RNA, η έκτοπη ή παράτυπη (illegitimate) έκφραση ή επαγωγή της έκφρασης επιθηλιακών δεικτών CTCs/DTCs σε μονοπύρηνα αιμοποιητικά κύτταρα ή λεμφοκύτταρα

από κυτταροκίνες και η παρουσία ψευδογονιδίων της CK-19 έχουν αναφερθεί ως αίτια για τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, όταν γίνεται χρήση μεθόδων που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα.[49-52] 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.[53]

Παρόμοιοι περιορισμοί έχουν περιγραφεί με μεθόδους που βασίζονται στη χρήση αντισωμάτων. Πολλά από τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τη χρώση επιθηλιακών κυττάρων ή κυττάρων καρκίνου του μαστού είναι γνωστό ότι περιστασιακά αναγνωρίζουν αιμοποιητικά κύτταρα με παράτυπη έκφραση κυτταροκερατινών (CK-19) ή MUC1. Μη ειδική χρώση πλασματοκυττάρων μπορεί επίσης να συμβεί εξαιτίας της αντίδρασης αλκαλικής φωσφατάσης εναντίον των κ και λ ελαφρών αλύσων στην επιφάνεια του κυττάρου. Η βελτιστοποίηση των αντισωμάτων και η χρήση των κατάλληλων αρνητικών δειγμάτων ελέγχου βοηθούν στην αντιμετώπιση των παραπάνω 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 επηρεαστεί από παράγοντες όπως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη δειγματοληψία μέχρι την επεξεργασία του δείγματος, ο χρόνος της ανάλυσης και η θερμοκρασία κατά την επεξεργασία, τα οποία επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση.[54] Επιπλέον, τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να προκληθεί από επιμόλυνση κατά τη φλεβοκέντηση, την επαφή με ξένες επιφάνειες ή ακόμη την έκθεση σε συστατικά από κατεστραμένα κύτταρα, όπως η αιμοσφαιρίνη. Το ενδοκυττάριο RNA μπορεί να αποδομηθεί κατά την ex vivo παραμονή του αίματος, από ειδικές και μη ειδικές ενδογενείς ριβονουκλεάσες.[54] 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. Προτείνεται μάλιστα ότι σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την υποξία και το κυτταρικό stress μπορεί να ενεργοποιούνται στα δείγματα, των οποίων η επεξεργασία καθυστερεί, ενώ σημαντικοί μηχανισμοί, όπως ο κυτταρικός κύκλος, ο πολλαπλασιασμός, η μεταγραφική ρύθμιση και η απόπτωση μπορεί να καταστέλλονται στα δείγματα αυτά.[54] Αξιοσημείωτο είναι ότι μεταγραφικές αποκρίσεις στο stress συμβαίνουν μόλις 2 ώρες μετά την αιμοληψία.[54]

Κατά την ανίχνευση CTCs στο περιφερικό αίμα, η καθυστέρηση επεξεργασίας των δειγμάτων, 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 stress, ιδιαίτερα όταν η ποσότητα του RNA στόχου είναι πάρα πολύ μικρή, όπως ισχύει στη περίπτωση της ανίχνευσης CTCs στο περιφερικό αίμα. Εναλλακτικά, υπάρχουν διαθέσιμα kit στο εμπόριο, όπως το PAXgene (Qiagen), για τη συλλογή, σταθεροποίηση και απευθείας απομόνωση του RNA από ολικό αίμα, τα οποία εξασφαλίζουν σταθεροποίηση του RNA μέχρι και 5 ημέρες μετά την αιμοληψία.

Όπως προαναφέρθηκε, οι περισσότερες σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων βασίζονται στην έκφραση επιθηλιακών δεικτών. Όμως λόγω της υπόθεσης ότι η διασπορά των καρκινικών κυττάρων συνοδεύεται από «επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή» (EMT), με αποτέλεσμα ελαττωμένη έκφραση επιθηλιακών δεικτών, νέες μέθοδοι προσπαθούν να ανιχνεύσουν CTCs που δεν εκφράζουν επιθηλιακούς δείκτες. Ως εκ τούτου, μία ιδανική μέθοδος ανίχνευσης κυκλοφορούντων

καρκινικών κυττάρων θα πρέπει να περιλαμβάνει επιθηλιακούς δείκτες που δεν υποστρέφουν κατά την EMT ή /και μεσεγχυματικούς δείκτες που επάγονται κατά την EMT. Επιπλέον, θα πρέπει να μπορεί να διαχωρίσει τα βιώσιμα από τα αποπτωτικά CTCs, έτσι ώστε, να ανιχνεύει και χαρακτηρίζει τα CTCs που πραγματικά σχετίζονται με τη δημιουργία μεταστάσεων. Τέλος, θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα μοριακής ανάλυσης των ανιχνευθέντων CTCs και να συγκρίνει τα χαρακτηριστικά τους με αυτά του πρωτοπαθούς όγκου και των εμφανών μεταστάσεων.

8. Διασπορά των καρκινικών κυττάρων - Επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή των CTCs

Κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης διάφοροι υποπληθυσμοί κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου αποκτούν δυνατότητες διήθησης και κινητικότητας και εισέρχονται σε αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία είναι ακόμη υπό έρευνα. Ωστόσο, φαίνεται να επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ καρκινικών κυττάρων και του στρώματος που τα περιβάλλει όπως για παράδειγμα, απόκριση σε υποξικά ερεθίσματα, διήθηση περιβάλλοντος ιστού εξαρτώμενη από μεταλλοπρωτεϊνάσες, νεοαγγείωση του όγκου καθώς και απόκτηση φαινοτύπου επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετατροπής (epithelial-mesenchymal transition-EMT) τουλάχιστον σε έναν υποπληθυσμό καρκινικών κυττάρων του όγκου που αποκτούν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων.[55-57]

Μόλις τα κύτταρα εξαπλωθούν μπορούν να δημιουργήσουν δευτεροπαθείς εστίες σε ένα νέο περιβάλλον ενός οργάνου (για παράδειγμα μυελό των οστών, ήπαρ, πνεύμονα ή εγκέφαλο). Τα CTCs / DTCs ωστόσο μπορεί επίσης να υποστούν απόπτωση ή να παραμείνουν στη λεγόμενη λανθάνουσα κατάσταση (dormancy) για χρόνια.[58] Τα CTCs που εξαγγειώνονται έχουν τη δυνατότητα να επιβιώσουν ως DTCs στο νέο τους

μικροπεριβάλλον, να μετατραπούν σε πιο επιθετικές μορφές και να δώσουν εμφανείς μεταστάσεις,[59] ή / και μπορούν να μπουν ξανά στη κυκλοφορία και να μεταναστεύσουν σε άλλα όργανα ή ακόμα και πίσω στον πρωτοπαθή όγκο.[60, 61]

Μεγάλος αριθμός κυττάρων εισέρχεται στη κυκλοφορία του αίματος συνεχώς, αλλά τα περισσότερα κύτταρα αποπίπτουν ή καταστρέφονται από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων μπορεί να εμφανιστεί στην όψιμη φάση της ογκογένεσης όταν ο πρωτοπαθής όγκος φτάσει σε ένα κρίσιμο μέγεθος και αποκτήσει ιδιαίτερα επιθετικό φαινότυπο (γραμμικό μοντέλο), ή να ξεκινήσει πολύ νωρίτερα, όταν ο αρχικός όγκος είναι μικρού μεγέθους (παράλληλο μοντέλο).[62] Στη δεύτερη περίπτωση, τα CTCs/DTCs που εγκαθίστανται σε απομακρυσμένα όργανα δημιουργούν ένα νέο κλώνο που εξελίσσεται παράλληλα με τον πρωτοπαθή όγκο. Και στα δύο μοντέλα η εμφάνιση μετάστασης είναι θανατηφόρα για την ασθενή. Η διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) αποτελεί το πρώτο βήμα στη διαδικασία της μετάστασης γιατί επιτρέπει στα κύτταρα να αποκτήσουν κινητικότητα και να μεταναστεύσουν.[55] Έτσι κατά την EMT τα καρκινικά κύτταρα χάνουν τα επιθηλιακά χαρακτηριστικά τους και αποκτούν μεσεγχυματικό φαινότυπο. Αυτό γίνεται με την καταστολή των κυτταροκερατινών, της EpCAM και της E-cadherin (μόριο προσκόλλησης) και την αύξηση (upregulation) μεσεγχυματικών δεικτών όπως της βιμεντίνης και της N-cadherin.[63, 64] Η EpCAM εκφράζεται στα υγιή επιθηλιακά κύτταρα και είναι ο πιο γνωστός δείκτης επιφανείας των επιθηλιακών κυττάρων, έχει συγκολλητικές ιδιότητες και έτσι εμποδίζει τη κυτταρική διασπορά. Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της EMT είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού με αλλαγές σε διάμεσα ινίδια προκειμένου να βελτιωθεί η κινητικότητα των κυττάρων. Οι κυτταροκερατίνες αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια των διάμεσων ινιδίων και είναι κυρίως παρούσες στα επιθηλιακά κύτταρα. Διάμεσα ινίδια συνήθως εκτείνονται μέσω του κυτταροπλάσματος, παρέχουν αντοχή στα

κύτταρα και συνεργάζονται για τη προσκόλληση του κυττάρου με τα γειτονικά κύτταρα. Η έκφραση συγκεκριμένων κυτταροκερατινών εξαρτάται από το είδος του ιστού και του σταδίου διαφοροποίησης με συνέπεια, τα περισσότερα αδενοκαρκινώματα και επιθηλιακά καρκινώματα προερχόμενα από αδενικό ιστό να εκφράζουν τις CK8, CK18 και CK19. Το πρόβλημα στη χρήση των κυτταροκερατινών ως δείκτου για την ανίχνευση των CTCs είναι ότι αρκετές από αυτές συχνά υποεκφράζονται (down-regulated) σε υψηλής κακοήθειας καρκινώματα του μαστού. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι συμβαίνουν αλλαγές στην έκφραση τους κατά τη διάρκεια της EMT.[65, 66]

Η ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου γίνεται από τα βλαστικά κύτταρα (CSCs), τα οποία έχουν μεγάλη πλαστικότητα και μπορούν να αναπτύξουν χαρακτηριστικά EMT. Τα CSCs που ανέπτυξαν χαρακτηριστικά EMT καθίστανται ικανά να διηθήσουν τον περιβάλλοντα ιστό, σχηματίζοντας ένα πρωτεολυτικό MICROTRACK στο οποίο ακολουθούν τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα. Κατά συνέπεια, τα CSCs και τα μη-CSCs κύτταρα εισέρχονται στη κυκλοφορία, και πολλά από αυτά τα κύτταρα αποπίπτουν. Τα CSCs μπορεί να έχουν αυξημένη ικανότητα επιβίωσης, εξαγγειώνονται και εγκαθιδρύονται σε κάποιο όργανο, και γίνονται τα κύτταρα που δίνουν έναρξη στη μετάσταση [metastasis-initiating cell (MIC)]. Είναι ενδιαφέρον, ότι για να να σχηματίσουν μια εμφανή μετάσταση, τα MIC πρέπει να αποκτήσουν ξανά επιθηλιακό φαινότυπο. Αν αυτό το μοντέλο είναι σωστό, οι μέθοδοι ανίχνευσης CTCs που στηρίζονται μόνο σε επιθηλιακούς δείκτες θα χάσουν τα κυκλοφορούντα MICs, που είναι τα πλέον σημαντικά κύτταρα αφού δίνουν γένεση στη μετάσταση, και με βάση τα χαρακτηριστικά τους θα μπορούσαν να αναπτυχθούν θεραπευτικές στρατηγικές. Η ιδανική μέθοδος ανίχνευσης των CTCs θα πρέπει να περιλαμβάνει επιθηλιακούς δείκτες που δεν καταστέλλονται κατά τη διάρκεια της EMT ή / και μεσεγχυματικών δεικτών που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της EMT. Επιπλέον, είναι σημαντικό να γίνει διάκριση των βιώσιμων από τα αποπτωτικά CTCs και

να καθοριστεί το προφίλ των πιο «επικίνδυνων» κυττάρων, των MICs.

Οι Aktas και συν.[67] ανακοίνωσαν ότι τουλάχιστον ένας από τους EMT δείκτες (Twist 1, Akt 2 ή PI3Ka) εκφράζεται σε ποσοστό 62% των CTCs-θετικών και 7% των CTCs-αρνητικών ασθενών, αντίστοιχα. Αντιθέτως, μια άλλη μελέτη που διερεύνησε την έκφραση διαφόρων EMT-μεταγραφικών γονιδίων (Twist, Snail1, Slug, Zeb1 και FoxC2) έδειξε ότι η έκφραση τουλάχιστον ενός από αυτούς τους παράγοντες ανιχνεύθηκε σε ποσοστό μόλις 15.3 % ασθενών με μη-μεταστατικό καρκίνο μαστού. Επίσης, αυτές οι ασθενείς που είχαν λάβει εισαγωγική θεραπεία είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να εκφράζουν EMT δείκτες συγκριτικά με αυτές που δεν έλαβαν. Οι Raimond και συν.[68] διαπίστωσαν την παρουσία δύο EMT δεικτών της βιμεντίνης και φιμπρονεκτίνης σε CK-θετικά και CK-αρνητικά κύτταρα στο αίμα σε ποσοστό 28% και 38%, αντίστοιχα, σε όλα τα στάδια του καρκίνου του μαστού. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η φιμπρονεκτίνη και/ή βιμεντίνη εκφράζονταν συχνότερα στα CK-αρνητικά (55%) από ότι στα CK-θετικά κύτταρα (43%) και ότι οι EMT δείκτες προέβλεπαν με μεγαλύτερη ακρίβεια την πτωχή πρόγνωση από ότι η έκφραση μόνο των επιθηλιακών δεικτών (CKs)[69] ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφραση αυτών των πρωτεϊνών σε υγιείς δότες. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση από τους Kallergi και συν, ότι η βιμεντίνη και το Twist μπορεί να συνεκφράζονται στο ίδιο CK-θετικό κύτταρο και ότι υπήρχε μεγαλύτερη αναλογία των CTCs που εξέφραζαν έναν από τους EMT δείκτες σε ασθενείς με μεταστατικό συγκριτικά με πρώιμο καρκίνο μαστού.[70]

Οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι τα CTCs μπορεί να έχουν έναν ενδιάμεσο ημι-μεσεγχυματικό φαινότυπο. Επίσης, τα CTCs που υπόκεινται σε EMT μπορεί να είναι ένας πληθυσμός διηθητικών κυττάρων ανθεκτικών στην εισαγωγική χημειοθεραπεία. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι EMT δείκτες, όπως η βιμεντίνη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά των επιθηλιακών δεικτών για την ανίχνευση των CTCs, όπως στον καρκίνο του προστάτη.[71] Ωστόσο, η βιμεντίνη εκφράζεται επίσης σε ένα υποπληθυσμό

διαφοροποιημένων και/ή ενεργοποιημένων μονοκυττάρων[72] και επομένως είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός EMT-δεικτών ειδικών για τα CTCs.

9. CTCs με φαινότυπο βλαστικών κυττάρων

Η EMT προϋποθέτει την απώλεια των επιθηλιακών χαρακτηριστικών και τη de novo απόκτηση του μεσεγχυματικού φαινότυπου και τις ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, η εμμένουσα ανίχνευση αυτών των υποπληθυσμών των CTCs θεωρείται ότι είναι η πηγή της μεταστατικής εξάπλωσης και της αντοχής στη συμβατική χημειοθεραπεία.

Η έκφραση ενός δείκτη των βλαστικών κυττάρων, της ALDH1, στα CTC-θετικά δείγματα αίματος ασθενών με καρκίνο μαστού κυμαίνεται από 46%[68] έως σχεδόν 70%.[67] Όπως ήταν αναμενόμενο, η ALDH1 συσχετίσθηκε με EMT δείκτες σε αυτά τα δείγματα[67, 68] και με προχωρημένο στάδιο νόσου.[68] Οι Theodoropoulos και συν. ανέλυσαν ένα σύνολο 1439 CTCs που απομόνωσαν από 130 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού και έδειξαν ότι 35.2 % των CTCs παρουσίαζε φαινότυπο ομοιάζοντα των βλαστικών κυττάρων $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ σε 20 ασθενείς και 17.7% των CTCs παρουσίαζαν τον φαινότυπο $ALDH1^{high}/CD24^{-/low}$ σε 7 ασθενείς.[73] Λαμβάνοντας υπόψη το πρότυπο των βλαστικών κυττάρων, τη δυνατότητά τους να ανανεώνονται και την ανθεκτικότητά τους στη χημειοθεραπεία, κατανοούμε ευκολότερα τη δυσκολία στη προσπάθεια εκρίζωσής τους. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι ασθενείς με ALDH1-θετικά CTCs δεν ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία.[67]

Πρόσφατα οι Kallergi και συν,[74] έδειξαν ότι σε CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού εκφράζονται υποδοχείς και ενεργοποιημένες κινάσες του μονοπατιού του EGFR υποδοχέα (EGFR/HER2/PI3Kα/Akt) το οποίο είναι ένα από τα μείζονα μονοπάτια που εμπλέκονται στη ρύθμιση των προβαθμίδων των βλαστικών κυττάρων του μαζικού

αδένα.[75] Επιπλέον, σε μια άλλη μελέτη, δείχθηκε ότι τα CTCs των CTC-θετικών ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού εξέφραζαν σε ποσοστό 86% μία ή περισσότερες πρωτεΐνες συνδεόμενες με τη πολλαπλή αντοχή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα (multi-drug resistance) [MRP1, MRP4, MRP5, MRP7]. Οι ασθενείς με MRP θετικά CTCs παρουσίαζαν σημαντικά ελαττωμένο διάστημα μέχρι την εμφάνιση προόδου νόσου.[76]

10. Διαφορές γενοτύπου/φαινοτύπου των CTCs από τον πρωτοπαθή όγκο

Τα CTCs αντιπροσωπεύουν κύτταρα τα οποία έχουν εξαπλωθεί στο οργανισμό και είναι αυτά που θα εγκατασταθούν σε άλλα όργανα και θα δώσουν γένεση στη μετάσταση. Σχετικά συχνά έχουν διαπιστωθεί διαφορές στον φαινότυπο των CTCs και σε εκείνο των κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου. Εχει αναφερθεί η ανίχνευση HER-2-θετικών CTCs σε ασθενείς με HER-2 αρνητικό πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού και αντιστρόφως, HER-2-αρνητικά CTCs παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με HER-2 θετικό όγκο.[74, 76-81] Παρόμοιες αποκλίσεις έχουν αναφερθεί για την έκφραση του EGFR[74] , για τον άλφα υποδοχέα των οιστρογόνων (ERα)[76, 82] και τον υποδοχέα προγεστερόνης.[82] Αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε να εξηγηθεί από τους περιορισμούς των χρησιμοποιούμενων πειραματικών μεθόδων όπως για παράδειγμα παραλείποντας στην ανάλυση μικρούς κλώνους καρκινικών κυττάρων εντός του πρωτοπαθούς όγκου. Ωστόσο, τα CTCs πιθανώς υφίστανται ισχυρή επιλογή κατά τη διάρκεια της διασποράς τους ή κατά τη χορήγηση συστηματικής θεραπείας και η γενωμική αστάθεια τους θα μπορούσε να οδηγήσει στη παραγωγή νέων κυτταρικών κλώνων με φαινοτυπικές/γενοτυπικές διαφορές συγκριτικά με τα κύτταρα του πρωτοπαθούς όγκου. Επιπλέον, τα CTCs μπορούν επίσης να εξαπλωθούν στη κυκλοφορία του αίματος από δευτεροπαθείς θέσεις[58, 60] και, συνεπώς, ο γονότυπος/φαινότυπός τους θα μπορούσε να ομοιάζει με τα κύτταρα της μετάστασης αντί εκείνων του πρωτοπαθούς όγκου. Συνεπώς, η άμεση εκτίμηση των CTCs παρέχει επιπλέον πληροφορία που πιθανώς

να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς στόχους πέραν των πληροφοριών που προκύπτουν από την ανάλυση του πρωτοπαθούς όγκου.

Με βάση τα προαναφερθέντα, είναι λοιπόν ζωτικής σημασίας η γονοτυπική και φαινοτυπική ανάλυση των CTCs και η σύγκρισή τους με εκείνων του πρωτοπαθούς όγκου και των μεταστάσεων.

11. Επιβίωση και πολ/σμος των CTCs

Τα CTCs που απομονώνονται από το περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο έχουν χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 1-2.5 ώρες.[83] Αποτελούν πληθυσμό κυττάρων με μεγάλη ετερογένεια και μπορεί να είναι αποπτωτικά ή βιώσιμα, αλλά οι περισσότερες μέθοδοι που εφαρμόζονται σήμερα δεν μπορούν να κάνουν αυτή τη διάκριση. Επίσης, δεν διακρίνουν αν βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού ή μη. Ωστόσο, και τα δύο χαρακτηριστικά αυτά, θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μη αποπτωτικών CTCs ήταν το EpiSpot. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται πρωτείνες που απελευθερώνονται από τα DTCs/CTCs, τα οποία καλλιεργούνται για μικρό χρονικό διάστημα σε επαφή με μία μεμβράνη επικαλυμένη με αντισώματα, τα οποία δεσμεύουν τις πρωτείνες που εκκρίνονται από τα DTCs/CTCs. Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται στη συνέχεια από άλλα αντισώματα σημασμένα με φθοριόχρωμα. Στον καρκίνο του μαστού, έχει ανιχνευθεί η απελευθέρωση κυτοκερατίνη-19 (CK19) και μουκίνη-1 (MUC 1) αποδεικνύοντας ότι πολλοί ασθενείς έφεραν μη αποπτωτικά DTCs, ακόμη και όταν είχαν εντοπισμένο καρκίνωμα μαστού.[84]

Πρόσφατα, η προσθήκη ενός πρώιμου δείκτη απόπτωσης, του M30 στην κλασσική χρώση των κυτταροκερατινών, επέτρεψε την εκτίμηση της αναλογίας των βιώσιμων προς τα αποπτωτικά CTCs.[85] Στα CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού έχει παρατηρηθεί

απουσία ή μειωμένη έκφραση της πυρηνικής πρωτεϊνης Ki-67 που είναι δείκτης πολ/σμού των κυττάρων.[81, 86] Αυτό δείχνει ότι τα κύτταρα αυτά δεν πολλαπλασιάζονται και βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση (tumor dormancy).

Τη διαδικασία 'tumor dormancy' χρησημοποιούν τα κύτταρα για να επιβιώσουν, κατά την οποία δεν πολλαπλασιάζονται, παραμένουν ανενεργά για άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα και άγνωστα ερεθίσματα προκαλλούν κάποια στιγμή την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό τους. Ο μηχανισμός του tumor dormancy έχει ενοχοποιηθεί τόσο για την εμφάνιση καθυστερημένων υποτροπών [87] όσο και για την αντίσταση στη χημειοθεραπεία δεδομένου ότι CTCs που εκφράζουν δείκτες tumor dormancy μπορεί να ανιχνευθούν χρόνια μετά την αρχική διάγνωση.[83, 88]

12. Έκφραση HER2 στα CTCs

Τα μικρομεταστατικά κύτταρα που ανιχνεύονται στο μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού εκφράζουν τον HER-2 υποδοχέα σε ποσοστό 60-70% και η έκφραση αυτή αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα δυσμενούς επιβίωσης.[89, 90] Στη μελέτη των Wulfing και συν.[79] η ανίχνευση HER-2-θετικών CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού σταδίου I-III σχετίσθηκε με αυξημένο μέγεθος όγκου, απουσία ER-υποδοχέων και πτωχή διαφοροποίηση του πρωτοπαθούς όγκου. Επιπλέον, η ανίχνευσή τους συσχετίσθηκε με σημαντική μείωση της DFS ($p< 0.005$) και της OS ($p< 0.05$). Σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε, επίσης, ασυμφωνία στην έκφραση του HER-2 υποδοχέα μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των CTCs.

Η έκφραση του HER-2 στα CTCs είναι ο βιοδείκτης που έχει περισσότερο μελετηθεί στον καρκίνο του μαστού. Γνωρίζουμε ότι η έκφραση του HER-2 μπορεί να μεταβληθεί στην υποτροπή της νόσου συγκριτικά με τον πρωτοπαθή όγκο και, επίσης, ότι η έκφρασή του στον πρωτοπαθή όγκο αποτελεί προϋπόθεση για τη χορήγηση στοχευμένης

θεραπείας.[77, 91-94] Η επαναξιολόγηση της έκφρασης του HER-2 στα CTCs θα μπορούσε να είναι μία προσέγγιση με πιθανές κλινικές εφαρμογές. Επιπλέον, διαφορές μεταξύ των CTCs και του πρωτοπαθούς όγκου μπορεί να επηρεάσουν την ανταπόκριση της ασθενούς στη θεραπεία που χορηγείται με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου.[80, 95] Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του HER-2 στα CTCs/DTCs μπορεί να οφείλεται στην ενίσχυση του HER-2 γονιδίου ή την ύπαρξη κυττάρων με διαφορετικό αριθμό χρωμοσωμάτων (aneusomy)[81, 96, 97] στα CTCs των ασθενών με μεταστατικό και με πρώιμο καρκίνο μαστού. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ανίχνευση του HER-2 στα CTCs μπορεί να αποτελεί προγνωστικό παράγοντα τόσο στον μεταστατικό[98] όσο και στον πρώιμο καρκίνο του μαστού.[99]

Οι Ligthart και συν.[100] ανέπτυξαν πρόσφατα ένα αυτοματοποιημένο αλγόριθμο αξιολόγησης της έκφρασης του HER-2 στα CTCs ασθενών με πρώιμο ή/και μεταστατικό καρκίνο μαστού με τη μεθοδολογία του CellSearch και διαπίστωσαν ότι η έκφραση του HER-2 υποδοχέα είναι πολύ ετερογενής μεταξύ των CTCς σε κάθε ασθενή. Σήμερα αποτελεί κοινή παραδοχή ότι HER-2 θετικά CTCs ανιχνεύονται σε ασθενείς με HER-2 αρνητικούς πρωτοπαθείς όγκους.[74, 76-81]

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το ποσοστό των ασθενών με καρκίνο του μαστού με HER-2-αρνητικούς όγκους αλλά HER-2-θετικά CTCs, ήταν 32% με τη μεθοδολογία του CellSearch και 49% με τη μεθοδολογία του AdnaTest.[78] Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε σε 431 ασθενείς με καρκίνο μαστού την έκφραση των HER-2/ER/PR υποδοχέων με AdnaTest και διαπίστωσε μεγάλη ασυμφωνία μεταξύ των CTCs και του πρωτοπαθούς όγκου. Η έκφραση των ER/PR εκτιμήθηκε με τη μέθοδο RT-PCR και διαπιστώθηκε ότι η πλεοψηφία των CTCs ήταν τριπλά “αρνητικά”. Με βάση τα δεδομένα ότι το προφίλ έκφρασης μεταξύ CTCs και πρωτοπαθούς όγκου διαφέρει ουσιαστικά, είναι πιθανόν ότι θα πρέπει ο φαινότυπος των CTCs να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά την

επιλογή της θεραπείας.[101] Διαφορές στην έκφραση του HER-2 μεταξύ των CTCs, της μετάστασης και του πρωτοπαθούς όγκου έχουν δημοσιευθεί σε αρκετές μελέτες. HER-2 θετικά CTCs έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με HER-2 αρνητικό πρωτοπαθή όγκο και αντιθέτως HER-2-αρνητικά CTCs έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με HER-2-θετικό όγκο.[77, 80, 102] Όμως, η παρουσία HER-2 θετικών CTCs απαντάται συχνότερα σε ασθενείς με HER-2 θετικό πρωτοπαθή όγκο.[93, 94]

Η μετατροπή των CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού από HER2-αρνητικά σε HER2-θετικά έχει αποδοθεί στην ενίσχυση του HER2 γονιδίου που αποκτήθηκε κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου.[97] HER2-θετικά CTCs έχουν απομονωθεί μετά από συστηματική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με HER2-αρνητικούς πρωτοπαθείς όγκους σε χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα HER2-θετικά CTCs πιθανώς να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην αντίσταση στη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού HER2-αρνητικό.[96] Σύμφωνα με τα παραπάνω, έχει δειχθεί ότι τα ανθεκτικά CK19 mRNA θετικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα θα μπορούσαν να στοχευθούν αποτελεσματικά με τη χορήγηση trastuzumab.[103, 104]

Οι Bozionelou και συν. μελέτησαν τη δραστικότητα του trastuzumab στα CTCs. Συγκεκριμένα , σε 30 ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου I-III (13 ασθενείς) και σταδίου IV (17 ασθενείς) με CK-19mRNA-θετικά κύτταρα στο αίμα ή/και στο μυελό των οστών χορηγήθηκε trastuzumab μετά από την ολοκλήρωση της καθιερωμένης θεραπείας που είχαν λάβει για τη νόσο τους. Το trastuzumab αρνητικοποίησε την ανίχνευση των CK19mRNA-θετικών κυττάτων σε ποσοστό 93% των ασθενών με τη μέθοδο της nested RT-PCR και 67% των ασθενών με τη μέθοδο RT-PCR.[103]

Οι Rack και συν.[105] μελέτησαν την αποτελεσματικότητα του trastuzumab στην στόχευση HER-2-θετικών, ανθεκτικών στη θεραπεία μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων

στο μυελό των οστών. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, το trastuzumab είναι αποτελεσματικό στην εξάλειψη των HER-2-θετικών κυττάρων από το μυελό των οστών. Δεδομένης της ετερογένειας της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (MRD), αυτοί οι ασθενείς πιθανώς να μπορούν να ωφεληθούν από ένα συνδυασμό στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Τέλος , οι Georgoulias V και συν. μελέτησαν τη δράση του trastuzumab στα HER2 θετικά CTCs και πως αυτή η στόχευση επηρεάζει την κλινική έκβαση των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα 75 γυναίκες με HER-2-αρνητικό πρώιμο καρκίνο μαστού και ανιχνεύσιμα CTCs πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής χημειοθεραπείας τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν trastuzumab ή απλώς να είναι σε παρακολούθηση. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι η χορήγηση του trastuzumab μπορεί να εξαλείψει τα ανθεκτικά στην επικουρική χημειοθεραπεία CK-19-θετικά κύτταρα, μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου και παρατείνει το DFS. Ενδιαφέρον είναι ότι σε ένα ποσοστό 89% των ασθενών που ελέγχθηκαν για τη παρουσία του HER-2 υποδοχέα τεκμηριώθηκε η έκφραση του HER-2 στα CTCs (σε 51ασθενείς από τις 57 γυναίκες στις οποίες έγινε ανίχνευση του HER-2 στα CTCs), επιβεβαιώνοντας την ετερογένεια στην έκφραση του HER2 μεταξύ CTCs και πρωτοπαθούς όγκου.[104]

13. Ορμονικοί υποδοχείς και CTCs

Η απώλεια της έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων ER και PR κατά τη πορεία της νόσου θεωρείται ως αιτία για τη πτωχή ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία, ασθενών με καρκίνο μαστού που έχουν θετικούς ορμονικούς υποδοχείς στον πρωτοπαθή όγκο. Η επαναξιολόγηση της έκφρασης των ER και RP στα CTCs και σε δείγματα όγκου στην υποτροπή θα μπορούσε να βελτιώσει τη προγνωστική αξία των ER και PR, και να κατευθύνει τις θεραπευτικές αποφάσεις που λαμβάνονται, είτε σε μεταστατικούς ασθενείς

ή κατά την εισαγωγική /επικουρική θεραπεία. Σε προηγούμενη μελέτη διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης των ER και PR υποδοχέων μεταξύ των CTCs και του πρωτοπαθούς όγκου σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο μαστού, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της RT - PCR.[101] CTCs βρέθηκαν κυρίως σε τριπλά- αρνητικούς όγκους και πιο συχνά ανιχνεύονται CTCs με τριπλά - αρνητικό φαινότυπο, ανεξάρτητα από την έκφραση των ER, PR και HER2 στον πρωτοπαθή όγκο.[101] Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο φαινότυπος των CTCs πριν και μετά τη θεραπεία γενικά παρέμεινε πανομοιότυπος ωστόσο, ο πιο κοινός φαινότυπος των CTCs ήταν ο τριπλά αρνητικός, ενώ το 95 % των αντίστοιχων πρωτοπαθών όγκων ήταν ER και PR θετικοί.[106] Παρόμοια ευρήματα διαπιστώθηκαν από τη σύγκριση της έκφρασης των ER και PR μεταξύ των CTCs και των πρωτοπαθών όγκων χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία σε ασθενείς με πρώϊμο καρκίνο του μαστού.[96] Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη, οι αλλαγές στην έκφραση των ER και PR στα CTCs παρουσιάστηκαν στα δείγματα πριν και μετά τη συστηματική θεραπεία και θα μπορούσε να εξηγηθεί ως επιλογή των ανθεκτικών κλώνων των CTCs.[96]

Στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι Aktas και συν. περιέγραψαν επίσης την έλλειψη αντιστοιχίας της έκφρασης των ER και PR μεταξύ των CTCs και του πρωτοπαθούς όγκου με τη χρήση RT – PCR.[82] Αξίζει να σημειωθεί ότι, η αξιολόγηση της έκφρασης του ER και PR στα CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού μπορούσε να προβλέψει την ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία σε ποσοστό 78% των ασθενών.[91] Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να εξηγήσουν, εν μέρει τουλάχιστον, γιατί περίπου το 30% των ασθενών δεν ανταποκρίνονται σε αναστολείς της αρωματάσης ως πρώτης γραμμής ορμονική θεραπεία στο μεταστατικό καρκίνο μαστού.[107] Άρα ο φαινότυπος των CTCs θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει το φαινότυπο της μεταστατικής νόσου και θα ήταν ενδιαφέρον να ξέραμε εάν θα ήταν αποτελεσματικό να επιλεγεί μια θεραπεία με βάση το φαινότυπο των CTCs.

Η ορμονοθεραπεία και η χορήγηση του anti-HER2 αντισώματος trastuzumab χορηγούνται μόνο αν εκφράζονται οι αντίστοιχοι υποδοχείς στον πρωτοπαθή όγκο. Όμως, υπάρχουν όλο και περισσότερες αποδείξεις ότι η έκφραση αυτών των υποδοχέων μπορεί να αλλάξει με τη πάροδο του χρόνου, και ειδικά στην υποτροπή ή στη πρόδο της νόσου.[78, 101] Σε αυτό το πλαίσιο, η επαναξιολόγηση των υποδοχέων των ER/PR και HER–2 μέσω του μοριακού χαρακτηρισμού των CTCs θα μπορούσε να είναι μια στρατηγική με πιθανές κλινικές εφαρμογές.

14. EGFR και CTCs

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την έκφραση EGFRmRNA στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού σε ποσοστά 22% έως 48%, με τη μέθοδο RT-PCR.[108, 109] Η ομάδα μας έδειξε ότι οι υποδοχείς EGFR και HER-2 εκφράζονται στα CTCs γυναικών με πρώιμο καρκίνο μαστού σε ποσοστά 38% και 50% ενώ σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού σε ποσοστά 44% και 63%, αντίστοιχα. Επιπλέον, στο 86% των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού που είχαν EGFR-θετικά CTCs ο υποδοχέας ήταν φωσφορυλιωμένος. Επίσης, οι κινάσες PI3K και Akt οι οποίες ενεργοποιούνται downstream από τον EGFR ήταν ενεργοποιημένες σε ποσοστά 88% (14 από 16 ασθενείς) και 81% (13 από 16 ασθενείς) των ασθενών με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού, αντίστοιχα, καταδεικνύοντας τη συμμετοχή του στην επιβίωση των CTCs και αποτελώντας ένδειξη ότι η στόχευση του θα μπορούσε να βοηθήσει στην εξάλειψη αυτού του πληθυσμού των CTCs.[74]

15. Κλινική σημασία της ανίχνευσης των διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων (DTCs) στον καρκίνο του μαστού

Τα DTCs ανιχνεύονται στο μυελό των οστών σε ποσοστό 30-40% των ασθενών με

πρώιμο καρκίνο μαστού. [110] Υπάρχουν πολλές δημοσιευμένες μελέτες που αναφέρονται στη προγνωστική τους σημασία.[111-114]

Οι Braun et al,[110] το 2005 δημοσίευσαν τα αποτελέσματα μιας συγκεντρωτικής ανάλυσης 9 μελετών από διάφορα εργαστήρια που αφορούσε 4703 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού σταδίου I-III. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, DTCs ανιχνεύθηκαν με ανοσοκυτταρολογική μεθοδολογία σε δείγματα μυελού των οστών σε ποσοστό 30.6% των γυναικών και η παρουσία τους συσχετίσθηκε σημαντικά με όγκο μεγαλύτερης διαμέτρου, υψηλότερο βαθμό ιστολογικής κακοήθειας, παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων καθώς και με απουσία έκφρασης ορμονικών υποδοχέων. Η παρουσία DTCs κατά τη διάρκεια της χειρουργικής εξαίρεσης του πρωτοπαθούς όγκου αποτελούσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα δυσμενούς έκβασης όσον αφορούσε στη DFS και στην OS καθώς και στο διάστημα επιβίωσης χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις. Στην υποομάδα των ασθενών χαμηλού κινδύνου δηλαδή με pT1N0 όγκους (1036 ασθενείς) η ανίχνευση των DTCs σχετίσθηκε με αύξηση του κινδύνου θανάτου και εμφάνισης απομακρυσμένων μεταστάσεων κατά τη διάρκεια των 5 πρώτων ετών παρακολούθησης.[110]

Επιπλέον, όπως τεκμηριώθηκε από πολλές μελέτες η ανίχνευση των DTCs στο μυελό των οστών μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής θεραπείας έχει αρνητική προγνωστική αξία.[115, 116] Οι Hartkopf και συν. έδειξαν ότι η εμμένουσα παρουσία των DTCs μετά τη συμπλήρωση της συστηματικής θεραπείας (εισαγωγικής ή επικουρικής χημειοθεραπείας ή/και ορμονοθεραπείας) είναι ισχυρός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μειωμένης DFS και OS.[117] Με βάση τα δεδομένα αυτά, η παρουσία μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων στο μυελό των οστών σε ασθενείς με πρώϊμο καρκίνο μαστού αποτελεί υποκατάστατο δείκτη (surrogate marker) παρουσίας ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου.

Αν και η αιματογενής διασπορά κυττάρων του όγκου δείχνει γενικευμένη νόσο,

μόνο το 40-60% των ασθενών με DTCs στο μυελό των οστών θα παρουσιάσουν υποτροπή της νόσου.[110, 113] Σύμφωνα με την υπόθεση της μεταστατικής αναποτελεσματικότητας (metastatic inefficiency) μόνο ένα κλάσμα καρκινικών κυττάρων είναι ικανά να επιβιώσουν σε δευτεροπαθείς θέσεις και να προκαλέσουν ανάπτυξη μεταστάσεων.[118, 119] Οι παράγοντες που καθορίζουν αν μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα θα σχηματίσουν μικρο- ή μακρο-μετάσταση σε απομακρυσμένες θέσεις δεν έχουν αποσαφηνισθεί, πιθανώς όμως να εμπλέκονται συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Προς αυτή τη κατεύθυνση διεξάγονται μελέτες που στοχεύουν στον επιπλέον χαρακτηρισμό αυτών των κυττάρων.

16. Προγνωστική σημασία των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) στον πρώιμο καρκίνο του μαστού

Δημοσιευμένες μελέτες που εξετάζουν τη προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των CTCs έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα και αυτό οφείλεται κυρίως στις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης και στη ποικιλία των κατώτερων τιμών, για τα θετικά δείγματα, που έχουν χρησιμοποιηθεί.[120-132]

Πολλές μελέτες που αναφέρονται στη προγνωστική σημασία των CTCs στον πρώιμο καρκίνο του μαστού χρησιμοποίησαν το σύστημα CellSearch ή την RT-PCR για την ανίχνευσή τους.[120-130]

Οι Benoy και συν. συνέκριναν τη προγνωστική αξία των DTCs και CTCs στον πρώιμο καρκίνο του μαστού με τη μέθοδο RT-PCR και κατέληξαν ότι μόνο η παρουσία των DTCs ήταν σημαντικός προγνωστικός παράγοντας.[126] Αντίθετα, οι Franken και συν. χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CellSearch έδειξαν ότι ≥ 1 CTC/30 ml αίματος ανιχνεύονται σε ποσοστό 19% των ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού (σταδίου I-III) πριν τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου και στη πολυπαραγοντική ανάλυση η παρουσία ≥ 1 CTC συσχετίστηκε αρνητικά με το διάστημα επιβίωσης ελεύθερο απομακρυσμένης υποτροπής,

αλλά όχι με τη συνολική επιβίωση. Επίσης ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας θανάτου από καρκίνο του μαστού.[120]

Οι Stathopoulou και συν. δημοσίευσαν δεδομένα σχετικά με τη προγνωστική σημασία της ανίχνευσης CTCs στο αίμα γυναικών με πρώιμο καρκίνο του μαστού πριν από τη χορήγηση επικουρικής θεραπείας. Σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού (σταδίου I και II) ανιχνεύθηκε το CK19mRNA στο αίμα και στο μυελό των οστών με τη μέθοδο της nested RT-PCR. Το ποσοστό των ασθενών με CK19mRNA-θετικών κυττάρων στο μυελό των οστών και στο αίμα ήταν 63% και 30% αντίστοιχα. Επίσης, οι CTC-θετικές ασθενείς είχαν μικρότερη DFS (p=0.0007) και OS (p=0.01) σε σύγκριση με τις CTC-αρνητικές. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η ανίχνευση CTCs ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου.[130]

Αργότερα οι ίδιοι ερευνητές ανέπτυξαν μια realtime RT-PCR για τη ποσοτικοποίηση των CK19mRNA μεταγράφων.[133] Οι Xenidis και συν. χρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο για να ανιχνεύσουν CK19mRNA-θετικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα 167 ασθενών με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Σε ποσοστό 21.6% ανιχνεύτηκαν CK19mRNA-θετικά κύτταρα πριν από τη χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας. Η παρουσία των κυττάρων αυτών ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας μειωμένης DFS και OS.[125]

Οι Ignatiadis και συν. χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο για την ανίχνευση CTCs σε μια μεγαλύτερη σειρά 444 γυναικών με καρκίνο μαστού σταδίου I-III πριν τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, ανίχνευσαν CK19mRNA-θετικά κύτταρα σε ποσοστό 40.8% των γυναικών και επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα σχετικά με το βραχύτερο DFS και OS (p<0.001). Επιπλέον, η παρουσία CK19mRNA-θετικών κυττάρων αποτελούσε δυσμενή προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με ER-αρνητικό αλλά όχι σε αυτές με ER-θετικό πρώιμο καρκίνο μαστού, παρά το ανάλογο ποσοστό ασθενών με CK19mRNA-

θετικά κύτταρα στις δύο υποομάδες. Στον τριπλά αρνητικό και HER-2 θετικό καρκίνο μαστού, η παρουσία CK19mRNA-θετικών κυττάρων συσχετίστηκε με ελαττωμένες DFS και OS, αλλά αυτό δεν ίσχυε για την ER- θετική/HER2-αρνητική υποομάδα ασθενών.[134]

Η ίδια ομάδα ερευνητών μελέτησε τη προγνωστική αξία των CK-19 mRNA-θετικών κυττάρων πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής χημειοθεραπείας, σε 437 γυναίκες με πρώιμο καρκίνο μαστού. Ποσοστό 41% (179 ασθενείς), ήταν αρχικά CTC-θετικές και οι μισές ασθενείς (51%) αρνητικοποίησαν τα CTCs μετά τη θεραπεία. Ενδιαφέρον είναι ότι, ποσοστό 22% των ασθενών με αρχικά μη ανιχνεύσιμα CTCs παρουσίασαν στη πορεία CTCs παρά τη χορήγηση της θεραπείας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι συχνά τα CTCs είναι ανθεκτικά στη καθιερωμένη επικουρική χημειοθεραπεία. Σημαντικά βραχύτερες DFS και OS αναφέρθηκαν για τις CTC-θετικές ασθενείς μετά τη χημειοθεραπεία, ενώ η ανίχνευση CK19mRNA θετικών κυττάρων πριν και μετά τη θεραπεία σχετίσθηκε με χειρότερη κλινική έκβαση και ήταν ανεξάρτητος δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για DFS και OS στη πολυπαραγοντική ανάλυση. Επίσης, η ανίχνευση CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας αποτελούσε ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, ενδεικτικό της ύπαρξης χημειο-ανθεκτικής υπολειπόμενης νόσου.[135]

Πρόσφατα, οι Xenidis και συν. δημοσίευσαν δεδομένα για τη διαφορετική επίδραση στα CTCs ανάλογα με το είδος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Σε 545 ασθενείς ανιχνεύτηκαν τα CTCs πριν και μετά τη χορήγηση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Οι γυναίκες διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες με κριτήριο, αν το χημειοθεραπευτικό σχήμα περιείχε ή όχι ταξάνες. Η χημειοθεραπεία με ταξάνη είχε σαν αποτέλεσμα την εκρίζωση των CTCs στο αίμα, σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών συγκριτικά με τις ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία χωρίς ταξάνη. Σημαντικά βραχύτερο DFS και αυξημένη πιθανότητα θανάτου αναφέρθηκε για τις ασθενείς που έλαβαν θεραπεία χωρίς

ταξάνες, αλλά οι διαφορές αυτές αφορούσαν μόνο την ομάδα των ασθενών με ανιχνεύσιμα CTCs πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας. Τα παραπάνω αποτελούν μια πρώτη ένδειξη ότι η ανίχνευση ή μη CTCs θα μπορούσε να καθοδηγήσει την απόφαση ως προς το είδος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας.[136]

Οι Lucci και συν.[137] δημοσίευσαν δεδομένα σε ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου I-III που δεν είχαν λάβει χημειοθεραπεία. Ο ανίχνευση ≥1 CTC/7.5 ml περιφερικού αίματος ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για πρώιμη υποτροπή της νόσου και ελάττωση της συνολικής επιβίωσης.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών επιβεβαιώνονται σε μία μεγάλη Γερμανική μελέτη τη SUCCESS, στην οποία προοπτικά αξιολογήθηκε η κλινική σημασία των CTCs σε 2026 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο στα πλαίσια της επικουρικής θεραπείας. Χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία CellSearch το 21.5 % των ασθενών, παρουσίαζαν ≥ 1 CTC/23 ml αίματος κατά την αρχική διάγνωση. Η ανίχνευση των CTCs πριν την έναρξη χημειοθεραπείας με βάση την ταξάνη ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης χωρίς υποτροπή της νόσου (DFS: HR 1.88) και της συνολικής επιβίωσης (OS: HR 1.91). Οι γυναίκες στις οποίες ανιχνεύθηκαν ≥5 CTCs/23 ml μετά τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου και πριν από τη χορήγηση χημειοθεραπείας, εμφάνισαν 4-πλάσιο κίνδυνο υποτροπής και 3-πλάσιο κίνδυνο θανάτου συγκριτικά με τις γυναίκες στις οποίες δεν ανιχνεύθηκαν CTCs.[131] Ομοίως, η παρουσία ≥1CTC/23 ml μετά τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με μειωμένο DFS, ενώ η παρουσία ≥ 5 CTCs/23 ml συσχετίστηκε με μειωμένη συνολική επιβίωση.[132]

Από τη μελέτη των Xenidis και συν. προκύπτουν ανάλογα αποτελέσματα σχετικά με την προγνωστική αξία των CTCs κατά τη διάρκεια χορήγησης επικουρικής ορμονοθεραπείας. Η ανίχνευση των CK19mRNA-θετικών κυττάρων κατά τη διάρκεια χορήγησης ταμοξιφαίνης σε 119 γυναίκες με πρώιμο καρκίνο μαστού συσχετίστηκε με

αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Επίσης η εμμένουσα ανίχνευση τους συσχετίστηκε με μικρότερες DFS (p=0.0001) και OS (p=0.0005). Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η ανίχνευση των CTCs κατά τη διάρκεια της χορήγησης της ταμοξιφαίνης αύξησε τον κίνδυνο υποτροπής (HR=22.318 p=0.0006) και θανάτου (HR=13.95 p<0.00001).[138]

Τέλος η μετα-ανάλυση των Zahng I και συν. που αφορούσε συνολικά 6.825 ασθενείς με πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού επιβεβαίωσε ότι η ανίχνευση των CTCs είχε σημαντική προγνωστική αξία τόσο στον πρώιμο (DFS: HR 2.86; 95% CI 2.19-3.75; OS: HR 2.78; 95% CI 2.22-3.48) όσο και στο μεταστατικό καρκίνο μαστού (PFS: HR 1.78; 95% CI 1.52-2.09; OS: HR 2.33; 95% CI 2.09-2.60)

Σε αθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού που λαμβάνουν προεγχειρητική χημειοθεραπεία η παρακολύθηση της ανταπόκρισης του πρωτοπαθούς όγκου επιτρέπει να αξιολογηθεί η επιτυχία της συστηματικής θεραπείας. Ωστόσο, ασθενείς που παρουσίασαν πλήρη παθολογοανατομική ύφεση, πιθανώς να εμφανίσουν αργότερα υποτροπή της νόσου τους και αυτό σημαίνει ότι η ανταπόκριση του πρωτοπαθούς όγκου, μπορεί να είναι ανεξάρτητη από τη συστηματική ανταπόκριση. Κατά συνέπεια, η παρακολούθηση της MRD, όπως αυτή ορίζεται με την ανίχνευση των CTC/DTC κατά τη διάρκεια της εισαγωγικής θεραπείας, προσφέρει τη δυνατότητα να αποκτηθεί γνώση σχετικά με την επίδραση της συστηματικής θεραπείας στη διασπορά των καρκινικών κυττάρων και ίσως έτσι βελτιστοποιηθεί η θεραπευτική στρατηγική.

Είναι ενδιαφέρον ότι, οι περισσότερες από τις μελέτες καταδεικνύουν ότι η παρουσία των CTC / DTC μετά την ολοκλήρωση της προεγχειρητικής θεραπείας είναι ανεξάρτητη από την ανταπόκριση του πρωτοπαθούς όγκου στη θεραπεία και δεν συσχετίζεται με οποιαδήποτε κλινικό ή ιστολογικό χαρακτηριστικό του όγκου.[115, 124, 139-141] Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα από τις γερμανικές μελέτες GeparQuattro και GeparQuinto. Το ποσοστό των CTCs μειωνόταν κατά τη διάρκεια της προεγχειρητικής

χημειοθεραπείας σε γυναίκες με καρκίνο μαστού αρχικού σταδίου αλλά, η μείωση αυτή, δεν σχετίστηκε με την ανταπόκριση στον πρωτοπαθή όγκο. [142, 143]

Οι Saloustros και συν.[87] μελέτησαν τη σημασία της ανίχνευσης των CTCs σε γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού, που δεν είχαν υποτροπιάσει δύο χρόνια μετά μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής χημειοθεραπείας. Με τη μέθοδο της RT-PCR, 312 ασθενείς ελέγχθηκαν για τη παρουσία CTCs 3 μήνες μετά τη επικουρική χημειοθεραπεία και κάθε 6 μήνες μέχρι τη συμπλήρωση 5 ετών. Ενενήντα εννέα ασθενείς (31,7%) παρέμειναν θετικές για CK-19mRNA κύτταρα κατά τη διάρκεια των 5 ετών. Αυτές οι ασθενείς είχαν υψηλότερο κίνδυνο όψιμης υποτροπής συγκριτικά με τις ασθενείς που παρέμειναν αρνητικές στο ίδιο χρονικό διάστημα ανεξάρτητα από την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων στον πρωτοπαθή όγκο (36.4% έναντι 11.2 % $p<0.001$). Επιπλέον, η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι οι γυναίκες με εμμένουσα θετικότητα των CTCs είχαν βραχύτερες DFS και OS.

Οι Mathiesen και συν.[139] αξιολόγησαν την ανίχνευση των CTCs / DTCs πριν και μετά τη προεγχειρητική θεραπεία και διαπίστωσαν επίσης ότι ο αριθμός των CTCs / DTCs θετικών ασθενών μειώθηκε. Επιπλέον, η ανίχνευση DTC μετά την εισαγωγική θεραπεία ήταν προγνωστικός παράγοντας της επιβίωσης, ενώ η παρουσία των CTCs δεν είχε καμία προγνωστική αξία. Η πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη BEVERLY-2, επίσης, δεν διαπίστωσε καμία προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των CTCs μετά την εισαγωγική θεραπεία.[144] Ίσως αυτά τα αποτελέσματα να οφείλονται σε μια διαφορετική ευαισθησία των μεθόδων ανίχνευσης CTCs σε σύγκριση με αυτές των DTCs. Αντίθετα, οι Bidard και συν. [122] έδειξαν ότι υπάρχει προγνωστική σημασία της παρουσίας έστω και 1 CTC/7.5ml αίματος προ της εισαγωγικής χημειοθεραπείας. Ανάλογα ααποτελέσματα προκύπτουν και από τη μελέτη REMAGUS 02 που αφορούσε 115 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού και έδειξε ότι η ανίχευση των CTCs πριν και μετά την εισαγωγική

χημειοθεραπεία αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για μειωμένη επιβίωση χωρίς μετάσταση.[124]

17. Προγνωστική αξία των CTCs στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού

Σε ποσοστό 40-80% των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ανιχνεύονται CTCs στο περιφερικό αίμα. Η μόνη εγκεκριμένη μέθοδος από τον FDA για την ανίχνευσή τους είναι αυτή του CellSearch και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Γενικά θεωρούνται θετικοί οι ασθενείς που έχουν ≥5 CTCs/7.5 ml περιφερικού αίματος.[145, 146]

Η προγνωστική σημασία των CTCs στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού έχει δειχθεί σε μεγάλο αριθμό κλινικών μελετών. Η πρώτη μελέτη προέρχεται από την ομάδα του Cristofanilli[145], στην οποία ο αριθμός των μικρομεταστατικών κυττάρων σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του CellSearch στο περιφερικό αίμα πριν την έναρξη και μετά από 3-4 εβδομάδες θεραπείας. Οι ασθενείς με ≥ 5 CTCs/7.5 ml περιφερικού αίματος είχαν χειρότερη έκβαση συγκριτικά με τις ασθενείς με αριθμό<5 CTCs/7.5 ml περιφερικού αίματος. Ο αριθμός των μικρομεταστατικών κυττάρων ήταν προγνωστικός παράγοντας της επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου και της συνολικής επιβίωσης. Έτσι ως κατώτατο όριο διάκρισης των ασθενών σε θετικούς και αρνητικούς ορίσθηκε η παρουσία 5 CTCs/7.5ml αίματος (θετικοί: ≥ 5 CTCs/7.5ml, αρνητικοί < 5 CTCs/7.5ml). Αυτό το όριο έγινε αποδεκτό από τις περισσότερες ερευνητικές ομάδες. Συγκεκριμένα, θετικοί ασθενείς με ≥ 5 CTCs/7.5ml αίματος είχαν μικρότερη διάμεση PFS (2.7 μήνες έναντι 7.0 μήνες, $p<0.001$) και μικρότερη OS (10.1 μήνες έναντι >18 μήνες, $p<0.001$) συγκριτικά με τους αρνητικούς ασθενείς (< 5 CTCs/7.5ml). Η διαφορά μεταξύ των ομάδων διατηρείτο και στη πρώτη επίσκεψη, 3 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας (PFS 2.1 μήνες έναντι 7.0 μήνες,

p<0.001 και OS 8.2 μήνες έναντι > 18 μήνες, p<0.001). Αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ το 50% περίπου των ασθενών είχε αυξημένα CTCs πριν τη θεραπεία, μόνο στο 30% αυτών παρέμειναν αυξημένα στη πρώτη επίσκεψη, άρα ένα ποσοστό 40% περίπου των αρχικά θετικών ασθενών ωφελήθηκε από τη θεραπεία.

Από τους ίδιους ερευνητές δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα μιάς υποομάδας 177 ασθενών από τους οποίους 83 έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατική νόσο[146]. Τα CTCs/7.5 ml αίματος υπολογίστηκαν πριν την έναρξη της θεραπείας και μετά ανά μήνα. Ποσοστό 52% των ασθενών (43 ασθενείς) είχαν ≥5 CTCs πριν τη θεραπεία. Το PFS ήταν 7.2 μήνες και η OS μεγαλύτερη από 18 μήνες. Οι ασθενείς με ≥5 CTCs πριν τη θεραπεία και στη πρώτη επίσκεψη μετά από 4 εβδομάδες είχαν χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με τις ασθενείς με < 5 CTCs/7.5ml, ειδικά για τις γυναίκες με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς που έλαβαν χημειοθεραπεία. Από αυτά τα δεδομένα προκύπτει ότι η μεταβολή των CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας αποτελεί υποκατάστατο (surrogate) δείκτη για τη δραστικότητα της θεραπείας και την πρόγνωση και θα μπορούσε να είναι προβλεπτικός παράγοντας ανταπόκρισης στη θεραπεία, ώστε να αναγνωρισθούν εγκαίρως οι ασθενείς που πιθανώς δε θα ωφεληθούν και με αυτό το κριτήριο, να αποφασιστεί άλλος θεραπευτικός χειρισμός.

Οι Hayes DF και συν.[147] μελέτησαν τον αριθμό των CTC στον ίδιο πληθυσμό ασθενών πριν την έναρξη της θεραπείας και στις 3–5,6–8, 9–15, και 15–20 εβδομάδες παρακολούθησης. Η ανίχνευση αυξημένου αριθμού CTCs σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της θεραπείας συσχετίσθηκε με χειρότερη πρόγνωση, ταχύτερη επιδείνωση της νόσου και μικρότερη επιβίωση. Η εκτίμηση του PFS και OS από τους Hayes και συν. έγινε σε 4 διαφορετικές ομάδες ασθενών: (ομάδα 1) <5 CTCs/7.5ml αίματος σε όλα τα δείγματα. (ομάδα 2) ≥ 5 CTCs/7.5ml αίματος στο αρχικό δείγμα πριν τη θεραπεία και < 5 CTCs/7.5ml αίματος στο τελευταίο. (ομάδα 3) < 5 CTCs/7.5ml αίματος

στο αρχικό που αυξήθηκαν σε ≥ 5 CTCs/7.5ml αίματος στο τελευταίο δείγμα και (ομάδα 4) ≥ 5 CTCs/7.5ml αίματος σε όλα τα δείγματα. Οι ασθενείς της ομάδας 4 είχαν τη χειρότερη πρόγνωση με τη μικρότερη διάμεση PFS και OS από οποιαδήποτε άλλη ομάδα. Η διάμεση PFS στις άλλες ομάδες δεν διέφερε σημαντικά. Η συνολική επιβίωση, ήταν χειρότερη στην ομάδα 4 συγκριτικά με τις υπόλοιπες. Οι ασθενείς της ομάδας 2 που μείωσαν τα CTCs < 5 στη διάρκεια της θεραπείας, είχαν παρόμοια OS με αυτή των ασθενών που ποτέ δεν είχαν αυξημένα CTCs. Τέλος, η OS των ασθενών που αύξησαν τα CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας ήταν χειρότερη από αυτούς με < 5 CTCs/7.5ml αίματος αλλά καλύτερη από την ομάδα 4 με συνεχώς ≥ 5 CTCs//7.5ml.

Οι Androulakis και συν.[148] ανίχνευσαν με τη μέθοδο RT-PCR, CK19-mRNA-θετικά κύτταρα σε ποσοστό 67% (σε 201 από 298 ασθενείς) των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν από τη χορήγηση θεραπείας πρώτης γραμμής. Η διάμεση PFS ήταν σημαντικά μειωμένη στις ασθενείς που ανιχνεύθηκαν CTCs (PFS 9.2 έναντι 11.9 μηνών, p=0.003) και η διάμεση συνολική επιβίωση ήταν αυξημένη στις CK-19 mRNA-αρνητικές ασθενείς (OS 27.9 έναντι 38.8 μήνες). Ο δυσμενής προγνωστικός ρόλος της ανίχνευσης CTCs αφορούσε όλες τις υποομάδες των ασθενών, τόσο σε σχέση με τη PFS όσο και με την OS, ανεξαρτήτως του κλινικοπαθολογοανατομικού κριτηρίου διαχωρισμού (εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, μοριακός υπότυπος, επίπεδο λειτουργικής ικανότητας και της θέσης της μετάστασης). Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η ανίχνευση των CTCs και η απουσία ER-υποδοχέων ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για τη μείωση των PFS και OS.

Ενδιαφέρον είναι, ότι η προγνωστική αξία των CTCs έχει μελετηθεί και σε μοριακούς υπότυπους του καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα με τον Giordano A και συν.[149] σε αναδρομική μελέτη με 517 μεταστατικούς ασθενείς, η ανίχνευση των CTCs αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για μειωμένη επιβίωση των ασθενών με όλους τους

μοριακούς υποτύπους εκτός από τις ασθενείς με HER2-θετικούς καρκίνους του μαστού που έλαβαν HER2-στοχευμένη θεραπεία. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε εκλεκτική δραστικότητα της HER2-στοχευμένης θεραπείας έναντι των CTCs. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται από τους Pierga JY και συν.[150] οι οποίοι σε μία προοπτική μελέτη έδειξαν μεγαλύτερη ελάττωση του αριθμού των CTC σε ασθενείς που έλαβαν στοχευμένη θεραπεία (trastuzumab ή bevacizumab) επιπλέον της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής.

Σε αντίθεση, μια μεγάλη προοπτική πολυκεντρική μελέτη έδειξε ισχυρή ανεξάρτητη προγνωστική αξία των CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ανεξάρτητα από το μοριακό υπότυπο. Σε αυτή τη μελέτη, 468 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού χωρίστηκαν σε 3 υποομάδες με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου. α) ορμονοθετικές /HER2 (-), β) HER2 (+) γ) ορμονικοί υποδοχείς (-) /HER2 (-). Η ανίχνευση των CTCs έγινε με CellSearch πριν την έναρξη θεραπείας οποιασδήποτε γραμμής για μεταστατική νόσο, και με βάση την κατώτατη τιμή των 5 CTCs/7.5ml αίματος διαχωρίστηκαν οι ασθενείς σε CTCs-θετικές και CTCs-αρνητικές. Στις ορμονοθετικές/HER-2(-) το διάμεσο PFS διάστημα για τις CTCs-αρνητικές έναντι των CTCs-θετικών ασθενών ήταν 8.6 ένατι 4.3 μήνες ($p< 0.001$), στις HER-2-θετικές 7.6 έναντι 6.6 μηνών ($p=0.47$) και στις ασθενείς με τριπλά αρνητικούς όγκους 5.83 έναντι 3.05 μήνες ($p< 0.001$). Σχετικά με την OS δεν διαπιστώθηκε συσχετισμός με το μοριακό υπότυπο, αλλά όλες οι CTCs-θετικές ασθενείς είχαν δυσμενή πρόγνωση, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι πιθανόν οι ασθενείς αυτές να χρειάζονται επιθετική θεραπεία, ανεξάρτητα από το μοριακό υπότυπο.[151]

Οι Cristofanilli και συν. επίσης δημοσίευσαν μια αναδρομική μελέτη με 151 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, και έδειξαν ότι η ανίχνευση ≥5 CTCs/7.5 ml υπερδιπλασιάζει τον κίνδυνο θανάτου και η δυσμενής προγνωστική αξία τους ήταν

ανεξάρτητη του φορτίου της νόσου, της γραμμής της θεραπείας και του μοριακού υπότυπου.[152] Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε άλλες μελέτες.[153, 154]

Η κλινική σημασία του μεγάλου αριθμού CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ανεξάρτητα από τη θέση ή από τον αριθμό των μεταστατικών θέσεων και τους μοριακούς υπότυπους, έχει τεκμηριωθεί σε μια μεγάλη αναδρομική μελέτη (PFS 12 έναντι 7 μηνών για τις ασθενείς με <5CTCs /7.5 ml και ≥5 CTCs/7.5 ml αντίστοιχα, p< 0.001). Οι ερευνητές μελέτησαν σε 235 ασθενείς την προβλεπτική αξία του αριθμού των CTCs σε σχέση με τη δραστικότητα διαφορετικών θεραπευτικών σχημάτων. Είναι ενδιαφέρον ότι ασθενείς με ≥5 CTCs/7.5 ml πριν τη θεραπεία είχαν μόλις οριακό όφελος από την ορμονοθεραπεία πρώτης γραμμής ανεξάρτητα από τη θετικότητα των ορμονικών υποδοχέων στον πρωτοπαθή όγκο ή στη μετάσταση. Ίσως λοιπόν οι φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων να είναι ένας από τους περιοριστικούς παράγοντες της δραστικότητας της ορμονοθεραπείας.[155]

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού αξιολογείται με βάση την κλινική εξέταση, τη μεταβολή των τιμών των καρκινικών δεικτών και τις απεικονιστικές τεχνικές. Αυτές οι μέθοδοι μπορεί να είναι ανεπαρκείς και απαιτούνται καινούργιοι υποκατάστατοι δείκτες (surrogate markers) για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Δεδομένου ότι η μεταβολή του αριθμού των CTCs φαίνεται να αντανακλά την ανταπόκριση στη θεραπεία από τον πρώτο μάλιστα κύκλο, θα μπορούσε να χρησιμεύσει σαν ένα νέο εργαλείο παρακολούθησης.

Οι Budd και συν.[156] σε μία προοπτική πολυκεντρική μελέτη έκαναν σύγκριση της προβλεπτικής αξίας των CTCs με τις κλασσικές απεικονιστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της δραστικότητας της θεραπείας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Οι ασθενείς που είχαν ανταπόκριση τεκμηριωμένη

απεικονιστικά και ≥5 CTCs/7.5 ml αίματος, είχαν μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με τις ασθενείς με ανταπόκριση στη θεραπεία αλλά <5 CTCs/7.5 ml αίματος (OS 15.3 έναντι 26.9 μήνες p=0.0389). Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμη σαφές, αν οι ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού, ωφελούνται από θεραπευτικές αποφάσεις που λαμβάνονται με βάση τη μεταβολή του αριθμού των CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

Η SWOG S0500 είναι μία μελέτη φάσης ΙΙΙ που διερεύνησε αν ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού και σταθερά αυξημένο αριθμό μικρομεταστατικών κυττάρων (≥5/7.5 ml) που ανιχνεύονται με τη μέθοδο CellSearch πριν και μετά από τρεις εβδομάδες χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής ωφελούνται από την αλλαγή χημειοθεραπείας ή αν πρέπει να αναμένεται η κλινική επιβεβαίωση προόδου της νόσου προκειμένου οι ασθενείς να αλλάξουν θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που δεν είχαν αυξημένο αριθμό CTCs πριν από την έναρξη της θεραπείας παρέμειναν στην αρχική θεραπεία έως την απεικονιστική εξέλιξη της νόσου τους (ομάδα Α). Ασθενείς με αρχικά αυξημένα επίπεδα CTCs που μειώθηκαν μετά από 21 ημέρες θεραπείας παρέμειναν επίσης στην αρχική θεραπεία (ομάδα Β). Οι ασθενείς με σταθερά αυξημένο αριθμό CTCs πριν και μετά από 21 ημέρες θεραπείας τυχαιοποιήθηκαν να συνεχίσουν την αρχική θεραπεία (ομάδα C1), ή να λάβουν μία εναλλακτική χημειοθεραπεία (ομάδα C2) Από τις 595 ασθενείς που αξιολογήθηκαν, 276 (46%) δεν είχαν αρχικά αυξημένα CTCs (ομάδα Α). Από αυτές με αρχικά αυξημένα CTCs, 31 (10%) δεν ελέγχθηκαν, 165 αποτέλεσαν την ομάδα Β, και 123 τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες C1 ή C2. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην διάμεση OS μεταξύ των ομάδων C1και C2 (10.7 και 12.5 μήνες, αντιστοίχως, P = 0.98). Η διάμεση OS για τις ομάδες Α, Β, και C (C1 και C2 μαζί) ήταν 35 μήνες, 23 μήνες και 13 μήνες, αντίστοιχα (p <.001). Αυτή η μελέτη επιβεβαίωσε τη προγνωστική σημασία των CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής. Για τις ασθενείς με εμμένοντα αυξημένο αριθμό

CTCs μετά από 21 ημέρες χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής, η άμεση αλλαγή χημειοθεραπείας δεν ήταν αποτελεσματική στη βελτίωση της επιβίωσης. Είναι εμφανές ότι για τον πληθυσμό αυτό, υπάρχει ανάγκη για πιο αποτελεσματική θεραπεία από τη κλασική χημειοθεραπεία.[157]

18. Προβλεπτική αξία των CTCs

Η δυνατότητα πρόβλεψης ανταπόκρισης στη θεραπεία είναι πιθανώs μια από τις πιο συναρπαστικές εφαρμογές της τεχνολογίας των CTCs. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία CTCs μετά από τη χορήγηση θεραπείας και πιθανώς αυτό να αντανακλά την αποτυχία της συστηματικής θεραπείας.[86, 158] Η ανίχνευση των CTCs κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας, προβλέπει πρόοδο νόσου και θα μπορούσε να αντικαταστήσει τις απεικονιστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Έτσι, οι Liu και συν. μελέτησαν την προβλεπτική αξία των CTCs σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο μαστού και μετρήσιμη νόσο με απεικονιστικές τεχνικές ενώ ελάμβαναν ορμονοθεραπεία ή χημειοθεραπεία,. Η μέτρηση των CTCs στο περιφερικό αίμα γινόταν πριν την έναρξη της θεραπεία και, στη συνέχεια, σε μεσοδιαστήματα 3-4 εβδομάδων. Η απεικονιστική εκτίμηση της νόσου γινόταν κάθε 9-12 εβδομάδες. Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CTCs και της ακτινολογικής επιδείνωσης της νόσου κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ακόμη και 7 έως 9 εβδομάδες πριν την αντίστοιχη απεικονιστική επιδείνωση.[159]

Αντίθετα, η ανίχνευση < 5 CTCs/7.5ml αίματος ή η μείωση του αριθμού των CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας αποτελεί δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία. Οι Xenidis και συν. έδειξαν ότι η ανίχνευση CK-19mRNA θετικών κυττάρων με τη μέθοδο RT-PCR αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τη παρουσία ανθεκτικής υπολειπόμενης νόσου, μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με πρώμο

καρκίνο μαστού.[135] Επίσης, από τη μελέτη REMAGUS02 προκύπτει ότι η ανίχνευση των CTCS μετά τη χορηγήση εισαγωγικής χημειοθεραπείας, αποτελούσε δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση χωρίς μεταστατική νόσο, αλλά δε συσχετίστηκε με τη παθολογοανατομική πλήρη ύφεση του πρωτοπαθούς όγκου.[122, 124] Ομοίως, η μελετη GEPARQuarto, στην οποία εντάχθηκαν 213 ασθενείς με καρκίνο μαστού αρχικού σταδίου, έδειξε ότι το ποσοστό των CTCs-θετικών ασθενών μειώθηκε από 22% σε 11% μετά τη χορήγηση εισαγωγικής χημειοθεραπείας αλλά επίσης δεν υπήρξε συσχετισμός με την ανταπόκριση του πρωτοπαθούς όγκου στη χημειοθεραπεία.[77] Πιθανώς η εμμένουσα παρουσία των CTCs να συσχετίζεται με το είδος της θεραπείας. Για παράδειγμα, η θεραπεία με συνδυασμό χημειοθεραπείας και bevacizumab, ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του αυξητικού παράγοντα VEGF-A του αγγειακού ενδοθηλίου, τροποποίησε τη προβλεπτική αξία της παρουσίας CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.[160]

Η πρώιμη διάγνωση προόδου νόσου με βάση τη κινητική των CTCs μπορεί να βοηθήσει στην άμεση αλλαγή της θεραπείας πριν την επιβεβαίωση της με τις απεικονιστικές εξετάσεις. Η πρώτη ένδειξη κλινικού οφέλους από την αλλαγή της θεραπείας με βάση τα CTCs προκύπτει από τη δημοσίευση ενός κλινικού περιστατικού με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Αρχικά η ασθενής έλαβε θεραπεία με trastuzumab που στοχεύει τον HER-2 υποδοχέα και κατόπιν χορηγήθηκε θεραπεία με lapatinib που είναι διπλός αναστολέας του HER-2 και EGFR. Η αλλαγή στη θεραπεία είχε σαν αποτέλεσμα την εξάλλειψη των EGFR-θετικών κυττάρων και την ανταπόκριση της νόσου στη θεραπεία. Επιπλέον, η πρόοδος νόσου συσχετίσθηκε με την αύξηση των EGFR- και HER-2-αρνητικών CTCs, ένδειξη ότι η θεραπεία επάγει την επιλογή των 'target-negative' μεταστατικών κυττάρων.[161]

Μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη έχουν στόχο να απαντήσουν αυτό το σημαντικό

ερώτημα δηλαδή αν η εξατομίκευση θεραπευτικών αποφάσεων μπορεί να γίνει με βάση τα CTCs (για παράδειμα η γερμανική μελέτη GEPARQuarto που αφορά μεταστατικές ασθενείς καθώς και η μελέτη SUCCESS σε μη-μεταστατικό καρκίνο μαστού). Μέχρι τώρα η μελέτη SWOG S0500 που προαναφέρθηκε δεν κατάφερε να αποδείξει ότι η άμεση αλλαγή της χημειθεραπείας με βάση τον αριθμό των CTCs μπορεί να επηρεάσει την έκβαση των ασθενών.

19. CTCs ή DTCs

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες είναι σαφές ότι η ανίχνευση των CTCs αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο προγνωστικό παράγοντα. Βέβαια δεν είναι σαφές αν παρέχουν την ίδια κλινική πληροφορία που δίδεται από τα DTCs. Μικρός αριθμός μελετών έχει συγκρίνει δεδομένα αναλύσων των CTCs και DTCs στους ίδιους ασθενείς. Τα ποσοστά ανίχνευσης των CTCs είναι μικρότερα συγκριτικά με αυτά των DTCs αλλά αυτό εξαρτάται και από τη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τους.[162] Τα ποσοστά ανίχνευσης των CTCs είναι μεγαλύτερα στις περιπτώσεις που ανιχνεύονται και DTCs στο μυελό των οστών[86, 106] καθώς και σε ασθενείς υψηλού κινδύνου.[158] Ταυτόχρονη ανίχνευση CTCs και DTCs έχει γίνει σε κάποιες μελέτες και τα επίπεδα συμφωνίας κυμαίνονται μεταξύ 55% και 94%.[86, 106, 123, 158, 161, 163, 164] Ενδιαφέρον είναι ότι μεγαλύτερο ποσοστό ασυμφωνίας στην ανίχνευση των CTCs και DTCs παρατηρείται κυρίως μετά, παρά πριν τη χορήγηση της επικουρικής θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου I και II[123] γεγονός που, πιθανώς, αποδεικνύει διαφορετική ευαισθησία στη χημειοθεραπεία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα DTCs εκφράζουν σαν απόκριση στο stress πρωτείνες που τα βοηθούν να επιβιώσουν από τη χημειοθεραπεία.[163] Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη κλινική σημασία των CTCs έναντι των DTCs. Έτσι κάποιες μελέτες έδειξαν ότι η ανίχνευση των DTCs αποτελεί ισχυρότερο

προγνωστικό παράγοντα στο μεταστατικό και στον πρώιμο καρκίνο του μαστού συγκριτικά με την ανίχνευση των CTCs.[126, 162] Αντίθετα, άλλες μελέτες δείχνουν ότι η ανίχνευση των CTCs και όχι των DTCs σχετίζεται με την πρόγνωση στο μεταστικό καρκίνο μαστού.[165] Οι Pierga και συν. έδειξαν ότι η ανίχνευση των CTCs και των DTCs αποτελούν προγνωστικό παράγοντα για τη συνολική επιβίωση στον πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού αλλά το DFS συσχετίσθηκε μόνο με την ανίχνευση των DTCs.[166] Η ταυτόχρονη ανίχνευση των CTCs και DTCs σε αρχικό στάδιο καρκίνου μαστού σχετίζεται με εξαιρετικά πτωχή πρόγνωση και αυξημένη επίπτωση θανάτων οι οποίοι οφείλονται στον καρκίνο.[123, 162]

Αξιοσημείωτο είναι ότι ο αριθμός των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων ποικίλει όχι μόνο μεταξύ του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος, αλλά μάλλον εξαρτάται επίσης από το αγγειακό διαμέρισμα από το οποίο συλλέγεται το αίμα. Σημαντικά υψηλότερος αριθμός CTCs μετρήθηκε σε δείγμα αίματος από κεντρική φλέβα σε σύγκριση με δείγμα από περιφερική φλέβα.[167]

20. Erb υποδοχείς και καρκίνος του μαστού

Η οικογένεια των Erb υποδοχέων αποτελείται από 4 δομικά όμοιες πρωτεΐνες τυροσινικών κινασών (Erb-1, Erb-2, Erb-3, Erb-4) που αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα όπου γίνεται η σύνδεση του προσδέτη (ligand) τους, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) υπάρχει σαν ανενεργό μονομερές, το οποίο ομο- ή ετερο-διμερίζεται, με άλλα μέλη της οικογένειας των Erb υποδοχέων, μετά τη σύνδεση του προσδέτη (ligand) του.[168] Ο EGFR (Erb-1) εκφράζεται ή υπερεκφράζεται σε ποικιλλία συμπαγών όγκων όπως στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο κεφαλής τραχήλου, μαστού, ουροδόχου κύστης και ωοθηκών

επομένως θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο. Οι δύο τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται σήμερα αναστολή του EGFR στη κλινική πράξη, είναι μέσω μικρών μορίων που αναστέλλουν την τυροσινική κινάση του υποδοχέα και μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ο EGFR ενεργοποιείται από ποικιλία προσδετών όπως ο EGF, ο TGF-a, η betacellulin, η epiregulin και η amphiregullin.[169] Η σύνδεση αυτών των προσδετών στον EGFR έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του, μέσω αυτοφωσφορυλίωσης της τυροσινικής κινάσης με συνέπεια την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος και την ενεργοποίηση πολύπλοκων μονοπατιών (MAPK, PI3K,/Akt) που παρεμβαίνουν στη σύνθεση του DNA, στην κυτταρική ανάπτυξη, στην αγγειογένεση, στο μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων και την ευαισθησία των κυττάρων στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία.[170] Ο EGFR εκφράζεται σε ποσοστό 18%-25% στον καρκίνο του μαστού και μάλιστα η έκφραση του συσχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου από τον καρκίνο του μαστού. Σημαντική αύξηση στην έκφραση του EGFR έχει διαπιστωθεί σε ER-θετικούς καρκίνους μαστού με de novo αντίσταση στην ορμονοθεραπεία ενώ μέτρια αύξηση της έκφρασης του ή της έκφρασης των προσδετών του συσχετίζεται με επίκτητη αντοχή στην ορμονοθεραπεία σε ER- θετικούς όγκους.[171] Ομοίως, οι Morris C και συν. έδειξαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του EGFR στον καρκίνο του μαστού και ιδιαίτερα ο ορμονοανθεκτικός καρκίνος του μαστού συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση τόσο του EGFR όσο και των προσδετών του.[172] Επιπλέον, υπερέκφραση του EGFR διαπιστώνεται σχεδόν στις μισές περιπτώσεις τριπλά αρνητικού και φλεγμονώδους καρκίνου μαστού και η αυξημένη έκφραση του αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα πτωχής πρόγνωσης.[173-175]

Τέλος η έκφραση του EGFR έχει επίσης τεκμηριωθεί στα κυκλοφορούντα μικρομεταστατικά κύτταρα με RT-PCR.[108, 109]

Το ZD1839 (gefitinib) είναι μία μη κυτταροτοξική ανθρακινολόνη, η οποία

εκλεκτικά αναστέλλει τη τυροσινική κινάση του EGFR. Έχει έγκριση για ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος ως πρώτης γραμμής θεραπεία σε ασθενείς των οποίων οι όγκοι, εκφράζουν μεταλλάξεις του EGFR. Στη φάσης III μελέτη IPASS, έγινε σύκριση του gefitinib με τη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα σε ασθενείς με μεταστατικό μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Οι ασθενείς που είχαν μεταλάξεις του EGFR και έλαβαν gefitinib είχαν σημαντική βελτίωση στην PFS.[176] Επίσης, δύο μελέτες φάσης III που συμπεριέλαβαν αποκλειστικά ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR έδειξαν όμοια αποτελέσματα.[177, 178] Οι συχνότερες παρενέργειες που αναφέρονται από τη χορήγηση του gefitinib είναι το ακμοειδές εξάνθημα και οι διάρροιες

Προκλινικά in vitro δεδομένα έχουν δείξει ότι το gefitinib μπορεί να έχει αντινεοπλασματική δράση σε ορμονο- και χημειο-ανθεκτικό καρκίνο μαστού.[171, 179-181] Το gefitinib έχει δείξει αντινεοπλασματική δράση in vitro, είτε σαν μονοθεραπεία είτε και σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η πακλιταξέλη και η δοξορουβικίνη, αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών σειρών μαστού που ήταν ανθεκτικές στην ορμονοθεραπεία όπως η ταμοξιφαίνη.[182] Επίσης, όταν το gefitinib χορηγήθηκε σε συνδυασμό με ορμονοθεραπεία, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού που ήταν ευαίσθητες στην ορμονοθεραπεία, διαπιστώθηκε συνέργεια. Επιπλέον, το gefitinib έδειξε αναστολή του όγκου μαστού σε xenografts, καταδεικνύοντας ότι η αναστολή του EGFR μπορεί να έχει κάποια σημασία στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού αρχικού σταδίου.[183] Τέλος, το gefitinib αναστέλλει σε μελέτες in vitro και σε πειραματόζωα τη μετάδοση σήματος μέσω του HER-2 υποδοχέα, και αναστέλλει την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών καρκίνου μαστού που υπερεκφράζουν τον HER-2.[184-186]

Προηγούμενες μελέτες φάσης II έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη δραστικότητα του gefitinib σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Μια μελέτη

φάσης ΙΙ σε ασθενείς με ορμονοανθεκτικό καρκίνο μαστού έκλεισε πρώιμα λόγω του ότι δεν τεκμηριώθηκε κλινικό όφελος.[187] Αντίθετα, σε μια μικρή τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης ΙΙ ο συνδυασμός gefitinib με αναστραζόλη έδειξε όφελος στο PFS όταν συγκρίθηκε με το gefitinb σε συνδυασμό με εικονικό φάραμακο σε μετεμηνοπαυσιακές γυναίκες με ορμονοθετικό μεταστατικό καρκίνο του μαστού.[188] Επιπλέον, σε μία πρόσφατη μελέτη η προσθήκη του gefitinib στο συνδυασμό αναστραζόλης και φουλβεστράνης, που χορηγήθηκε ως προεγχειρητική θεραπεία σε ασθενείς με ER-θετικούς όγκους είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως εκφράστηκε με τη μείωση της έκφρασης του Ki-67 και της κυκλίνης D1, συγκριτικά με τις ασθενείς που έλαβαν μόνο το συνδυασμό αναστραζόλης/φουλβεστράνης.[189] Έτσι, ο EGFR ίσως να αποτελεί ένα στόχο ανάπτυξης νεότερων θεραπειών και τα πολλά υποσχόμενα αυτά δεδομένα, δείχνουν ότι η στόχευση του EGFR πιθανώς να παίζει ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

Άλλο μέλος της οικογένειας των Erb υποδοχέων είναι το HER-2 (Erb-2) που εκφράζεται στο 20-30% των όγκων του μαστού και σχετίζεται με επιθετική συμπεριφορά και πτωχή πρόγνωση.[190] Δεν υπάρχει γνωστός προσδέτης για τον Erb2 υποδοχέα που να προκαλεί την ενεργοποίηση του. Ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται η ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος είναι μέσω ετεροδιμερισμού του με άλλα μέλη της οικογένειας των Erb υποδοχέων (EGFR, HER-3, HER-4). Ο HER-2 υποδοχέας κυρίως ετεροδιμερίζεται με τον EGFR. Το trastuzumab είναι ένα εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με το εξωμεμβρανικό τμήμα του HER-2 υποδοχέα. Η χορήγηση του σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες σε ασθενείς με καρκίνο μαστού αρχικού σταδίου ως επικουρική χημειοθεραπεία,[191] είτε ως θεραπεία στη μεταστατική νόσο[192] βελτίωσε την επιβίωση των ασθενών, που οι όγκοι τους υπερεκφράζουν τον HER2 υποδοχέα. Ο HER-2 υποδοχέας, έχει συσχετιστεί με αυξημένο

κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφορετική ανταπόκριση ανάλογα με τους διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται ως επικουρική θεραπεία στον καρκίνο του μαστού.[190, 193]

Τόσο ο EGFR όσο και ο Erb2 υποδοχέας παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική συμπεριφορά των νεοπλασματικών κυττάρων με αποτέλεσμα την ευόδωση της ανάπτυξης της μετάστασης, της επιβίωσης και της αγγειογένεσης. Εκλεκτική αναστολή αυτών των υποδοχέων θα μπορούσε να αναστείλει τη μετάδοση σήματος εντός του κυττάρου με αποτέλεσμα αναστολή της ανάπτυξής του και του μεταστατικού δυναμικού του.

Το Lapatinib είναι διπλός αναστολέας των τυροσινικών κινασών των EGFR και ErbB2 αναστέλλοντας τη μετάδοση σήματος μέσω των μονοπατιών των PI3K/Akt και MAP κινασών. Δρα στη θέση σύνδεσης του ATP των EGFR/ErbB2 αναστέλλοντας την αυτοφωσφορυλίωση και συνεπώς τη μετάδοση σήματος.[194] Η ικανότητα του Lapatinib στην αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών σειρών που υπερεκφράζουν τον EGFR βρέθηκε να είναι ισοδύναμη συγκριτικά με άλλους αναστολείς του EGFR που έχουν χορηγηθεί σε κλινικές μελέτες όπως το gefitinib (iressa) ή το erlotinib (tarceva). Με την εξαίρεση του ErbB4, το Lapatinib προκαλούσε >300 φορές πιο εκλεκτική αναστολή των τυροσινικών κινασών των EGFR και ErbB2 από άλλες κινάσες που χρησιμοποιήθηκαν. Το Lapatinib προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης ανθρώπινου πορογενούς καρκινώματος μαστού (BT 474) και όγκου κεφαλής τραχήλου (HN5) σε xenografts σε επίμυες. Μία δοσοεξαρτώμενη αναστολή παρατηρήθηκε και στα δύο πειραματικά μοντέλα που έλαβαν Lapatinib (30 ή 100 mg/kg δύο φορές την ημέρα για 21 ημέρες).[195] Το Lapatinib έχει δειχθεί ότι αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των Erk 1 / 2 και της Akt (pErk, pAkt) σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν EGFR και ErbB2 (BT474 και HN5). Η δυνατότητα του Lapatinib να αναστέλλει την pAkt συσχετίστηκε με αύξηση κατά 23 φορές στο ποσοστό των κυττάρων που οδηγήθηκαν σε απόπτωση συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ομοίως, η θεραπεία με

Lapatinib των BT474 και HN5 σε επίμυες επίσης είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης των Erk1/2 και Akt. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η θεραπεία των κυττάρων που εκφράζουν EGFR/ErbB2 με Lapatinib μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή μετάδοσης σήματος του αντίστοιχου μονοπατιού.[196]

Σε μία μελέτη καρκινικών σειρών μαστού που εξέφραζαν EGFR ή ErbB2 (SUM102, SUM149, SUM185, SUM225) έχει δειχθεί ότι η θεραπεία με Lapatinib ανέστειλε τον κυτταρικό πολ/σμό που συσχετιζόταν με την αναστολή της φωσφορυλίωσης της Erk 1/2. Επίσης, η αναστολή της φωσφορυλίωσης της Erk1/2 συσχετίστηκε με την ευαισθησία στην ακτινοθεραπεία, προθεραπευμένων με Lapatinib κυτταρικών σειρών.[197]

Το Lapatinib έχει έγκριση χορήγησης σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, των οποίων οι όγκοι εκφράζουν τον HER2 υποδοχέα, και είναι ανθεκτικοί στη θεραπεία με trastuzumab. Εχει χορηγηθεί ως μονοθεραπεία σε ασθενείς που έχουν λάβει πολλαπλές γραμμές θεραπείας, με ποσοστά ανταποκρίσεων που κυμαίνονται από 14-22%.[198] Ανάλογα αποτελέσματα έχουν διαπιστωθεί με τη χορήγηση συνδυασμού του Lapatinib με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες δραστικούς στον καρκίνο του μαστού, όπως τη capecitabine. Σε αυτή τη μελέτη των Geyer και συν. έγινε σύγκριση της capecitabine χορηγούμενης ως μονοθεραπείας έναντι του συνδιασμού της με Lapatinib. Τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν πολυθεραπευμένες ασθενείς που είχαν αντοχή σε καθιερωμένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως οι ανθρακυκλίνες και οι ταξάνες. Η μελέτη έκλεισε πρόωρα γιατί στην ενδιάμεση ανάλυση έγινε σαφές ότι η προσθήκη του Lapatinib στη capecitabine οδήγησε σε 51% μείωση του κινδύνου προόδου νόσου (p=0.00016) και διπλασίασε το ελεύθερο προόδου νόσου διάστημα επιβίωσης (p=0.000045).[199] Οι κυριότερες παρενέργειες του Lapatinib είναι η διάρροια, το εξάνθημα, η ναυτία, η ανορεξία, οι έμετοι και η καταβολή, σπανιότερα δε αναφέρεται καρδιοτοξικότητα που

κυρίως συνίσταται σε ασυμπτωματική μείωση του κλάσματος εξωθήσεως και συνήθως αναστρέφεται με τη διακοπή της θεραπείας.[200, 201]

21. Στόχος της διατριβής

Όπως προαναφέρθηκε η παρουσία των CTCs έχει τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες και έχει συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση, στο χειρουργικά εξαιρέσιμο καρκίνο του μαστού τόσο πριν[125, 130, 134, 202, 203] όσο και μετά τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. [46-48, 135, 152,153,[145] Επίσης, η προγνωστική αξία των CTCs έχει καταδειχθεί και στη μεταστατική νόσο.[145]

Τα CTCs παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια[204] όπως έχει ήδη δειχθεί μέσω ανοσοφθορισμού,[205] συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ[206] και μοριακών μεθόδων, όπως RT-PCR,[67, 206] RT-qPCR[207] και liquid bead arrays.[208] Αυτή η ετερογένεια είναι σημαντική, ιδίως σε περιπτώσεις στις οποίες θεραπευτικοί στόχοι εκφράζονται σε CTCs αλλά όχι στον πρωτοπαθή όγκο. Ωστόσο, η σημασία της ετερογένειας των CTCs δεν έχει αξιοποιηθεί ακόμη στη κλινική πράξη.

Όπως προαναφέρθηκε υπάρχει συχνά ασυμφωνία της έκφρασης των EGFR και HER-2 μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς ο βιολογικός χαρακτηρισμός, των CTCs θα μπορούσε να επιτρέψει τη χορήγηση εξατομικευμένης και στοχευμένης θεραπείας ανάλογα με την έκφραση των συγκεκριμένων υποδοχέων στα CTCs. Το συχνό κλινικό πρόβλημα εμφάνισης αντοχής στη χημειοθεραπεία και η εξέλιξη της νόσου δείχνουν τη σημασία της αξιολόγησης των CTCs ως εν δυνάμει μη επεμβατικού εργαλείου για τη βελτίωση επιλογής εξατομικευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Με βάση τα προαναφερθέντα δεδομένα, τα CTCs θα μπρούσαν να χρησιμοποιηθούν ως "υγρή βιοψία”που δείχνει τα χαρακτηριστικά των κυττάρων που ευθύνονται για τη δημιουργία της μετάστασης τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή που

λαμβάνεται η θεραπευτική απόφαση. Έτσι, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και οι θεραπείες μοριακής στόχευσης ίσως αξίζει περισσότερο να μελετηθούν στα μικρομεταστατικά κύτταρα παρά στον πρωτοπαθή όγκο.

Προκειμένου να διερευνηθεί κλινικά η στόχευση των CTCs με μικρομοριακούς βιολογικούς παράγοντες που δρουν εκλεκτικά στους υποδοχείς EGFR και HER2 αποφασίσθηκε να μελετηθεί η έκφραση των EGFR και HER-2 υποδοχέων στα CTCs προθεραπευμένων ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, να εκτιμηθεί προοπτικά η δραστικότητα της στοχευμένης αυτής αγωγής στην εξαφάνιση των μικρομεταστατικών κυττάρων και να συσχετιστεί με την έκβαση των ασθενών.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να δείξει: α) τη συχνότητα έκφρασης των EGFR και HER-2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα του αίματος ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του μαστού, β) την αξιολόγηση της δραστικότητας της στοχεύουσας θεραπείας με αναστολείς τυροσινικών κινασών (gefitinib, lapatinib) σε ασθενείς με μικρομεταστατικά κύτταρα θετικά για EGFR ή Erb2 και γ) τη συσχέτιση με το διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου και τη συνολική επιβίωση.

Η σημασία της προτεινόμενης μελέτης είναι να ανιχνεύσει και, πιθανώς, να αναδείξει νέους προγνωστικούς και προβλεπτικούς δείκτες στον καρκίνο του μαστού με την εμπεριστατωμένη μελέτη του EGFR και HER2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα, οι οποίοι θα είχαν εξαιρετικό ενδιαφέρον τόσο από ερευνητικής όσο και από θεραπευτικής άποψης με προφανείς προεκτάσεις.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ασθενείς/κριτήρια ένταξης/θεραπεία

Στην παρούσα μελέτη συμπεριελήφθησαν ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που είχαν προηγουμένως λάβει χημειοθεραπεία ή/και ορμονοθεραπεία για μεταστατική νόσο. Ειδικότερα, προκειμένου να είναι κάποια ασθενής κατάλληλη για ένταξη στη μελέτη, θα έπρεπε να έχει επιτύχει ανταπόκριση ή σταθεροποίηση της νόσου μετά την πλέον πρόσφατη γραμμή χημειοθεραπείας ή ορμονοθεραπείας. Τα κριτήρια ένταξης περιελάμβαναν επιπλέον τα εξής: παρουσία μετρήσιμης ή εκτιμήσιμης νόσου, επίπεδο λειτουργικής ικανότητας (Performance Status, PS ECOG) 0-2 και ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με τη χρήση RT-PCR και με ανοσοφθορισμό σε επιχρίσματα πολυμορφοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος.

Μετά από την ένταξη των οχτώ πρώτων ασθενών που έγινε με κριτήριο την παρουσία CTCs και με τις δύο μεθόδους, έγινε τροποποίηση του πρωτοκόλλου, ώστε να εντάσσονται μόνο οι ασθενείς με έκφραση EGFR στα CTCs. Η τροποποίηση έγινε γιατί σύμφωνα με τα αποτελέσματα παράλληλης μελέτης της κλινικής μας, επιβεβαιώθηκε η έκφραση του EGFR και η ενεργοποίηση του downstream μονοπατιού του (PI3K/Akt). Επίσης οχτώ ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού και ανιχεύσιμα CK-19mRNA και CK-θετικά CTCs που πληρούσαν τα κριτήρια της μελέτης και δεν είχαν λάβει gefitinib επιλέχθηκαν αναδρομικά για να αποτελέσουν ομάδα σύγκρισης (historical control group). Σε αυτές τις ασθενείς γινόταν ανίχνευση των CTCs μηνιαίως (για τέσσερις μήνες) με RT-PCR και ανοσοφθορισμό.

Αρχικά, μελετήθηκε η χορήγηση του αναστολέα της τυροσινικής κινάσης του EGFR gefitinib σε ασθενείς που παρουσίαζαν EGFR θετικά κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας τους. Σε δεύτερη μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς με έκφραση HER-2 στα CTCs οι οποίες έλαβαν τον αναστολέα των τυροσινικών κινασών των EGFR/HER2 (lapatinib). Στη δεύτερη μελέτη με το lapatinib, η μόνη μέθοδος που

χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και την παρακολούθηση της κινητικής των CTCs ήταν ο ανοσοφθορισμός. Οι ασθενείς ελάμβαναν το gefitinib ή το lapatinib από του στόματος, τουλάχιστον δύο ώρες πριν ή μετά τη λήψη τροφής.

Πριν την ένταξη στη μελέτη ήταν απαραίτητη η έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών για συμμετοχή στη μελέτη, αφού είχαν ενημερωθεί από το γιατρό της μελέτης και αφού είχαν διαβάσει το σχετικό, εγκεκριμένο από την Επιστημονική Επιτροπή του ΠΑ.Γ.Ν.Η, έντυπο πληροφόρησης. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος και η παρακολούθηση των ασθενών έγινε στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑ.Γ.Ν.Η.

Πριν την ένταξη στη μελέτη αλλά και κάθε μήνα κατόπιν, γινόταν κλινική εξέταση και λήψη περιφερικού αίματος για γενική αίματος, βιοχημικό έλεγχο, μέτρηση καρκινικών δεικτών (CEA και Ca15-3) και για τη καταμέτρηση των CTCs και τη μελέτη των δεικτών που εξέφραζαν (EGFR και HER-2).

Εντός του τελευταίου μήνα πριν την ένταξη στη μελέτη και κάθε 2 μήνες στη συνέχεια, γινόταν απεικονιστικός έλεγχος με αξονικές τομογραφίες θώρακος και κοιλίας, μαγνητική τομογραφία ή όποια άλλη εξέταση κρινόταν απαραίτητη ανάλογα με τη συμτωματολογία της ασθενούς και τις θέσεις των δευτεροπαθών εντοπίσεων. Η εκτίμηση της ανταπόκρισης της θεραπείας γινόταν με τα κριτήρια RECIST.

Ο αριθμός των CTCs αξιολογούνταν πριν την έναρξη της θεραπείας και μετά ανά μήνα, πριν την έναρξη κάθε κύκλου με lapatinib ή gefitinib. Η παρακολούθηση της κινητικής των CTCs γινόταν με ανοσοφθορισμό. Οι ασθενείς που πριν την έναρξη του δεύτερου κύκλου είχαν ανταπόκριση με βάση τα CTCs (αριθμός CTCs μικρότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο πριν την έναρξη της θεραπείας), ή σταθεροποίηση του αριθμού των CTCs συνέχιζαν τη θεραπεία. Οι ασθενείς με αύξηση του αριθμού των CTCs έβγαιναν από τη μελέτη αν στον επόμενο κύκλο επιβεβαιωνόταν η αύξηση του αριθμού των CTCs.

Στους επόμενους κύκλους η θεραπεία επίσης διακοπτόταν σε περίπτωση δύο συνεχόμενων αυξήσεων του αριθμού των CTCs. Επιπλέον, η θεραπεία διακοπτόταν σε περίπτωση προόδου νόσου, εμφάνισης μη αποδεκτής τοξικότητας ή απόσυρση της ενυπόγραφης συγκατάθεσης ανεξάρτητα από από τον αριθμό των CTCs.

2. Μέθοδοι

.

2.1 Μοριακή ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα

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

Οι ασθενείς υποβάλλονταν σε αιμοληψία για ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) και έλεγχο της έκφρασης των EGFR και HER-2 υποδοχέων ώστε να λάβουν gefitinib ή lapatinib εάν πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη. Για την αποφυγή επιμόλυνσης με επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, το δείγμα του περιφερικού αίματος (20 ml σε EDTA) λαμβάνονταν στο μέσο της φλεβοκέντησης, αφού είχαν απορριφθεί τα πρώτα 5 ml αίματος.

Τα 20 ml περιφερικού αίματος τοποθετούνταν σε σωληνάριο που περιείχε EDTA και ακολούθως μεταφέρονταν σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 50 ml. Τα δείγματα αίματος, στη συνέχεια, αραιώνονταν με ίσο όγκο στείρου διαλύματος PBS (8,0 g/L NaCl, o,2g/L KCL, 1,15g/L Na2HPO4, 0,2g/L K2HPO4, pH 7,3) και το διάλυμα επιστοιβαζόταν σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου τύπου Falcon των 50 ml, όπου είχε ήδη προστεθεί Ficoll με πυκνότητα 1077g/ml (Ficoll-Histopaque 1077,Sigma) όγκου ίσου με το 1/2 του του όγκου του διαλύματος. Το αραιωμένο αίμα τοποθετούνταν με προσοχή πάνω στην επιφάνεια της Ficoll, ώστε να μην αναμιχθούν τα δύο υγρά και τελικά να σχηματιστούν δύο

στοιβάδες με αίμα και Ficoll. Ακολούθησε διαβαθμισμένη φυγοκέντριση του δείγματος (στα 1.800rpm, για 30 min, στους 4 ^{o}C). Μετά τη φυγοκέντριση, η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων βρίσκεται μεταξύ της στιβάδας της Ficoll και της στιβάδας ορού και PBS. Κατόπιν, έγινε συλλογή του δακτυλίου των μονοπύρηνων σε ξεχωριστό αποστειρωμένο σωληνάριο φυγόκεντρου, με προσοχή ώστε να αναρροφηθεί η ελάχιστη δυνατή ποσότητα Ficoll η οποία είναι κυτταροτοξική, τα μονοπύρηνα κύτταρα πλένονταν 2 φορές με PBS (50 mL, φυγοκέντριση στα 1.500rpm για 10 min, στους 18 ^{o}C). Τέλος, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα των κυττάρων είτε χρησιμοποιείτο αμέσως είτε φυλασσόταν στους -80 ^{o}C. Επιπλέον, 250.000 PBMCs σε διάλυμα PBS/2%FBS (500μl/πλακίδιο), υποβαλλόταν σε κυτταροφυγοκέντρηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα στα 2000 rpm για 2 λεπτά και οι αντικειμενοφόρες πλάκες στεγνώνονταν και φυλάσσονταν στους -80 ^{0}C για περεταίρω χρήση.

β. Απομόνωση ολικού RNA

Η μέθοδος που ακολουθείται για την απομόνωση του RNA αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi.[209] Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να απομονωθεί το ολικό RNA από 0.1 έως 15kb σε μήκος. Η εκχύλιση του RNA γίνεται χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol (Gibco, BRL). Η λύση των κυττάρων βασίζεται στη 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 φυγοκεντρήσεων, γίνεται σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής για εξασφάλιση συνθηκών ελεύθερων από επιμολύνσεις. Αρχικά, $1X10^{6}$ κύτταρα

αναμιγνύονται με 1mL 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 ^{o}C και, στη συνέχεια αφού προστεθούν 200μL χλωροφορμίου, το μίγμα αναδεύεται μηχανικά για 15 sec. Το διάλυμα αφού επωαστεί για 10 min στους 15-30 ^{o}C, φυγοκεντρείται για 10 min στα 12.000g, στους 4°C. Το διάλυμα κατά τη φυγοκέντριση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: α) στη κατώτερη ερυθρωπή, οργανική φάση στην οποία παραμένουν οι πρωτεΐνες και όλα τα κυτταρικά υπολείμματα, β) στη 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, προστίθεται ίση περίπου ποσότητα 100% ισοπροπανόλης (500μL) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά. Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 15 min και φυγοκέντριση για 10 min στα 12.000g, στους 4 ^{o}C, οπότε η ισοπροπυλική αλκοόλη προκαλεί κατακρήμνιση του RNA με τη μορφή ενός καθαρού πηκτώδους ιζήματος. Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση του ιζήματος με 1 mL 75% αιθανόλη σε δισαπεσταγμένο νερό (ddH_2O) επεξεργασμένο με αναστολέα νουκλεασών DEPC (διεθυλπυροκαρβονικό άλας 97%, Sigma). Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και φυγοκέντρισή του για 5 min στα 7.500g, στους 4 ^{o}C. Αν το ίζημα είναι έντονα λευκό, επαναλαμβάνεται η έκπλυση άλλη μια φορά. Τέλος, αφού χυθεί το υπερκείμενο υγρό και στεγνώσει τελείως το ίζημα από την αιθανόλη (είτε εκτιθέμενο στον αέρα, είτε σε κενό αέρα για 5-10 min), επαναδιαλύεται σε 20-30 μL DEPC-ddH_2O, σε σωληνάριο τύπου eppendorf και τοποθετείται για 10 min στους 55-65 ^{o}C (είτε σε υδατόλουτρο, είτε σε κλίβανο), ώστε να ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση του RNA. Από το τελικό υδατικό διάλυμα χρησιμοποιείται 1μL για ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA στη συσκευή nanodrop, ενώ το υπόλοιπο φυλάσσεται στους -80°C, σε 2 κλάσματα εάν είναι

>20μL, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

γ. Σύνθεση 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 τη σύνθεση του cDNA χρειάζεται ένα αρχικό τμήμα συμπληρωματικό της 5΄-3΄-poly-(A) περιοχής του mRNA. Συνήθως, για το ρόλο αυτό χρησιμοποιείται 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), που στη περίπτωση απλού πολυαδενυλικού RNA χρησιμοποιείται 1 μL Oligo $(dT)_{20}$ (50μM) και

γ) DEPC-H_2O 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 ^oC 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 10μL 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, 40U/μL)

δ) 1 μL DEPC-H_2O

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 ^{o}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 ^{o}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 ^{o}C. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), είτε φυλάσσεται στους -20 ^{o}C.

δ. Έλεγχος της ποιότητας των RNA δειγμάτων της RT-PCR

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

ε. Ανίχνευση του CK19mRNA με nested RT-PCR

Για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής MJ Research PTC200. Η μονάδα αυτή διαθέτει υποδοχές για σωληνάρια PCR των 0.5 mL αλλά και των 0.2 mL. Μπορεί να υποβάλλει τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ των 4° C και 99° C, χωρίς τη χρήση εξωτερικών παροχών εκτός του βασικού ενισχυτή. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα του μοντέλου αυτού είναι το θερμαινόμενο κάλυμμα που διαθέτει, το οποίο συγχρονίζεται άριστα με τη κυρίως βάση, αποφεύγοντας έτσι μια ενδεχόμενη εξάτμιση των δειγμάτων στις υψηλές θερμοκρασίες. Για κάθε δείγμα διενεργήθηκαν παράλληλα 2 διαφορετικές PCR για την ενίσχυση της CK-19 και της β-

ακτίνης, με τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες. Ο πολλαπλασιασμός του cDNA ολοκληρώνεται σε δύο στάδια (two steps PCR). Στο πρώτο στάδιο (πρώτη RT-PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου-στόχου, το cDNA επωάζεται παρουσία των ειδικών εξωτερικών εκκινητών (P1 και P2, Genset, Paris, France), μίγματος dNTPs (Invitrogen, US), διαλύματος $MgCl_2$, Platinum Taq πολυμεράσης (Invitrogen, US) και ρυθμιστικού διαλύματος PCR (Invitrogen, US). Η επώαση του μίγματος πραγματοποιείται στη συσκευή PCR για 35 κύκλους. Στο δεύτερο στάδιο (nested RT-PCR) για την ενίσχυση του αρχικού σήματος, ποσότητα του προϊόντος του πρώτου σταδίου επωάζεται παρουσία των ειδικών εσωτερικών εκκινητών (P3 και P4) και μίγματος dNTPs, διαλύματος $MgCl_2$, Taq πολυμεράσης και ρυθμιστικού διαλύματος PCR. Ως θετικός μάρτυρας κατά την ανάπτυξη της μεθοδολογίας του προσδιορισμού του CK19mRNA, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7, στην οποία εκφράζεται το γονίδιο της CK-19. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε μονοστιβάδες, σε φιάλες καλλιέργειας (επιφάνειας 25 ή 75 cm^2) και σε επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO_2 σε αέρα και θερμοκρασία 37 ^oC. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας ARH-77, η οποία δεν εκφράζει CK-19.

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου (log_{10}) του αριθμού των βάσεών τους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει τη τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε ζώνες (bands). Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σύνδεσης του DNA με ειδικά μόρια, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το

DNA. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και ελάχιστες ποσότητες DNA (έως 1 ng) με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσης με ακτινοβολία UV. Οι ζώνες του DNA μπορούν να ανακτηθούν από το πήκτωμα και να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς. Η ευαισθησία της ανίχνευσης του CK19mRNA με τη μέθοδο της nested RT-PCR εκτιμήθηκε σε μελέτη των Stathopoulou et al.[130] Βρέθηκε ότι η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει 1 MCF-7 κύτταρο ανάμεσα σε 10^6 φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα. Στην ίδια μελέτη, η ειδικότητα της ανίχνευσης εκτιμήθηκε με μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος από 54 υγιείς γυναίκες και βρέθηκε ότι μόνο 2 (3.7%) δείγματα ήταν θετικά, ενώ 52 (96.3%) δείγματα ήταν αρνητικά. Στους Πίνακες 1-5 περιγράφονται οι αλληλουχίες των 4 εκκινητών, τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του cDNA της CK-19 και της β-ακτίνης.[30, 130]

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη για τη CK-19 και τη β-ακτίνη

Δείκτης	**Μέθοδος**	**Εκκινητές**	**Αλληλουχία 5΄-3΄**	**Προιόν (bp)**
CK-19	Nested RT-PCR	Πρόσθιος (P1) Ανάστροφος (P2) Πρόσθιος (P3) Ανάστροφος (P4)	AAGCTAACCATGCAGAACCTCAACGACCGC TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC TCCCGCGACTACAGCCACTACTACACGACC CGCGACTTGATGTCCATGAGCCGCTGGTAC	745
Β-ακτίνη	Nested RT-PCR	Πρόσθιος (A1) Ανάστροφος (A2)	CATCCTGTCGGCAATGCCAGG CTTCTTGGGCATGGAGTCCTG	154

Πίνακας 2. Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης

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

Πίνακας 3. Συστατικά της αντίδρασης PCR για τη 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
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς $MgCl_2$), (10X)	5
cDNA	1
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2
DEPC-treated H_2O	36.3
Συνολικός όγκος	50

Πίνακας 4. Συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της CK-19

Στάδιο PCR	**1η PCR**	**2η PCR**
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 ^{o}C-6min	94 ^{o}C-2min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 ^{o}C-50sec	94 ^{o}C-50sec
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	72 ^{o}C	72 ^{o}C
Επέκταση εκκινητών	2:30min	2min
Τελική επέκταση των εκκινητών	72 ^{o}C-10min	72 ^{o}C-10min
Αριθμός κύκλων	35	35

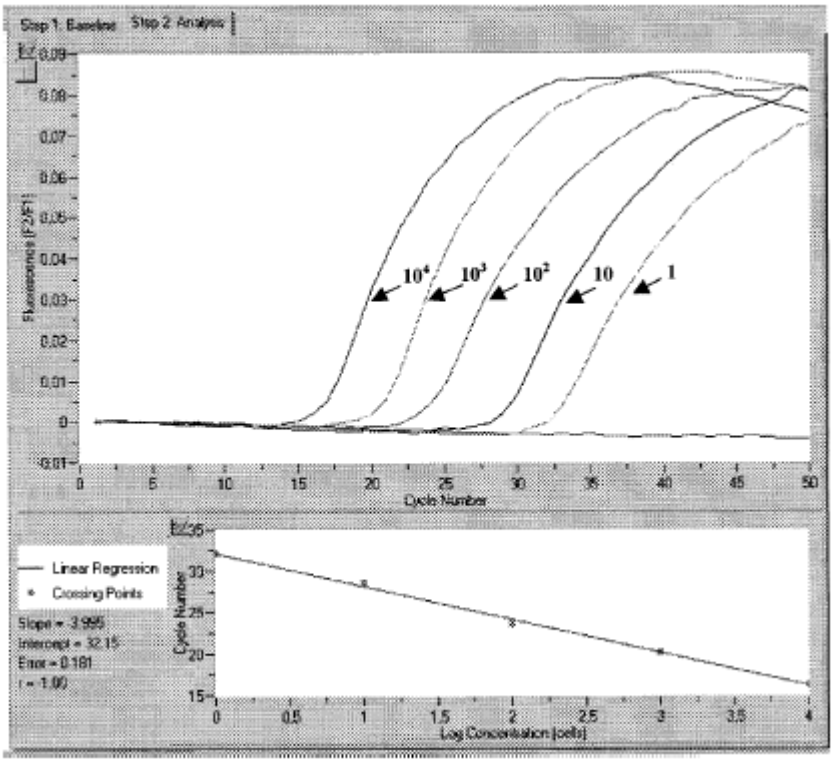
Πίνακας 5. Συστατικά των αντιδράσεων PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της CK-19

Διαλύματα	**Προστιθέμενος όγκος (μL)**	
	$1^{η}$ PCR	$2^{η}$ PCR
Πρόσθιος εκκινητής, (10 μM)	1	1
Ανάστροφος εκκινητής, (10 μM)	1	1
dNTPs, (5 μM)	2	2
$MgCl_2$, 50 mM	1.5	1.5
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς $MgCl_2$), (10X)	5	5
cDNA	5	-
Προϊόν $1^{ης}$ PCR	-	3
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2	0.2
DEPC-treated H_2O	34.3	36.3
Συνολικός όγκος, μL	50	50

στ. Ανίχνευση του CK19mRNA με real-time RT-PCR

Επιπλέον της nested RT-PCR, στη παρούσα μελέτη έγινε και ποσοτικός προσδιορισμός του CK19mRNA με τη μέθοδο της real-time RT-PCR, στα διαθέσιμα δείγματα.

Η real-time RT-PCR μέθοδος για την ανίχνευση CK19mRNA+ κυττάρων αναπτύχθηκε από τους Stathopoulou και συν.[35] Με βάση το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της μεθόδου, η παρουσία ≥ 0.6 MCF-7 ισοδυνάμων κυττάρων/5μg ολικού RNA θεωρήθηκε θετικό αποτέλεσμα (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Χαρακτηριστικές καμπύλες real-time 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.[133]

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

Για τη πραγματοποίηση της real-time PCR, αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα της αντίδρασης ανάλογα με τον αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων, αναμιγνύοντας τις ποσότητες των αντιδραστηρίων τα οποία μοιράζονται άμεσα στα τριχοειδή και προσθέτοντας τέλος το cDNA κάθε δείγματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των τριχοειδών και η εκτέλεση του πειράματος της PCR πραγματικού χρόνου στο όργανο LightCycler system (Roche Diagnostics) με την επιλογή του κατάλληλου προγράμματος.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των εκκινητών πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια της

εταιρίας TIB MOLBIOL (Berlin, Germany). Για τον έλεγχο της ποιότητας των cDNA δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με real-time RT-PCR ενίσχυση δύο γονιδίων βασικής λειτουργίας (housekeeping genes), της glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) και της porphobilinogen deaminase (PBGD). Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές για τη GAPDH σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν από την εταιρία TIB MOLBIOL, ενώ για τη PBGD χρησιμοποιήθηκε το PBGD LightCycler-h-PBGD housekeeping gene set (Roche, Switzerland). Στους Πίνακες 7,8 και 9 περιγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια της real-time RT-PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA (Stathopoulou A, και συν).[35]

Πίνακας 6. Αλληλουχίες των 4 εκκινητών της real-time RT-PCR

Δείκτης	**Μέθοδος**	**Εκκινητές**	**Αλληλουχία 5΄-3΄**	**Προϊόν**
CK-19	Real-time RT-PCR	Πρόσθιος 1 Ανάστροφος 1 Ανιχνευτής υβριδισμού FL Ανιχνευτής υβριδισμού LC	GCACTACAGCCACTACTACACGA CTCATGCGCAGAGCCTGTT TGTCCTGCAGATCGACAACGCCC-FL LCRed640- CTGGCTGCAGATGACTTCCGAACC	159 bp

Πίνακας 7. Συνθήκες real-time PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA

Στάδιο PCR	**1η PCR**
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/5min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	95°C/10sec
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	60°C/10sec
Επέκταση εκκινητών	72°C/20sec
Αριθμός κύκλων	50

Πίνακας 8. Συστατικά των αντιδράσεων real-time PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA

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 (10μM)	0.4
$MgCl_2$, 50mM	1
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς $MgCl_2$), (10X)	2
cDNA	1
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2
DEPC-treated H_2O	11.1
Συνολικός όγκος, μL	20.0

Πίνακας 9. Συστατικά των αντιδράσεων real-time PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA[35]

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 (10μM)	0.4
$MgCl_2$, 50mM	1
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς $MgCl_2$), (10X)	2
cDNA	1
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2
DEPC-treated H_2O	11.1
Συνολικός όγκος, Ml	20.0

2.2 Ανίχνευση των CTCs με την τεχνική του ανοσοφθορισμού

PBMCs απομονώθηκαν με διαβαθμισμένη φυγοκέντριση χρησιμοποιώντας Ficoll-Hypaque (d=1.077g/mol) στα 1800rpm για 30 min. Τα απομονωθέντα PBMCs εκπλύθηκαν με PBS και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση στα 1500 για 10 min. Τελικά διάλυμα που περιείχε 250.000 κύτταρα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση σε θετικά φορτισμένη αντικειμενοφόρο πλάκα.

Τέσσερις αντικειμενοφόρες πλάκες (10^6 PBMCs) αναλύθηκαν ανά ασθενή. Με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού μελετήθηκε η έκφραση των κυτταροκερατινών

(CK) του EGFR και HER-2 σε πλακίδια επιστρωμένα με PBMCs. Συγκεκριμένα, τα πλακίδια με τα PBMCs μονιμοποιήθηκαν με κρύο διάλυμα ακετόνης:μεθανόλης 9:1 για 20 min. Ακλούθησε έκπλυση για 3min τρεις φορές με διάλυμα PBS/5%FBS. Τα κύτταρα παραμένουν σε PBS/5%FBS στους 4^0C για 12h προκειμένου να κορεσθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης. Στη συνέχεια, γίνεται χρώση με το αντίσωμα πανκυτταροκερατίνης A45-B/B3 (1:50) που είναι ένα anti-mouse μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για τη CK8,CK18 και CK19 (Micromet, Munich, Germany) για 1 ώρα. Αφού γίνει έκπλυση των πλακιδίων τρεις φορές για 3min, γίνεται επώαση με το δεύτερο FITC anti-mouse IGg (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) για 45 min. Ακολούθως, τα πλακίδια υποβάλλονταν σε χρώση ή με το αντίσωμα για το CD45 (κοινό αντιγόνο των λευκοκυττάρων: Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) ή με το αντίσωμα για τον EGFR (Santa Cruz) για 1 ώρα. Για το HER-2 χρησιμοποιήθηκε anti-rabbit HER2 μονωκλωνικό αντίσωμα. (Cell Signaling Technology, USA). Κατόπιν, τα κύτταρα επωάζονταν με το αντίστοιχο δεύτερο σημασμένο με Rhodamine anti-rabbit αντίσωμα (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) για 45 min. Τέλος, σε όλα τα πειράματα τα κύτταρα έχου βαφεί με 4'-6-Diamino-2-phenylindone (DAPI) για τη χρώση του πυρήνα.[74]

Τα πλακίδια σαρώνονταν σε μικροσκόπιο διπλού φθορισμού (Leica DM 2500, Germany) και με λέιζερ συνεστιακή μικροσκοπία (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany). Τα κυτταρο-μορφολογικά κριτήρια της δημοσίευσης Meng et al[83] (μεγάλος λόγος πυρήνα προς κυτταρόπλασμα, μεγαλύτερα κύτταρα από τα λευκά αιμοσφαίρια κ.α,) ακολουθήθηκαν προκειμένου να χαρακτηριστεί ένα CK-θετικό κύτταρο ως CTC.

Τα CTCs χαρακτηρίζονταν ως EGFR-θετικά αν η ένταση χρώσης του EGFR ήταν μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των PBMCs, τα οποία χρησίμευαν ως αρνητικός

μάρτυρας. Επιπλέον, για να επαληθεύσουμε την ειδικότητα της διαδικασίας χρώσης, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες παρασκευάζονταν με τη προσθήκη ή παράλειψη των αντιστοίχων EGFR και HER-2 αντισωμάτων σε καρκινικά κύτταρα SKBR3 του μαστού τα οποία εκφράζουν EGFR και HER-2. Οι ασθενείς με έστω και ένα EGFR θετικό ή HER-2 θετικό κύτταρο θεωρούνταν EGFR ή HER-2 θετικοί, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονταν σε αριθμό CTCs/10^6 PBMCs.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ομάδα των ασθενών που έλαβε gefitinib (iressa)

Σαράντα-εφτά ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού ελέχθησαν για τη παρουσία CTCs με τη χρήση και των δύο μεθόδων [RT-PCR (CK-19 mRNA-θετικά κύτταρα) και ανοσοφθορισμού]. Οι 17 πρώτοι ασθενείς που είχαν ανιχνεύσιμα CTCs και με τις δύο μεθόδους εντάχθηκαν στη μελέτη χορήγησης gefitinib. Μετά από τροποποίηση του πρωτοκόλου, οι 9 από αυτές τις 17 ασθενείς εντάχθησαν μόνο εφόσον είχαν EGFR-θετικά κύτταρα., ενώ δεν ήταν γνωστή η έκφραση του EGFR στα CTCs των 8 πρώτων ασθενών. Οι ασθενείς έλαβαν 250 mg p.o. gefitinib ημερησίως.

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που έλαβαν gefitinib παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Έντεκα ασθενείς (64.7%) ήταν μετεμμηνοπαυσιακές και 13 (76.4%) είχαν λάβει επικουρική θεραπεία. Εννέα (52.9%) ασθενείς είχαν όγκους με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και τέσσερις (23.5%) HER2-θετικούς όγκους. Εννέα (52.9%) ασθενείς παρουσίαζαν σπλαχνική νόσο και 10 (58.8%) είχαν λάβει δύο ή περισσότερες γραμμές θεραπείας.

Πίνακας 10. Χαρακτηριστικά ασθενών που έλαβαν gefitinib

	Έκφραση EGFR στα CTCs			
	Γνωστή		Άγνωστη	
	n=9	%	n=8	%
Διάμεση ηλικία (ελάχιστη-μέγιστη)	56 (32-85)		65.5 (54-74)	
Λειτουργική Κατάσταση (**PS**) 0-2	9	100	8	100
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση Πριν-/Μετά/Περι	5/4/0	56.0/44.0/0.0	0/7/1	0.0/88.0/12.0
Προηγούμενη επικουρική θεραπεία Ναι/Όχι	8/1	89.0/11.0	5/3	62.0/38.0
Έκφραση ορμονικών υποδοχέων				
Θετική Αρνητική Άγνωστη	5 3 1	56.0 33.0 11.0	4 3 1	50.0 38.0 12.0
Έκφραση HER2				
Θετική Αρνητική Άγνωστη	2 6 1	22.0 67.0 11.0	2 4 2	25.0 50.0 25.0
Σπλαχνική νόσος Ναι/Όχι	4/5	45.0/55.0	5/3	62.0/38.0
Προηγούμενες γραμμές θεραπείας 1/2/≥3	3/3/3	33.3/33.3/33.3	4/3/1	50.0/38.0/12.0
Προηγούμενη Ορμονοθεραπεία Ναι/όχι	6/3	67.0/23.0	6/2	75.0/25.0
Βέλτιστη ανταπόκριση στην προηγούμενη θεραπεία PR/SD	6/3	67.0/33.0	6/2	75.0/25.0

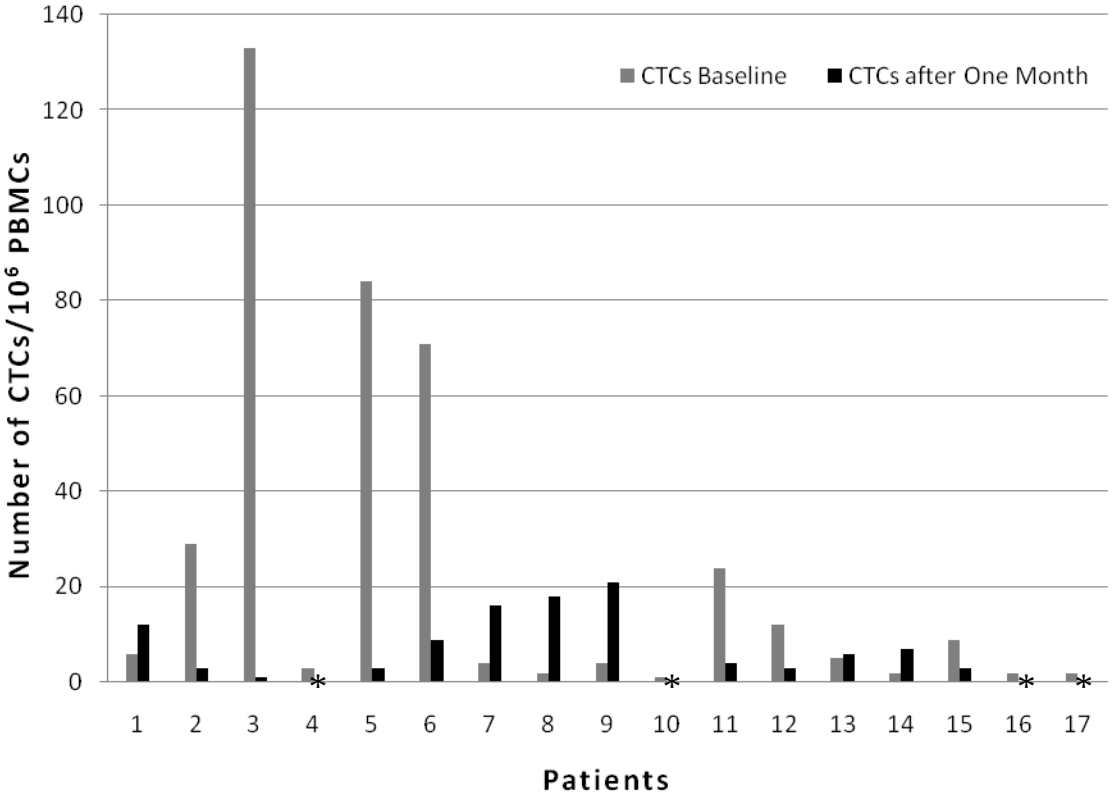
SD: Stable Disease-Σταθεροποίηση της νόσου; PR: Partial Response Μερική ύφεση της νόσου

Δραστικότητα του gefitinib (iressa) στα CTCs

Ενενήντα-ένα κύκλοι θεραπείας (κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε ένα μήνα θεραπείας) χορηγήθηκαν σε όλη την ομάδα των ασθενών που έλαβε gefitinib ανεξάρτητα από την έκφραση του EGFR. Ο διάμεσος αριθμός κύκλων ήταν 4 (εύρος 2-19). Όλοι οι ασθενείς συμπλήρωσαν τουλάχιστον 2 κύκλους, και 14 (82%) τουλάχιστον 3 κύκλους θεραπείας. Μετά την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου θεραπείας ο συνολικός αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκαν με ανοσοφθορισμό μειώθηκε σε 11 από τις 17 ασθενείς (64.7%) με ένα διάμεσο ποσοστό 96.4% (εύρος 66.7-100%) ενώ στους υπόλοιπους 6 (35.3%) ασθενείς αυξήθηκε (εικόνα 2). Μετά τον δεύτερο κύκλο, ο αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκαν μειώθηκαν κατά ένα διάμεσο ποσοστό 94,1% (εύρος: 50-100%) σε 12 ασθενείς (70.6%) και αυξήθηκε σε 5 (29.4%). Αντίθετα, προοδευτική αύξηση του αριθμού των CTCs παρατηρήθηκε σε 7 από τους 8 ασθενείς που δεν έλαβαν gefitinib [historical control group (πίνακας 11)]. Συνολικά, 393 CTCs ανιχνεύθηκαν πριν την έναρξη της θεραπείας στην ομάδα των ασθενών που έλαβε gefitinib με διάμεσο αριθμό 5 CTCs ανά ασθενή (εύρος, 1-33). Ο αριθμός των CTCs μειώθηκε σε 106 (διάμεσος αριθμός 3 CTCs/ασθενή εύρος, 0-21) και σε 220 (διάμεσος αριθμός 3 CTCs/ασθενή εύρος, 0-53) μετά τον πρώτο και δεύτερο κύκλο, αντίστοιχα. Παρουσιάστηκε δηλαδή ελάττωση σε ποσοστά 73% και 44% στον πρώτο και δεύτερο κύκλο αντίστοιχα σε σχέση με τον αρχικό αριθμό των CTCs πριν την έναρξη της θεραπείας.

Εικόνα 2: Σύγκριση του αριθμού των CTCs πριν την έναρξη της θεραπείας με gefitinib (γκρι στήλη) και ένα μήνα μετά την έναρξη της θεραπείας (μαύρη στήλη)

Ο αστερίσκος (*) δείχνει ότι δεν υπήρχαν ανιχνεύσιμα CTCs μετά το τέλος του πρώτου κύκλου θεραπείας.



Πινακας 11. Κινητική των CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού μετά τη χημειοθεραπεία οι οποίες δεν έλαβαν gefitinib (historical control group).

CK(+) CTCs/10^6 PBMCs

Ασθενής	Μετά-ΧΜΘ	1mo	2mo	3mo	4mo
HC1	1	1	3	4	5
HC2	0	3	2	6	15
HC3	4	3	6	18	24
HC4	0	2	5	9	13
HC5	3	2	2	3	2
HC6	12	14	20	22	28
HC7	2	6	9	11	17
HC8	0	4	7	10	22

Δραστικότητα του gefitinib στα EGFR-θετικά CTCs

Εννέα ασθενείς εντάχθηκαν με βάση την έκφραση του EGFR στα CTCs. Όπως φαίνεται στις εικόνες 3a και 3b η έκφραση του EGFR στα CTCs ήταν κυρίως μεμβρανική και σε μικρότερο βαθμό ενδοκυττάρια ενώ η CK χρώση ήταν κυρίως κυτταροπλασματική. Συνολικά, 336 CTCs ανιχνεύθηκαν πριν την έναρξη της θεραπείας με gefitinib, (με

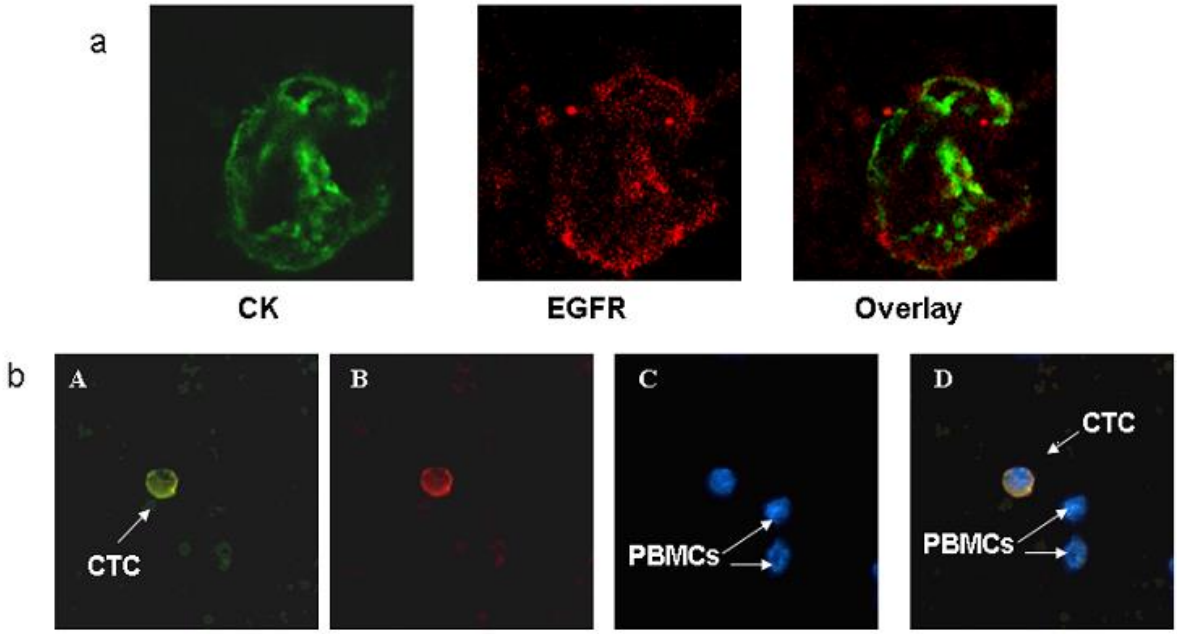
διάμεσο αριθμό 6 ανά ασθενή, εύρος 2-133) σε αυτή την ομάδα των ασθενών, 74 (22%) εξέφραζαν EGFR (διάμεσος αριθμός 2 EGFR(+)/CK(+) CTCs ανά ασθενή, εύρος 1-28). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν PBMCs από 10 υγιείς γυναίκες αιμοδότριες τα οποία ελέχθησαν για τη συνέκφραση CK/EGFR με διπλό ανοσοφθορισμό. Δεν υπήρχαν θετικά κύτταρα για EGFR και CK σε αυτές τις υγιείς γυναίκες.

Εξήντα-τρείς θεραπευτικοί κύκλοι χορηγήθηκαν σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Οχτώ από τις 9 ασθενείς ολοκλήρωσαν τουλάχιστον 3 κύκλους θεραπείας. Οι αριθμοί των CTCs μειώθηκαν κατά ένα διάμεσο ποσοστό 100% (εύρος 87.3-100%) και 98.3% (εύρος 66.7-100%) σε 5 ασθενείς (55.5%) και 6 (66.7%) μετά την ολοκλήρωση του πρώτου και δεύτερου κύκλου θεραπείας, αντίστοιχα. Ο συνολικός αριθμός των CTCs που ανιχνεύθηκε σε όλες τις ασθενείς μειώθηκε από 336 πριν την έναρξη της θεραπείας σε 83 (μείωση κατά 75.3%) και 114 (μείωση κατά 66.1%) μετά τον πρώτο και δεύτερο κύκλο, αντίστοιχα (πίνακας 12). Ο αριθμός των EGFR-θετικών CTCs μειώθηκε από 74 πριν την έναρξη θεραπείας σε 25 (μείωση: 66.2%) στο τέλος του πρώτου και 23 (μείωση: 68.9%) στο τέλος του δεύτερου κύκλου (πίνακας 12). Ομοίως, ο αριθμός των EGFR-αρνητικών CTCs επίσης ελαττώθηκε από 262 σε 58 (μείωση: 77.8%) και 91 (μείωση: 65.2%) στο τέλος του πρώτου και δεύτερου κύκλου, αντίστοιχα (πίνακας 12). Ωστόσο από τα 89 CTCs που ανιχνεύθηκαν στο τέλος του τρίτου κύκλου σε 7 από τις 8 ασθενείς που ολοκλήρωσαν τρείς κύκλους θεραπείας (δεν υπήρχε δείγμα σε 1 ασθενή) μόνο 8 CTCs (ποσοστό 8.9%) εξέφραζαν EGFR ενώ 81 (91.0%) ήταν EGFR-αρνητικά (πίνακας 12)

Εικόνα 3: Έκφραση του EGFR στα CTCs ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού

(a) Λέιζερ συνεστιακή μικροσκοπία σε CTCs μίας ασθενούς μετά από χρώση με αντισώματα έναντι πανκυτταροκερατίνης (A45-B/B3: πράσινο) και EGFR (κόκκινο), μεγέθυνση (x60).

(b) Χρώση διπλού ανοσοφθορισμού σε CTCs μίας ασθενούς με αντισώματα ένανι πανκυτταροκερατίνης (πράσινο) και έναντι του EGFR (κόκκινο) και Dapi (για τη χρώση του πυρήνα), μεγέθυνση (x20) (ARIOL system).



Πίνακας 12 Αριθμός CTCs στις ασθενείς με γνωστή έκφραση EGFR στα CTCs

				Πριν τη θεραπεία			1ος κύκλος			2ος κύκλος			3ος κύκλος			4ος κύκλος			5ος κύκλος			6ος κύκλος		
				Αριθμός CTC																				
Αρ. Ασθ	κύκλος	Βέλτιστη Ανταπόκριση	PFS (μήνες)	Συνολικά	EGFR (+)	EGFR (-)	Συνολικά	EGFR (+)	EGFR (-)	Συνιλικά	EGFR (+)	EGFR (-)	Συνολικά	EGFR (+)	EGFR (-)	Συνολικά	EGFR (+)	EGFR (-)	Συνολικα	EGFR (+)	EGFR (-)	Συνολικά	EGFR (+)	EGFR (-)
1	2	PD	2	6	3*	3	12	6	6	0	0	0	Stop											
2	4	PD	4	29	27	2	3	0	3	1	0	1	4	1	3		ND	3	ND	ND	ND	Stop		
3	5	PD	5	133	1	132	1	0	1	0	0	0	3	3	0		ND	1	Stop					
4	6	SD	6	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	19	SD	19	84	28	56	3	0	3	3	0	3	0	0	0	0	0	0	2	1	1	6	0	6
6	16	PR	16	71	8	63	9	0	9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	0	4	1	0	1
7	4	SD	4	4	2	2	16	2	14	25	3	22	14	0	14	16	1	15	Stop					
8	4	PD	4	2	2	0	18	12	6	37	19	18	59	5	64	43	5	38	Stop					
9	3	PD	3	4	2	2	21	5	16	48	1	47	ND	ND	ND	Stop								
				336	74	262	83	25	58	114	23	91	89	8	81									

* Αριθμός των CTCs/ 10^6 PBMCs

PFS: Επιβίωση ελεύθερη προόδου νόσου; PD: Πρόοδος νόσου; SD: Σταθεροποίηση της νόσου; PR: Μερική ύφεση της νόσου; ND: Δεν έγινε, Stop: Διακοπή θεραπείας

Κλινική έκβαση με βάση την επίδραση της θεραπείας με gefitinib στα CTCs

Η διάμεση διάρκεια της θεραπείας με gefitinib ήταν 3.9 μήνες (εύρος, 1.9-18.8) για όλες τις ασθενείς και 4.2 μήνες (εύρος, 1.9-18.8) για την υποομάδα των ασθενών με γνωστή έκφραση του EGFR στα CTCs. Το ποσοστό ελέγχου της νόσου (disease control rate - DCR) ήταν 41,2% και 44,4% και η διάμεση PFS ήταν 16 εβδομάδες (εύρος, 5-76) και 18 εβδομάδες (εύρος, 8-76) σε όλες τις ασθενείς και στην υποομάδα με γνωστή έκφραση του EGFR αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 12, το gefitinib συσχετίσθηκε με σημαντική μείωση του απόλυτου αριθμού των EGFR(+)/CK(+) and EGFR(-)/CK(+) CTCs μετά τον πρώτο μήνα της θεραπείας σε 4 (44.4%) ασθενείς και, μάλιστα, η ελάττωση αυτή διατηρήθηκε για τουλάχιστον 3 μήνες. Από αυτές τις ασθενείς μια παρουσίασε μερική ύφεση της νόσου της, δύο ασθενείς σταθεροποίηση και μία πρόοδο νόσου. Επιπλέον, σε 2 (22,2%) από αυτές τις ασθενείς (#5, #6; Πίνακας 12) η εξάλλειψη των CTCs διατηρήθηκε σε όλο το διάστημα στο οποίο διαδοχικά δείγματα αίματος ελέγχονταν μηνιαία (μέχρι 6 μήνες). Ειδκά, σε αυτές τις 2 ασθενείς παρατηρήθηκε παρατεταμένο PFS 16 και 19 μηνών με σταθεροποίηση της νόσου στη μία ασθενή και μερική ύφεση της νόσου στην άλλη. Επιπλέον, και οι δύο ασθενείς είχαν σπλαχνική νόσο και είχαν λάβει προηγουμένως μία και δύο γραμμές χημειοθεραπείας, αντίστοιχα για προχωρημένη νόσο. Σε 3 (33.3%) ασθενείς (#7, #8, #9; Πίνακας 12) διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση και στους δύο υποπληθυσμούς κυττάρων EGFR(+)/CK(+) και EGFR(-)/CK(+) μετά τον πρώτο κύκλο και επιβεβαιώθηκε μετά το δεύτερο κύκλο θεραπείας. Ενδιαφέρον είναι ότι σε δύο από αυτές τις ασθενείς η αύξηση των CTCs αφορούσε κυρίως σε EGFR(-)/CK(+) CTCs. Οι δύο από τις τρείς ασθενείς με αύξηση του αριθμού των CTCs παρουσίασαν πρόοδο νόσου ως βέλτιστη ανταπόκριση στη θεραπεία με gefitinib.

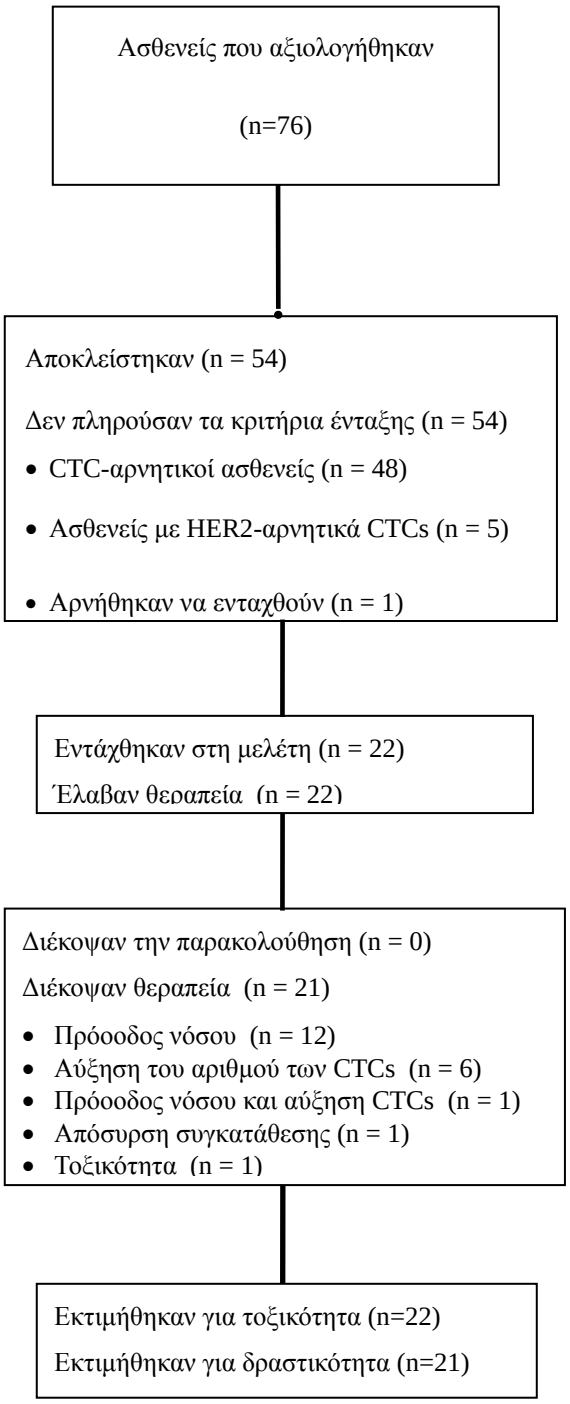
Τοξικότητα του gefitinib

Δεκα-εφτά ασθενείς εκτιμήθηκαν για τοξικότητα. Οι πιο συχνές παρενέργειες ήταν εξάνθημα βαθμού 1 σε 6 ασθενείς (35,2%) και διάρροια βαθμού 1 σε 3 ασθενείς (17,6%). Μόνο μία ασθενής εμφάνισε εξάνθημα σοβαρότερου βαθμού (βαθμού 2) και άλλη μία ασθενής παρουσίασε διάρροια βαθμού 2. Τέλος, ασθένεια βαθμού 2 εμφανίστηκε σε μία ασθενή. Γενικά, οι ασθενείς είχαν άριστη ανοχή στη θεραπεία.

2. Ομάδα των ασθενών που έλαβε lapatinib

Εβδομήντα-εξι στη σειρά ασθενείς με σταθεροποίηση ή μερική ύφεση της νόσου μετά από την καθιερωμένη θεραπεία για μεταστατικό καρκίνο μαστού ελέχθησαν για μικρομεταστατικά HER-2 θετικά κύτταρα με ανοσοφθορισμό, από το Σεπτέμβριο 2008 έως το Νοέμβριο 2011. Είκοσι-οχτώ (36.9%) ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα CTCs, και 23 (30.3%) είχαν τουλάχιστον ένα HER-2-θετικό CTC. Εικοσι-δύο ασθενείς εντάχθησαν στη μελέτη και έλαβαν Lapatinib σε δόση 1500mg p.o. ημερησίως. Η τελευταία εκτίμηση των ασθενών έγινε το Φεβρουάριο του 2013. . Όλες οι ασθενείς αξιολογήθηκαν για τοξικότητα και 21 για δραστικότητα της θεραπείας. Το διάγραμμα ροής των ασθενών της μελέτης παρουσιάζεται στην εικόνα 4. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αναγράφονται στον πίνακα 13. Η διάμεση ηλικία ήταν 62.5 χρόνια (εύρος, 37-77). Δεκαπέντε (68.2%) ασθενείς ήταν μετεμμηνοπαυσιακές και 20 (90.1%) είχαν HER2-αρνητικό πρωτοπαθή όγκο. Δώδεκα (54.5%) ασθενείς είχαν σπλαχνική νόσο και 11 (50%) είχαν λάβει 2 ή περισσότερες γραμμές θεραπείας για προχωρημένη νόσο.

Εικόνα 4. Διάγραμμα ροής των ασθενών στη μελέτη με lapatinib



Πινακας 13. Χαρακτηριστικά ασθενών που έλαβαν lapatinib

	Ασθενείς	
	n=22	%
Ηλικία Διάμεση (ελάχιστη-μέγιστη)	62.5 (37-77)	
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση Προεμμηνοπαυσιακή Μετεμμηνοπαυσιακή	7 15	31.8 68.2
HER2 στον πρωτοπαθή όγκο Θετικό Αρνητικό	2 20	9.1 90.1
Υποδοχείς ορμονών ER+θετικός PR+ θετικός ER+ θετικός PR- αρνητικός ER- αρνητικός PR+ θετικός Άγνωστοι	14 4 2 2	63.6 18.2 9.1 9.1
Θέσεις μεταστάσεων Σπλαχνικές Μη-σπλαχνικές	12 10	54.5 45.5
Αριθμός προηγούμενων γραμμών θεραπείας 1 ≥2	11 11	50.0 50.0
Προηγούμενη ορμονοθεραπεία Ναι Όχι	20 2	90.9 9.1

Δραστικότητα του lapatinib στα HER-2 θετικά CTCs

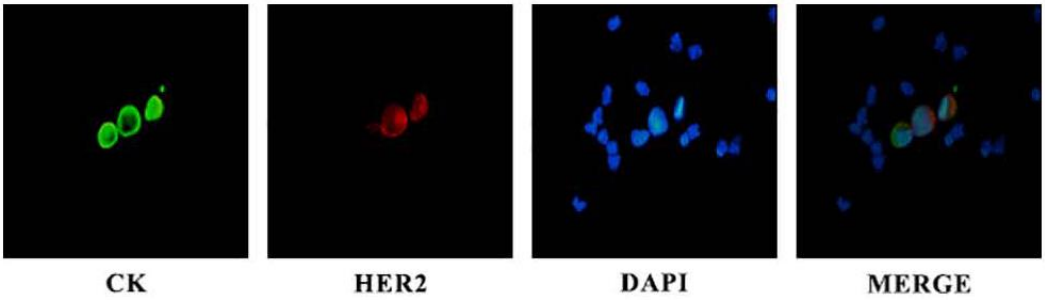
Ο διάμεσος αριθμός των CTCs ήταν 130 (εύρος 1-617) ανά ασθενή πριν από την έναρξη της θεραπείας στις 21 ασθενείς που αξιολογήθηκαν για τη δραστικότητα της θεραπείας. Η έκφραση του HER-2 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 93.45% του συνολικού αριθμού των CTCs που ανιχνεύθηκαν σε αυτές τις ασθενείς (εικόνα 5). Επιπλέον, έγινε διπλή χρώση με αντισώματα για A45-B/B3 και HER2 ή EGFR σε cytospins από PBMCs 10 υγιών γυναικών και δεν διαπιστώθηκε παρουσία κυττάρων θετικών για HER2 και κυτταροκερατίνες (CK), γεγονός που δεν είχε μέχρι τώρα αποδειχθεί.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της θεραπείας διαπιστώθηκε μείωση του αριθμού των HER2-θετικών CTCs σε 14 ασθενείς (ποσοστό 66.6%) (95% CI:49.9%-90.1%). Η διάμεση εκατοστιαία μείωση ανά ασθενή ήταν 100% (εύρος, 45-100%). Σε 5 ασθενείς (23.8%) ο αριθμός των HER2-θετικών CTCs αυξήθηκε και σε μία ασθενή (4.8%) παρέμεινε σταθερός (εικόνα 6). Σε μία ασθενή (4.8%) παρόλο που δεν υπήρχε δείγμα αίματος για ανίχνευση των CTCs μετά από τον πρώτο κύκλο, η θεραπεία με lapatinib συνεχίστηκε αφού δεν τεκμηριώθηκε κλινικά πρόοδος νόσου. Στο τέλος του δεύτερου κύκλου τα HER2-θετικά CTCs μειώθηκαν σε 16 (76.2%) από τις 21 ασθενείς (95% CI:58.0%-94.4%). Ο διάμεσος χρόνος μέχρι το ναδίρ ήταν ένας μήνας (εύρος 1-5 μήνες). Ο συνολικός αριθμός των CTCs και των HER2-θετικών CTCs σε όλες τις ασθενείς καθόλη τη διάρκεια της θεραπείας παρουσιάζονται στον πίνακα 14. Επιπλέον, η σχηματική απεικόνιση της μεταβολής των HER-2 θετικών CTCs σε όλες τις ασθενείς παρουσιάζεται στην εικόνα 7.

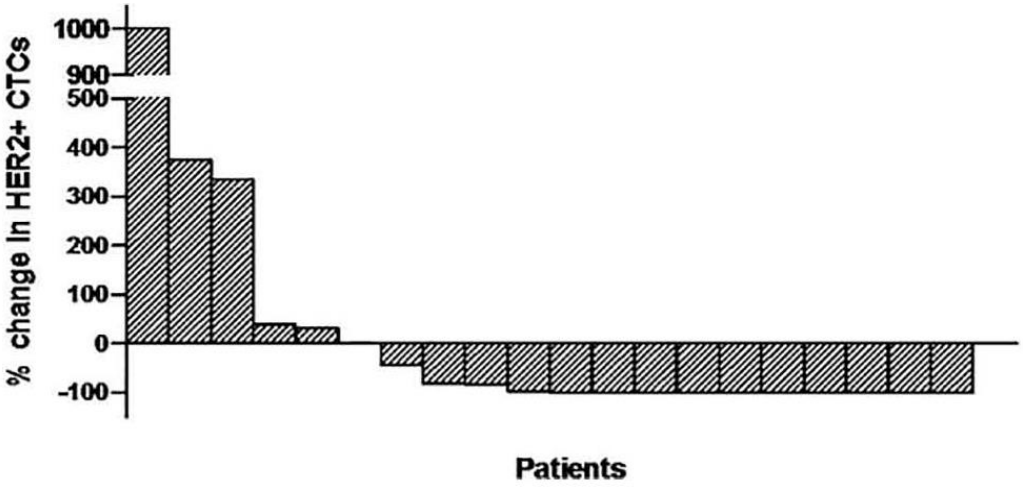
Δύο ασθενείς είχαν HER- 2 θετικούς πρωτοπαθείς όγκους και είχαν λάβει και οι δύο θεραπεία με trastuzumab στο παρελθόν (#8 και #12, πίνακας 14). Ο αριθμός των CTCs επίσης μειώθηκε σημαντικά στις 2 αυτές ασθενείς μετά το τέλος του

πρώτου και δεύτερου κύκλου θεραπείας (πίνακας 14). Μετά την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου ο διάμεσος αριθμός των HER2-θετικών CTCs ανά ασθενή ήταν 2 (εύρος, 0-542) και επίσης 2 (εύρος, 0-513), μετά το τέλος του δεύτερου κύκλου ((p=0.103 και p=0.013 μετά τον πρώτο και δεύτερο κύκλο, αντίστοιχα συγκριτικά με τους αριθμούς των HER2-θετικών CTCs πριν την έναρξη της θεραπείας) (εικόνα 8). Αντίθετα, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο διάμεσο αριθμό των HER-2-αρνητικών CTCs ανά ασθενή όσον αφορά τον αριθμό τους πριν την έναρξη της θεραπείας και μετά το τέλος του πρώτου (p=0.625) και του δεύτερου κύκλου (p=0.156).

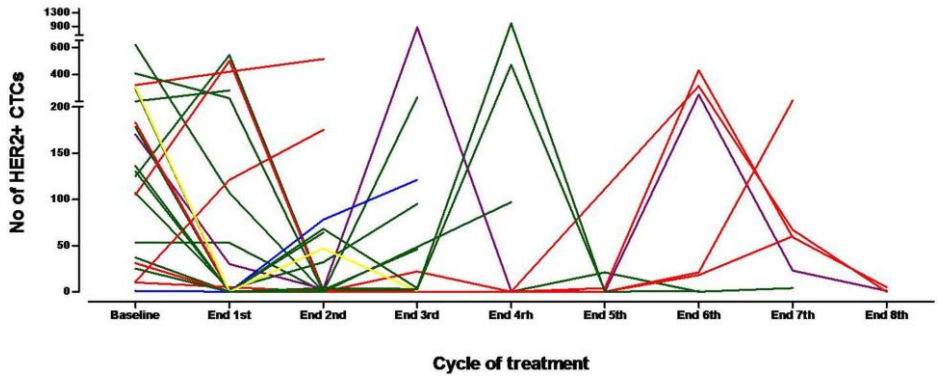
Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτική εικόνα των CTCs που ανιχνεύονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Διπλή χρώση των κυττάρων με τη χρήση A45 B/B3 (πράσινο), HER2 (κόκκινο) αντισωμάτων, και DAPI (μπλε) και ανίχνευση τους με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Απεικονίζεται ένα HER2-αρνητικό CTC σε σύγκριση με 2 HER2-θετικά CTCs.



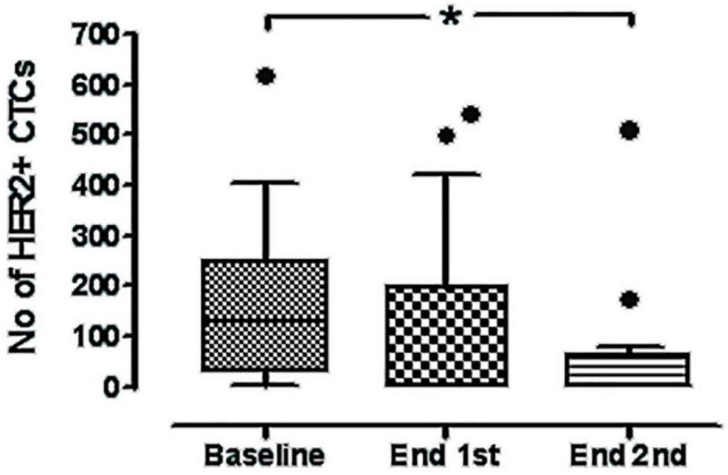
Εικόνα 6. Εκατοστιαία (%) μεταβολή του αριθμού HER2-θετικών CTCs στίς ασθενείς που έλαβαν lapatinib (n=20) μετά την ολοκλήρωση του 1ου κύκλου θεραπείας συγκριτκά με τον αριθμό των HER2- θετικών CTCs κατά την ένταξη τους στη μελέτη. Σε μία ασθενή δεν υπήρχε δείγμα αίματος για ανίχνευση των CTCs μετά την ολοκλήρωση του 1ου κύκλου.



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της μεταβολής του αριθμού των HER-2 θετικών CTCs σε όλες τις ασθενείς κατά τους 8 πρώτους κύκλους θεραπείας. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στις ασθενείς που διέκοψαν το lapatinib λόγω ανόδου του αριθμού των CTCs (n=6), το πράσινο στις ασθενείς που διέκοψαν λόγω προόδου νόσου (n=12) και το μπλε στις περιπτώσεις με προόδο νόσου και ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των CTCs (n=1). Μία ασθενής απέσυρε την ενυπόγραφη συγκατάθεση (κίτρινο χρώμα) και μία ελάμβανε ακόμη θεραπεία (μωβ χρώμα).



Εικόνα 8. Συνολικός αριθμός των HER2-θετικών CTCs που ανιχνεύθηκαν σε όλη την ομάδα των ασθενών πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση του 1^{ου} και 2^{ου} κύκλου θεραπείας. Απεικονίζονται οι διάμεσες (median values ± SD) αριθμητικές τιμές των HER2-θετικών CTCs. Τα HER2-θετικά CTCs μειώθηκαν από έναν διάμεσο αριθμό (median) 130 ανά ασθενή (εύρος 1-617), σε 2 ανά ασθενή (εύρος 0-542) (p=0.103) και επίσης 2 ανά ασθενή (εύρος 0-513) στο τέλος του 1^{ου} και 2^{ου} κύκλου θεραπείας με lapatinib αντίστοιχα (p=0.013).



Κλινική έκβαση με βάση τη δραστικότητα του lapatinib στα CTCs

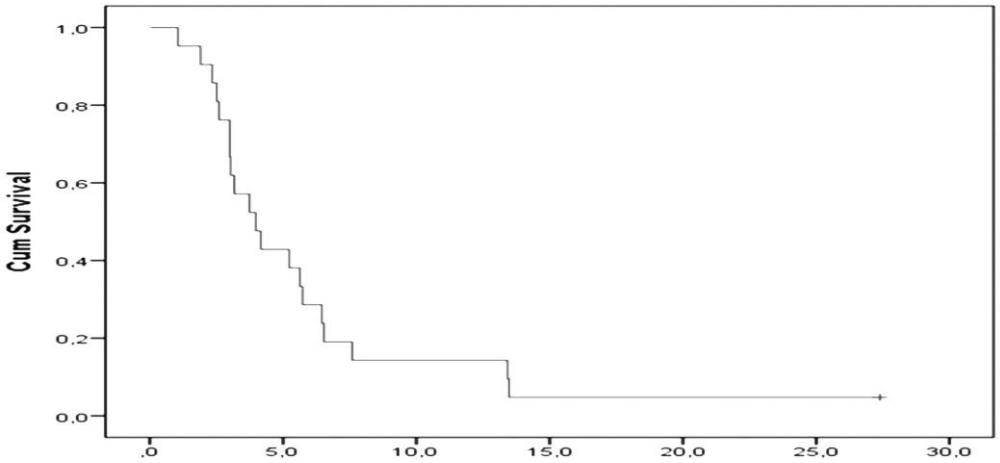
Συνολικά 120 κύκλοι θεραπείας χορηγήθηκαν (διάμεσος αριθμός 4 κύκλοι ανά ασθενή, εύρος 0,6-27.4). Κατά τη στιγμή της ανάλυσης η θεραπεία είχε διακοπεί σε 12 (57%) εξαιτίας προόδου της νόσου, σε 6 (28.6%) εξαιτίας της αύξησης του αριθμού των CTCs, σε 1 ασθενή (4.8%) εξαιτίας ταυτόχρονης εμφάνισης προόδου της νόσου και αύξησης του αριθμού των CTCs και τέλος σε 1 ασθενή εξαιτίας μη ανεκτής τοξικότητας. Μία ασθενής ελάμβανε ακόμη θεραπεία και μία είχε αποσύρει τη συγκατάθεση της μετά από 3 κύκλους πριν την τεκμηρίωση προόδου της νόσου ή της αύξησης του αριθμού των CTCs.

Η αξιολόγηση της νόσου με βάση τις απεικονιστικές εξετάσεις έδειξε

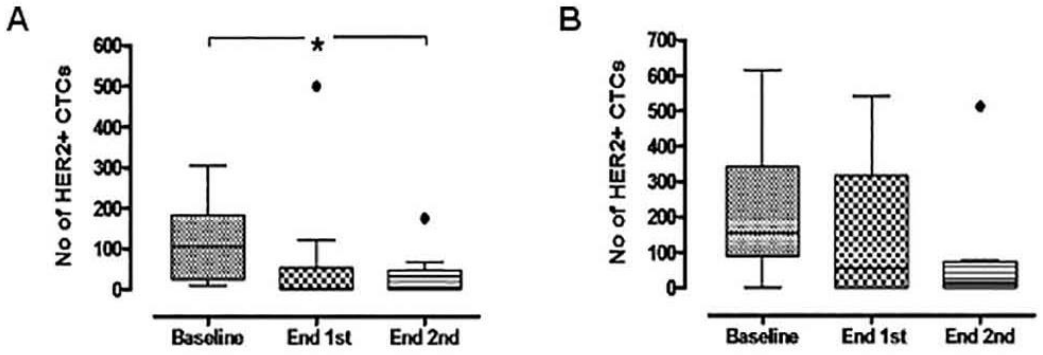
σταθεροποίηση της νόσου σαν βέλτιστη ανταπόκριση στη θεραπεία σε 11 ασθενείς (52.4%) (95%CI: 31.02%-73.74%) και πρόοδο νόσου σε 10 ασθενείς (47.6%) (Πίνακας 14). Δεν παρατηρήθηκε μερική ύφεση της νόσου σε καμία ασθενή. Το διάμεσο PFS διάστημα ήταν 4.0 μήνες (εύρος, 1.1–27.4 μήνες, 95%CI:2.471 - 5.462) και το ποσοστό 1-έτους επιβίωσης ελεύθερης προόδου νόσου (1-year PFS) ήταν 14.3%. Η καμπύλη Kaplan-Meier του PFS παρουσιάζεται στην εικόνα 9. Οι 7 (33.3%) από τις 21 ασθενείς έλαβαν θεραπεία για χρονικό διάστημα 6-27.4 μήνες (Πίνακας 14).

Στις ασθενείς με σταθερή νόσο ο διάμεσος αριθμός των HER2-θετικών CTCs ανά ασθενή ήταν 105 (εύρος, 10-305) πριν τη χορήγηση της θεραπείας με lapatinib. Ο διάμεσος αριθμός των HER2-θετικών CTC ελατώθηκε σε 0 κύτταρα ανά ασθενή τόσο μετά την ολοκλήρωση του πρώτου όσο και του δεύτερου κύκλου (εύρος 0-500 και 0-175, αντίστοιχα) (μετά τον πρώτο, p=0.193 και μετά το δεύτερο, p=0.018) (Εικόνα 10Α). Αντίθετα, στις ασθενείς που παρουσίασαν πρόοδο νόσου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον αριθμό των CTCs πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση του πρώτου (p=0.275) ή του δεύτερου κύκλου (p=0.250) θεραπείας (Εικόνα 10Β).

Εικόνα 9.Καμπύλη Kaplan-Meier της PFS στις ασθενείς που έλαβαν lapatinib (n=21)



Εικόνα 10. Συνολικός αριθμός των HER2-θετικών CTCs που ανιχνεύθηκαν στις ασθενείς με σταθερή νόσο (A) και στις ασθενείς με πρόοδο νόσου (B) ως βέλτιστη ανταπόκριση στη θεραπεία μετά την ολοκλήρωση του 1^{ου} και 2^{ου} κύκλου με lapatinib. Απεικονίζονται οι μέσες αριθμητικές τιμές (median values ± SD) των HER2-θετικών CTC. Στις ασθενείς με σταθεροποίηση της νόσου τους ο αριθμός των CTCs μειώθηκε από μία μέση τιμή 105 ανά ασθενή (εύρος, 10-305) πριν την έναρξη της θεραπείας σε 0 (εύρος, 0-500) και 0 (εύρος, 0-175), μετά την ολοκλήρωση του 1^{ου} (p=0.193) και 2^{ου} κύκλου (p=0.018), αντίστοιχα. Δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των CTCs στις ασθενείς που παρουσίασαν πρόοδο νόσου.



Αξιολόγηση της έκφρασης HER2 και EGFR στα CTCs πριν την έναρξη της θεραπείας και κατά την τεκμηρίωση προόδου (κλινική ή με βάση την αύξηση του αριθμού των CTCs)

Η έκφραση των HER-2 και EGFR στα CTCs εκτιμήθηκε πριν την έναρξη της θεραπείας και όταν τεκμηριώθηκε πρόοδος, (είτε κλινική πρόδος νόσου είτε με βάση την αύξηση του αριθμού των CTCs) σε 19 από τις 21 ασθενείς. Μια ασθενής ελάμβανε ακόμη θεραπεία και μία απέσυρε την ενυπόγραφη συγκατάθεση πριν την τεκμηρίωση προόδου της νόσου ή αύξησης του αριθμού των CTCs. Ο αριθμός των HER2-θετικών CTCs παρέμεινε μειωμένος στο δείγμα αίματος στο τέλος της θεραπείας (διάμεσος αριθμός 95 ανά ασθενή, εύρος 0-513) χωρίς να υπάρχει

στατιστικώς σημαντική διαφορά συγκριτικά με το αρχικό δείγμα αίματος πριν την έναρξη της θεραπείας (p=0.409). Το διάμεσο ποσοστό (mean) των HER-2 αρνητικών CTCs αυξήθηκε από 2.4% ανά ασθενή (εύρος, 0-19.4%) σε 30.6% (εύρος, 0-100%) στο τέλος της θεραπείας και η αύξηση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική (p=0.03). Επιπλέον, σε ποσοστό 21.05% των ασθενών ανιχνεύθηκαν HER2-αρνητικά CTCs στο αρχικό δείγμα ενώ ποσοστό 52.94% των ασθενών είχαν HER2-αρνητικά CTCs στο τελικό δείγμα αίματος κατά τη πρόοδο (p=0.667) ενώ, 7 ασθενείς (36.8%) είχαν αποκλειστικά μόνο HER2-αρνητικά CTCs στο τελικό δείγμα αίματος. Επιπλέον, ποσοστό 38.04% του συνολικού αριθμού των CTCs που ανιχνεύθησαν στη πρόοδο της νόσου ήταν HER2-αρνητικά, ενώ ποσοστό μόνο 1.4% των CTCs ήταν HER2-αρνητικά στο αρχικό δείγμα αίματος πριν την έναρξη της θεραπείας.

Εκτιμήθηκε, επιπλέον, η έκφραση του EGFR στα ίδια χρονικά σημεία. Όλοι οι CTC-θετικοί ασθενείς είχαν EGFR-θετικά CTCs στη πρόοδο της νόσου συγκριτικά με ποσοστό 62.5% πριν την έναρξη της θεραπείας (p=0.054). Επίσης, ο διάμεσος αριθμός καθώς και το διάμεσο ποσοστό των EGFR-θετικών CTCs ανά ασθενή αυξήθηκε από 1 και 2% στο αρχικό δείγμα σε 4 και 87%, αντίστοιχα, στο τελικό δείγμα αίματος που λήφθηκε κατά τη πρόοδο της νόσου, αλλά οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Ομοίως ο λόγος των EGFR-θετικών CTCs/συνολικό αριθμό CTCs που ανιχνεύθηκε σε όλες τις ασθενείς αυξήθηκε από 17.1% στο αρχικό δείγμα σε 37.6% στο δείγμα αίματος κατά τη πρόοδο της νόσου.

Τοξικότητα του lapatinib

Είκοσι δύο ασθενείς αξιολογήθηκαν για τοξικότητα από τη θεραπεία. Οι πιο συχνές παρενέργειες, οποιουδήποτε βαθμού σοβαρότητας, που παρουσιάστηκαν ήταν κόπωση, διάρροια και εξάνθημα και καταγράφηκαν σε 10 (45.4%), 12 (54.5%) και 7

(31.8%) ασθενείς, αντίστοιχα (Πίνακας 15). Ναυτία και έμετοι παρουσιάστηκαν σε 6 ασθενείς (27.3%) ενώ εμφάνιση παρονυχιών και επίσταξης αναφέρθηκαν σε ίδιο αριθμό ασθενών (4 ασθενείς, ποσοστό 18.2%). Γενικά, η τοξικότητα από το lapatinib ήταν εύκολα διαχειρήσιμη. Μόνο μία ασθενής εμφάνισε κολίτιδα και γαστρίτιδα βαθμού III τη 17η ημέρα του πρώτου κύκλου που παρέμεινε παρά τη μείωση της δόσης του lapatinib. Σε αυτή την ασθενή διεκόπη η θεραπεία πριν την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου. Μία άλλη ασθενής απέσυρε τη συγκατάθεση της μετά την ολοκλήρωση του τρίτου κύκλου, λόγω εμφάνισης εξανθήματος στοματίτιδας και διάρροιας όλες οι παρενέργειες βαθμού II).

Πίνακας 14: Συνολικός αριθμός CTCs και HER2-θετικών CTCs κατά τη διάρκεια της χορήγησης του lapatinib και έκβαση των ασθενών. Οι αναγραφόμενοι αριθμοί αντιστοιχούν στους αριθμούς πριν την έναρξη της θεραπείας μέχρι και μετά την ολοκλήρωση του 8^{ου} κύκλου.

Pt no	**Baseline**		**Post-1st**		**Post-2nd**		**Post-3rd**		**Post-4th**		**Post-5th**		**Post-6th**		**Post-7th**		**Post-8th**		**Best response (cycles on Tx)**
	CTC counts																		
	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	
1	133	125	551	542	2	2	46	46											PD (3)
2	201	201	281	281															PD (1)
3	107	107	3	3	33	32	95	95											PD (3)
4	37	37	0	0	MV	MV													PD (2)
5	53	53	53	53	0	0	0	0	0	0	21	21	0	0	4	4			SD (7)
6	617	617	107	107	0	0	230	230											PD (3)
7	31	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	18	60	60			SD (7)
8	170	170	30	30	5	3	872	872	1	1	0	0	252	250	23	23	1	1	SD (27, ongoing)
9	178	178	0	0	2	2	1	1											PD (3)
10	10	10	MV	MV	0	0	0	0	0	0	MV	MV	314	314	67	67	0	0	SD (10)
11	105	105	509	500	0	0	MV	MV	0	0	0	0	21	21	206	206			SD (7)
12	183	183	1	1	0	0	22	22	0	0	4	4	447	431	127	59	5	5	SD (15)
13	292	292	0	0	68	68	4	4	991	991	0	0	1	1					SD (6)
14	1	`1	0	0	78	78	122	121											PD (3)
15	130	130	0	0	64	64													PD (2)
16	11	11	121	121	175	175													SD (2)
17	321	321	420	420	513	513													PD (2)
18	406	406	398	223	0	0	MV	MV											PD (3)
19	160	136	0	0	0	0	MV	MV	107	97	MV	MV							SD (5)
20	507	305	0	0	59	47	3	1											SD (3)
21	31	25	0	0	4	4	6	3	702	471	3	1							SD (5)

MV: missing value: δεν υπάρχει μέτρηση. Αριθμός των CTCs/ 10^6 PBMCs
PD: Πρόοδος νόσου; SD: Σταθεροποίηση της νόσου; PR: Μερική ύφεση της νόσου

Πίνακας 15 : Τοξικότητα κατά τη χορήγηση του lapatinib που αφορά όλες τις ασθενείς (n=22) και όλους τους κύκλους θεραπείας .

	Βαθμός I		**Βαθμός II**		**Βαθμός III**		**Βαθμός IV**	
	Αριθμ. Ασθενών	**%**	**Αριθμ. ασθενών**	**%**	**Αριθμ. Ασθενών**	**%**	**Αριθμ. Ασθενών**	**%**
Διάρροια	8	36.4	3	13.6	1	4.5	-	-
Κόπωση	8	36.4	2	9.0	-	-	-	-
Εξάνθημα	5	22.7	2	9.0	-	-	-	-
Βλεννογονίτιδα	3	13.6	1	4.5	1	4.5	-	-
Ναυτία/έμετοι	5	22.7	1	4.5	-	-	-	-
Παρωνυχία	4	18.2	-	-	-	-	-	-
Επίσταξη	4	18.2	-	-	-	-	-	-

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Συνεχώς αυξάνονται τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα CTCs αποτελούν προγνωστικό και προβλεπτικό εργαλείο σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Πράγματι, χρησιμοποιώντας το σύστημα CellSearch έχει δειχθεί ότι αυξημένος αριθμός CTCs πριν και μετά από ένα κύκλο συστηματικής θεραπείας για μεταστατική νόσο ή σε όποια χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της θεραπείας, συσχετίζεται με βραχύτερες διάμεσες PFS και OS αντιπροσωπεύοντας ένα πρώιμο και αξιόπιστο δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία συγκριτικά με τις απεικονιστικές μεθόδους. Επιπροσθέτως, διαδοχικές μετρήσεις των CTCs συσχετίζονταν με την απεικονιστική αξιολόγηση και την ακρίβεια πρόβλεψης προόδου νόσου.[159] Η επιβίωση των CTCs μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας και/ή ορμονοθεραπείας ερμηνεύεται σαν αντίσταση σε αυτές τις θεραπευτικές προσεγγίσεις και συσχετίζεται με δυσμενή κλινική έκβαση.[138, 146, 203] Επομένως, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να καθοριστούν νέοι θεραπευτικοί στόχοι για τη θεραπεία των ασθενών με CTCs ανθεκτικά στη θεραπεία. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs είναι σημαντικός γιατί μπορεί να καθοδηγήσει την επιλογή στοχευμένων θεραπειών. Στη παρούσα διατριβή διερευνήθηκε αν το gefitinib, ένας εκλεκτικός αναστολέας του EGFR καθώς και το lapatinib διπλός αναστολέας του EGFR και HER-2 θα μπορούσαν να εκριζώσουν τα CK-19 θετικά CTCs που ανιχνεύονταν μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού.

Είναι γνωστό ότι υπάρχει σημαντική ασυμφωνία μεταξύ του μοριακού προφίλ στον πρωτοπαθή όγκο και στις μεταστάσεις [210, 211] όπως και μεταξύ των CTCs και του πρωτοπαθούς όγκου [80, 92, 94, 97, 212] γεννώντας την αμφιβολία αν η θεραπεία θα πρέπει να χορηγείται με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου. Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι η ενίσχυση του HER-2 αποκτάται κατά τη διάρκεια προόδου της νόσου του καρκίνου του μαστού, [97] ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει σημαντικές διαφορές μεταξύ της έκφρασης του HER-2 στα CTCs και στον πρωτοπαθή όγκο.[92, 94,

212] Από την άλλη πλευρά, όλο και περισσότερο τα CTCs θεωρούνται ως «υγρή βιοψία » του όγκου κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας αίματος, ενώ η ανίχνευση HER2-θετικών CTCs έχει συσχετιστεί με δυσμενή κλινική έκβαση σε πρώιμο καρκίνο του μαστού.[79, 99, 202] Η ομάδα μας έχει δείξει σε προηγούμενες μελέτες τη δραστικότητα του trastuzumab στη μείωση του αριθμού των CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που είχαν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία και είχαν ανθεκτικά στη θεραπεία CTCs.[103] Επίσης, η παρούσα διατριβή βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας η οποία απέδειξε ότι στα CTCs εκφράζονται φωσφωρυλιωμένες πρωτεϊνες του EGFR μονοπατιού (EGFR, PI3K, AkT), και μάλιστα ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού ενέχεται στο μεταστατικό δυναμικό των CTCs.[74]

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής η χορήγηση του gefitinib συσχετίστηκε με πρώιμη και σημαντική μείωση του αριθμού των CTCs σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ασθενών. Επιπλέον, η εμμένουσα μείωση του αριθμού των CTCs συσχετίστηκε με ευνοϊκότερη κλινική έκβαση. Παρά την εξατομικευμένη διακύμανση της συχνότητας ανίχνευσης EGFR-θετικών CTCs, διαπιστώθηκαν όμοια αποτελέσματα, όταν η ομάδα των ασθενών με γνωστή έκφραση EGFR στα CTCs αναλύθηκε ξεχωριστά. Είναι ενδιαφέρον ότι οι υποπληθυσμοί των EGFR-θετικών και EGFR-αρνητικών CTCs παρουσίασαν συγκρίσιμη ελάττωση του ποσοστού τους κατά τη διάρκεια θεραπείας με gefitinib αν και η επίδραση του φαρμάκου ήταν πιο εμφανής και εμμένουσα στα EGFR-θετικά CTCs. Η μείωση του αριθμού των EGFR-αρνητικών CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας με gefitinib φαίνεται ανεξήγητη, αλλά ίσως να μπορούσε κανείς να την ερμηνεύσει, με τη παραδοχή ότι, πιθανώς να υπάρχει χαμηλή αλλά μη ανιχνεύσιμη με τον ανοσοφθορισμό έκφραση του EGFR, ικανή ώστε να ενεργοποιήσει τον ετεροδιμερισμό με τον HER-2 υποδοχέα. Πράγματι, κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού με χαμηλά επίπεδα έκφρασης του EGFR είναι ευαίσθητες στο gefitinib, αν

συνεκφράζουν υψηλά επίπεδα του HER-2 και αυτή η επίδραση, ως ένα βαθμό, εξηγείται από το γεγονός ότι το gefitinib επάγει την ελάττωση της φωσφωρυλίωσης του ετεροδιμερισμένου HER1/HER2.[186, 213, 214] Στις ασθενείς που έλαβαν gefitinib δεν έγινε έλεγχος για συνέκφραση του EGFR και HER-2 στα CTCs, όμως, η ομάδα μας έχει δείξει ότι 44% και 63% των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού έχει ανιχνεύσιμα EGFR-θετικά και HER-2-θετικά CTCs, αντίστοιχα. Επιπλέον, έχει δειχθεί με πειράματα τριπλής χρώσης η συνέκφραση των EGFR και HER-2 στα ίδια CTCs.[74] Έτσι, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το gefitinib είναι δραστικό ακόμα και σε CTCs με χαμηλή αλλά μη ανιχνεύσιμη με ανοσοφθορισμό έκφραση του EGFR εφόσον αυτά εκφράζουν HER-2.

Η παρακολούθηση της κινητικής των EGFR-θετικών και EGFR-αρνητικών υποπληθυσμών των CTCs έδειξε μια τάση ανόδου του αριθμού τους στο τέλος του 3^{ου} κύκλου της θεραπείας και, κυρίως, αυτό αφορούσε τα EGFR-αρνητικά CTCs ενώ στα EGFR-θετικά CTCs παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση του αριθμού τους. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι αυξάνονται τα EGFR- αρνητικά κύτταρα τα οποία είναι ανθεκτικά στη θεραπεία με gefitinib. Βέβαια δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα εξαιτίας του μικρού αριθμού των ασθενών και αυτή η παρατήρηση χρειάζεται επιβεβαίωση σε μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Η μεταβολή του αριθμού των EGFR-θετικών και EGFR-αρνητικών CTCs φαίνεται να συσχετίζεται με τη κλινική έκβαση και, έτσι, αξίζει να παρακολουθείται. Πράγματι, δύο κύριες ομάδες ασθενών μπορούν να διακριθούν. Στην πρώτη παρατηρείται σαφής μείωση του αριθμού και των δύο υποπληθυσμών των CTCs μετά το τέλος του πρώτου κύκλου, και η μείωση αυτή διατηρείται και μετά τους επόμενους δύο κύκλους. Δύο από τις 5 ασθενείς αυτής της ομάδας παρουσίασαν αυξημένο PFS 16 και 19 μηνών και μάλιστα αυτό συσχετίστηκε με μεγάλης διάρκειας αντικειμενικής ανταπόκρισης της νόσου στη μία ασθενή, ενώ στη

δεύτερη με σταθεροποίηση της νόσου. Αντίθετα, στη δεύτερη ομάδα παρατηρείται μία πρώιμη αύξηση των EGFR(+) και EGFR(-) υποπληθυσμών των CTCs (πίνακας 12) και αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι τα EGFR(-) CTCs είναι ανθεκτικά στο gefitinib. Σε αυτή την ομάδα, 2 από τις 3 ασθενείς με αύξηση του αριθμού των CTCs εμφάνισαν πρόοδο της νόσου τους.

Επομένως, η παρατεταμένη ελάττωση του αριθμού των EGFR(+) και EGFR(-) CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας με gefitinib θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη δραστικότητας της θεραπείας και ελέγχου της νόσου ενισχύοντας έτσι την υπόθεση της αξίας των CTCs ως δείκτη παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Αν και αυτά τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα δε θα πρέπει να ξεχνάμε ότι η μελέτη αφορά μικρό αριθμό ασθενών και έτσι τα συμπεράσματα θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή, δεδομένου ότι δεν υπήρχε παράλληλη ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η ανίχνευση των CTCs δεν επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του CellSearch που είναι η μόνη εγκεκριμένη μέθοδος για την ανίχνευση των CTCs στο μεταστατικό καρκίνο μαστού. Όμως τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs θα μπορούσε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την επιλογή στοχευμένων θεραπειών στον καρκίνο του μαστού. Πράγματι έχει δειχθεί ότι η χορήγηση του trastuzumab συσχετίζεται με την εκρίζωση των HER-2 θετικών CTCs σε προθεραπευμένες ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού.[103] Επιπλέον, μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II έδειξε ότι σε ασθενείς με HER2 (-) καρκίνο μαστού αρχικού σταδίου με CK-19 mRNA-θετικά CTCs ανιχνεύσιμα πριν και μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής χημειοθεραπείας, η χορήγηση του trastuzumab συσχετίστηκε με σημαντικά χαμηλότερη επίπτωση κλινικών υποτροπών και μεγαλύτερο DFS συγκριτικά με τις ασθενείς που έλαβαν μόνο τη καθιερωμένη θεραπεία.[104] Σε δύο μικρές μελέτες φάσης II χορηγήθηκε lapatinib σε ασθενείς με HER-2 αρνητικό μεταστατικό καρκίνο μαστού και HER-2-θετικά

ή EGFR-θετικά CTCs.[215, 216] Στη μελέτη των Stebbing J και συν. εντάχθηκαν ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού HER-2 (-) αλλά με EGFR–θετικά CTCs. Από τις 43 ασθενείς που ελέγχθηκαν 16 είχαν EGFR–θετικά CTCs, δηλαδή ποσοστό 37% και ενάχθηκαν στη μελέτη. Δύο ασθενείς απέσυραν τη συγκατάθεση λόγω τοξικότητας και συγκεκριμένα λόγω διάρροιας βαθμού III, και έτσι 14 ασθενείς αξιολογήθηκαν. Έξι από τις 14 ασθενείς παρουσίασαν μειωμένο αριθμό CTCs μετά από ένα κύκλο lapatinib και, μάλιστα, η μείωση αφορούσε κυρίως τα EGFR (+) CTCs. Σε 7 από τις 8 ασθενείς που παρουσίασαν αύξηση των CTCs μετά τον 1° κύκλο θεραπείας υπήρχε αύξηση κυρίως των EGFR (+) CTCs. Όμως, παρά τη στοχευμένη θεραπεία δεν καταγράφηκε καμία αντικειμενική ανταπόκριση και μάλιστα οι ασθενείς παρουσίασαν πρόοδο της νόσου τους, εντός 12 εβδομάδων από την ένταξη τους, και έτσι η μελέτη έκλεισε χωρίς να ενταχθούν επιπλέον ασθενείς όπως ήταν αρχικά προγραμματισμένο. Στη μελέτη των Pestin και συν. ένα ποσοστό 7% των μεταστατικών ασθενών με HER-2 αρνητικούς καρκίνους μαστού που ελέγχθηκαν, είχαν HER-2 θετικά CTCs και έλαβαν lapatinib. Δεν καταγράφηκαν αντικειμενικές ανταποκρίσεις στις ασθενείς που έλαβαν lapatinib παρά μόνο σταθεροποίηση της νόσου σε μία ασθενή διάρκειας 8,5 μηνών. Η μελέτη DETECT III είναι σαφώς η μεγαλύτερη μελέτη που ασχολείται με το ερώτημα αν η στόχευση των CTCs με βάση τον μοριακό τους φαινότυπο είναι αποτελεσματική. Σε αυτή τη μελέτη, ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού HER-2 αρνητικό και HER-2 θετικά CTCs τυχαιοποιούνται στο να λάβουν ή όχι lapatinib σε συνδυασμό με τη καθιερωμένη θεραπεία για τη νόσο τους και εξετάζεται η δραστικότητα μιας θεραπείας που στοχεύει τον HER-2 υποδοχέα στα CTCs καθώς και η σημασία του αριθμού των CTCs ως δείκτη πρώιμης ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Στην παρούσα διατριβή διαπιστώθηκε ότι το lapatinib φαίνεται να μειώνει τα HER-2 θετικά κύτταρα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού ανεξάρτητα από την

έκφραση του HER-2 στον πρωτοπαθή όγκο. Η μείωση του αριθμού των HER-2 θετικών CTCs ήταν μια πρώιμη επίδραση της θεραπείας με lapatinib δεδομένου ότι μέχρι το τέλος του πρώτου κύκλου θεραπείας παρατηρήθηκε μια μείωση σε 14 ασθενείς (66,7%), ενώ ο διάμεσος χρόνος μέχρι το ναδίρ ήταν 1 μήνας (εύρος, 1-5 μήνες). Ο αριθμός των HER2-θετικών CTCs που ανιχνεύθηκε σε ολόκληρη την ομάδα ασθενών ήταν επίσης σημαντικά μικρότερος μετά το τέλος του δεύτερου κύκλου θεραπείας. Η επίδραση αυτή ήταν ειδική για το HER2-θετικό πληθυσμό των CTCs, δεδομένου ότι ο αριθμός των HER2-αρνητικών CTCs δεν επηρεάστηκε από τη θεραπεία. Όταν η κινητική των CTCs αξιολογήθηκε χωριστά στις ασθενείς με σταθεροποίηση της νόσου και σε ασθενείς με πρόοδο νόσου, φάνηκε ότι ο αριθμός των HER-2 θετικών CTCs μειώθηκε σημαντικά μόνο στις ασθενείς με σταθερή νόσο. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η σταθεροποίηση της νόσου θα μπορούσε να σχετίζεται με την εξάλειψη του HER2-θετικού πληθυσμού των CTCs.

Η παρακολούθηση των μοριακών αλλαγών στα CTCs κατά τη διάρκεια της θεραπείας με παράγοντες στόχευσης παρέχει τη μοναδική ευκαιρία να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντοχής στο συγκεκριμένο φάρμακο.[217] Στη παρούσα μελέτη, η ομάδα των HER-2 θετικών CTCs ήταν αριθμητικά μικρότερη στα δείγματα που λαμβάνονται κατά τη πρόοδο της νόσου συγκριτικά με το δείγμα πριν την έναρξη της θεραπείας, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ ο πληθυσμός των HER-2 αρνητικών CTCs αυξήθηκε στη πρόοδο της νόσου. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν την εμφάνιση ανθεκτικών HER-2- θετικών και των HER- 2 αρνητικών CTCs που ενδεχομένως, συνδέονται με την εξέλιξη της νόσου.

Όταν η έκφραση του EGFR αξιολογήθηκε στις ίδιες χρονικές στιγμές, δείχθηκε ότι περισσότεροι ασθενείς είχαν EGFR-θετικά CTCs στη πρόοδο της νόσου σε σύγκριση με το δείγμα πριν τη θεραπεία με lapatinib και η διαφορά αυτή είχε μια τάση για στατιστική σημαντικότητα. Επιπλέον, το ποσοστό των EGFR-θετικών CTCs ανά ασθενή, καθώς και η

αναλογία των EGFR-θετικών CTCs στο σύνολο των CTCs που ανιχνεύθηκαν, αυξήθηκε στο δείγμα που λήφθηκε στο τέλος της θεραπείας. Έχει δειχθεί ότι το lapatinib στερείται αποτελεσματικότητας σε HER -2 αρνητικό φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού με υπερέκφραση του EGFR.[218] Στη μελέτη μας, ο πληθυσμός των HER2-αρνητικών CTCs αυξήθηκε στα δείγματα αίματος που ελήφθησαν στην πρόοδο της νόσου. Έτσι, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα EGFR-θετικά/HER2-αρνητικά CTCs πιθανώς να συμβάλλουν στην αντίσταση στο lapatinib.

Δεν παρατηρήθηκαν αντικειμενικές ανταποκρίσεις στην ομάδα των ασθενών που έλαβε lapatinib. Ωστόσο, σταθεροποίηση της νόσου και / ή σταθεροποίηση του αριθμού των CTCs διάρκειας 6-27 μηνών ήταν εμφανής σε 7 από 21 ασθενείς.

Ομοίως, το lapatinib απέτυχε στο να επάγει ανταποκρίσεις σε ασθενείς με HER-2 αρνητικό μεταστατικό καρκίνο του μαστού και HER-2 θετικά [216] ή EGFR-θετικά CTCs. Ωστόσο σε αυτή τη μελέτη, σε 1 από τις 7 ασθενείς με HER2-θετικά CTCs παρατηρήθηκε σταθεροποίηση της νόσου διάρκειας 8.5 μηνών.[216] Σε αυτές τις μελέτες, το lapatinib χορηγήθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και πρόοδο νόσου μετά από προηγούμενη θεραπεία. Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός των CTCs έγινε με χρώση ανοσοφθορισμού για HER-2 ή EGFR χρησιμοποιώντας το τέταρτο εφεδρικό φίλτρο του CellSearch συστήματος.

Στη μελέτη μας αποδεικνύεται η σκοπιμότητα της στόχευσης CTCs τα οποία είναι ανθεκτικά σε προηγούμενη θεραπεία σε ασθενείς που η νόσος τους δεν είναι σε πρόοδο χρησιμοποιώντας CTC-κατευθυνόμενη προσέγγιση ως θεραπεία συντήρησης. Επιπλέον, ο HER-2 χαρακτηρισμός έγινε στα CTCs που απομονώθηκαν μετά από φυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας (density gradient centrifugation) του περιφερικού αίματος και δεν αφορούν μόνο EpCAM-θετικά CTCs.

Ένας περιορισμός της μελέτης μας είναι ότι η HER-2-θετικότητα και EGFR-

θετικότητα δεν μετρήθηκαν ποσοτικά. Η έκφραση των HER-2 και EGFR χαρακτηριζόταν υποκειμενικά ως θετική ή αρνητική ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται στον αρνητικό μάρτυρα. Επιπλέον, η κατώτερη τιμή (cut-off) για την επιλεξιμότητα της ασθενούς αυθαίρετα ορίστηκε η ανίχνευση τουλάχιστον ενός HER-2 θετικού ή EGFR θετικού CTC. Επίσης, η παρατηρούμενη επίδραση του lapatinib στα CTCs, δεν συνεπάγεται κατ' ανάγκη, ότι το φάρμακο είναι επίσης κλινικά αποτελεσματικό, αφού θα μπορούσε να αμφισβητηθεί ότι τα CTCs αποτελούν υποκατάστατο δείκτη της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου. Πράγματι, η διαφορετική κινητική των CTCs στις ασθενείς με πρόοδο της νόσου σε σύγκριση με εκείνες με σταθεροποίηση της νόσου δεν πρέπει αναγκαστικά να αποδοθεί στο lapatinib, αλλά θα μπορούσε απλώς να αντανακλά τη φυσική πορεία της νόσου δεδομένου, ότι οι ασθενείς είχαν σταθεροποίηση της νόσου τους, κατά την ένταξη τους στη μελέτη.

Η αποτυχία του lapatinib να επάγει κλινικές αποκρίσεις στη παρούσα ή άλλες μελέτες [215, 216] που σχεδιάστηκαν για να στοχεύσουν ένα δείκτη που υπάρχει στα CTCs και όχι απαραίτητα στον πρωτοπαθή όγκο, δεν πρέπει να θεωρείται ως μια αποτυχία αυτής της στρατηγικής. Έχουμε δείξει στο παρελθόν ότι η χορήγηση 6 κύκλων trastuzumab σε ασθενείς με HER2-αρνητικό καρκίνο του μαστού αρχικού σταδίου με παρουσία CK-19mRNA θετικών CTCs τόσο πριν όσο και μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, συσχετίστηκε με σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης κλινικών υποτροπών και μεγαλύτερο DFS (ελεύθερη νόσου επιβίωση) σε σύγκριση με τις ασθενείς που έλαβαν τη συνήθη θεραπεία.[104] Μεγαλύτερες μελέτες, όπως η μελέτη TREAT CTC σε πρώιμο καρκίνο του μαστού και η DETECT III σε μεταστατική νόσο, θα εξετάσουν περαιτέρω κατά πόσον η εξατομίκευση της θεραπείας ανάλογα με τα μοριακά χαρακτηριστικά των CTCs θα μπορούσε να είναι μια νέα στρατηγική, αλλάζοντας τη θεραπευτική προσέγγιση στον καρκίνο του μαστού.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα αυτής της πιλοτικής μελέτης φαίνεται ότι είναι εφικτή η απομόνωση και ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs για τον καθορισμό του φαινότυπου των καρκινικών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο. Επιπλέον, φαίνεται ότι η προσαρμογή της θεραπείας σύμφωνα με τους στόχους που παρουσιάζονται στα CTCs μπορεί να είναι κλινικά χρήσιμη σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Πριν αυτό όμως γίνει αποδεκτό θα πρέπει να θεσπιστούν τυποποιημένες δοκιμασίες με επικυρωμένες κατώτερες τιμές (cut-offs) για να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες χορήγησης εξατομικευμένης θεραπείας μεγαλύτερου αριθμού ασθενών που θα καταδείξουν την αξία της θεραπευτικής στόχευσης των CTCs.

Βιβλιογραφία

1. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000. National Cancer Institute. Bethesda, MD 2005.
2. 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: 1687-1717.
3. Kiely BE, Soon YY, Tattersall MH, Stockler MR. How long have I got? Estimating typical, best-case, and worst-case scenarios for patients starting first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: a systematic review of recent randomized trials. J Clin Oncol 2011; 29: 456-463.
4. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL et al. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. J Clin Oncol 1996; 14: 2197-2205.
5. Gennari A, Conte P, Rosso R et al. Survival of metastatic breast carcinoma patients over a 20-year period: a retrospective analysis based on individual patient data from six consecutive studies. Cancer 2005; 104: 1742-1750.
6. Dafni U, Grimani I, Xyrafas A et al. Fifteen-year trends in metastatic breast cancer survival in Greece. Breast Cancer Res Treat 2010; 119: 621-631.
7. Chia SK, Speers CH, D'Yachkova Y et al. The impact of new chemotherapeutic and hormone agents on survival in a population-based cohort of women with metastatic breast cancer. Cancer 2007; 110: 973-979.
8. Giordano SH, Buzdar AU, Smith TL et al. Is breast cancer survival improving? Cancer 2004; 100: 44-52.
9. Gerber B, Krause A, Muller H 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: 960-971.
10. Stuart-Harris R, Shadbolt B, Palmqvist C, Chaudri Ross HA. The prognostic significance of single hormone receptor positive metastatic breast cancer: an analysis of three randomised phase III trials of aromatase inhibitors. Breast 2009; 18: 351-355.
11. Clark GM, Sledge GW, Jr., Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients.

J Clin Oncol 1987; 5: 55-61.

12. Emi Y, Kitamura K, Shikada Y et al. Metastatic breast cancer with HER2/neu-positive cells tends to have a morbid prognosis. Surgery 2002; 131: S217-221.
13. Ismail-Khan R, Bui MM. A review of triple-negative breast cancer. Cancer Control 2010; 17: 173-176.
14. Swenerton KD, Legha SS, Smith T et al. Prognostic factors in metastatic breast cancer treated with combination chemotherapy. Cancer Res 1979; 39: 1552-1562.
15. Hortobagyi GN, Smith TL, Legha SS et al. Multivariate analysis of prognostic factors in metastatic breast cancer. J Clin Oncol 1983; 1: 776-786.
16. Harris JR, Hellman S. Observations on survival curve analysis with particular reference to breast cancer treatment. Cancer 1986; 57: 925-928.
17. Robertson JF, Dixon AR, Nicholson RI et al. Confirmation of a prognostic index for patients with metastatic breast cancer treated by endocrine therapy. Breast Cancer Res Treat 1992; 22: 221-227.
18. Yamamoto N, Watanabe T, Katsumata N et al. Construction and validation of a practical prognostic index for patients with metastatic breast cancer. J Clin Oncol 1998; 16: 2401-2408.
19. Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, 3rd, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. Cancer 1980; 46: 2884-2888.
20. Bloom ND, Tobin EH, Schreibman B, Degenshein GA. The role of progesterone receptors in the management of advanced breast cancer. Cancer 1980; 45: 2992-2997.
21. Santen RJ, Manni A, Harvey H, Redmond C. Endocrine treatment of breast cancer in women. Endocr Rev 1990; 11: 221-265.
22. Epstein RJ. The clinical biology of hormone-responsive breast cancer. Cancer Treat Rev 1988; 15: 33-51.
23. Baselga J, Cortes J, Kim SB et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. N Engl J Med 2012; 366: 109-119.
24. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989; 63: 181-187.
25. Harris L, Fritsche H, Mennel R 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: 5287-5312.

26. Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clin Cancer Res 2004; 10: 6897-6904.
27. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Med J Australia 1869; 146-147.
28. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat Rev Cancer 2003; 3: 453-458.
29. Choesmel V, Pierga JY, Nos C et al. Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. Breast Cancer Res 2004; 6: R556-570.
30. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR et al. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J Clin Oncol 1994; 12: 475-482.
31. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. Eur J Cancer 1997; 33: 854-861.
32. Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. J Clin Oncol 1999; 17: 870-879.
33. Fehm T, Braun S, Muller V 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: 885-892.
34. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 1113-1124.
35. Stathopoulou A, Mavroudis D, Perraki M et al. Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers. Anticancer Res 2003; 23: 1883-1890.
36. Osborne MP, Asina S, Wong GY et al. Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: sensitivity in a model system. Cancer Res 1989; 49: 2510-2513.

37 Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB et al. Monoclonal antibodies detect occult breast

carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease. Am J Surg Pathol 1988; 12: 333-340.

38. Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R et al. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. J Clin Oncol 1992; 10: 1534-1539.
39. Thor A, Viglione MJ, Ohuchi N et al. Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow. Breast Cancer Res Treat 1988; 11: 133-145.
40. Kagan M, Howard D, Bendele T et al. A Sample Preparation and Analysis System for Identification of Circulating Tumor Cells. J Clinical Ligand Assay 2002; 25: 104-110.
41. Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN et al. A rare-cell detector for cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 10501-10504.
42. Pachmann K, Clement JH, Schneider CP et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. Clin Chem Lab Med 2005; 43: 617-627.
43. Pantel K, Otte M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. Semin Cancer Biol 2001; 11: 327-337.
44. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature 2007; 450: 1235-1239.
45. Becker S, Becker-Pergola G, Banys M et al. Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2009; 117: 227-233.
46. Smith BM, Slade MJ, English J et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. J Clin Oncol 2000; 18: 1432-1439.
47. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG et al. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. Br J Cancer 2005; 92: 906-912.
48. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. Endocr Relat Cancer 2006; 13: 1033-1067.

49. Jung R, Kruger W, Hosch S 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: 1194-1198.
50. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. Lancet Oncol 2004; 5: 79-88.
51. Zippelius A, Kufer P, Honold 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: 2701-2708.
52. Kowalewska M, Chechlinska M, Markowicz S et al. 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: 2671-2674.
53. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M 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: 1654-1659.
54. Benoy IH, Elst H, Van Dam P 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: 1082-1087.
55. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010; 15: 261-273.
56. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144: 646-674.
57. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. Science 2011; 331: 1559-1564.
58. Goss PE, Chambers AF. Does tumour dormancy offer a therapeutic target? Nat Rev Cancer 2010; 10: 871-877.
59. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer 2002; 2: 563-572.
60. Comen E, Norton L, Massague J. Clinical implications of cancer self-seeding. Nat Rev Clin Oncol 2011; 8: 369-377.
61. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. Cell 2009; 139: 1315-1326.

62. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. Nat Rev Cancer 2009; 9: 302-312.
63. Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. Cancer Metastasis Rev 2012; 31: 469-478.
64. Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. Cancer Metastasis Rev 1999; 18: 15-30.
65. Joosse SA, Hannemann J, Spotter J et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. Clin Cancer Res 2012; 18: 993-1003.
66. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107: 15449-15454.
67. Aktas B, Tewes M, Fehm T et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res 2009; 11: R46.
68. Raimondi C, Gradilone A, Naso G et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2011; 130: 449-455.
69. Gradilone A, Raimondi C, Nicolazzo C et al. Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal. J Cell Mol Med 2011; 15: 1066-1070.
70. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E et al. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res 2011; 13: R59.
71. Bednarz N, Eltze E, Semjonow A et al. BRCA1 loss preexisting in small subpopulations of prostate cancer is associated with advanced disease and metastatic spread to lymph nodes and peripheral blood. Clin Cancer Res 2010; 16: 3340-3348.
72. Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz DM. Vimentin is secreted by activated macrophages. Nat Cell Biol 2003; 5: 59-63.
73. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer.

Cancer Lett 2010; 288: 99-106.

74. Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A et al. Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients. Breast Cancer Res 2008; 10: R80.
75. Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. PLoS Biol 2009; 7: e1000121.
76. Gradilone A, Naso G, Raimondi C et al. Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. Ann Oncol 2011; 22: 86-92.
77. Riethdorf S, Muller V, Zhang L et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. Clin Cancer Res 2010; 16: 2634-2645.
78. Fehm T, Muller V, Aktas B et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. Breast Cancer Res Treat 2010; 124: 403-412.
79. Wulfing P, Borchard J, Buerger H et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. Clin Cancer Res 2006; 12: 1715-1720.
80. Munzone E, Nole F, Goldhirsch A et al. Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer. Clin Breast Cancer 2010; 10: 392-397.
81. Flores LM, Kindelberger DW, Ligon AH et al. Improving the yield of circulating tumour cells facilitates molecular characterisation and recognition of discordant HER2 amplification in breast cancer. Br J Cancer 2010; 102: 1495-1502.
82. Aktas B, Muller V, Tewes M et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor status of circulating tumor cells and the primary tumor in metastatic breast cancer patients. Gynecol Oncol 2011; 122: 356-360.
83. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clin Cancer Res 2004; 10: 8152-8162.
84. Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Slijper M et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. Breast Cancer Res 2009; 11: R39.

85. Rossi E, Basso U, Celadin R et al. M30 neoepitope expression in epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis. Clin Cancer Res 2010; 16: 5233-5243.
86. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. Clin Cancer Res 2005; 11: 3678-3685.
87. Saloustros E, Perraki M, Apostolaki S et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. Breast Cancer Res 2011; 13: R60.
88. Spiliotaki M, Mavroudis D, Kapranou K et al. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. Breast Cancer Res 2014; 16: 485.
89. Braun S, Schlimok G, Heumos I 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: 1890-1895.
90. Pantel K, Schlimok G, Braun S et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1419-1424.
91. Tewes M, Aktas B, Welt A et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. Breast Cancer Res Treat 2009; 115: 581-590.
92. Sieuwerts AM, Mostert B, Bolt-de Vries J et al. mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. Clin Cancer Res 2011; 17: 3600-3618.
93. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. PLoS One 2010; 5: e12517.
94. Ignatiadis M, Rothe F, Chaboteaux C et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. PLoS One 2011; 6: e15624.
95. Pestrin M, Bessi S, Galardi F et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2009; 118: 523-530.
96. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P et al. Biomarkers characterization of

circulating tumour cells in breast cancer patients. Breast Cancer Res 2012; 14: R71.

97. Meng S, Tripathy D, Shete S et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 9393-9398.
98. Hayashi N, Nakamura S, Tokuda Y et al. Prognostic value of HER2-positive circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. Int J Clin Oncol 2012; 17: 96-104.
99. Apostolaki S, Perraki M, Kallergi G et al. Detection of occult HER2 mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic relevance. Breast Cancer Res Treat 2009; 117: 525-534.
100. Ligthart ST, Bidard FC, Decraene C et al. Unbiased quantitative assessment of Her-2 expression of circulating tumor cells in patients with metastatic and non-metastatic breast cancer. Ann Oncol 2013; 24: 1231-1238.
101. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. Breast Cancer Res 2009; 11: R59.
102. Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2006; 98: 179-184.
103. Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M 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: 8185-8194.
104. Georgoulias V, Bozionelou V, Agelaki S et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. Ann Oncol 2012; 23: 1744-1750.
105. Rack B, Bock C, Andergassen U, Doisneau-Sixou S. Hormone receptor status, erbB2 expression and cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells in breast cancer patients. Histol Histopathol 2012; 27: 855-864.
106. Banys M, Krawczyk N, Becker S et al. The influence of removal of primary tumor on incidence and phenotype of circulating tumor cells in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2012; 132: 121-129.
107. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y et al. Phase III study of letrozole versus

tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. J Clin Oncol 2003; 21: 2101-2109.

108. Leitzel K, Lieu B, Curley E et al. Detection of cancer cells in peripheral blood of breast cancer patients using reverse transcription-polymerase chain reaction for epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res 1998; 4: 3037-3043.
109. De Luca A, Pignata S, Casamassimi A et al. Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription-PCR assay. Clin Cancer Res 2000; 6: 1439-1444.
110. Braun S, Vogl FD, Naume B et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. N Engl J Med 2005; 353: 793-802.
111. Braun S, Pantel K, Muller P 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: 525-533.
112. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD 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: 1652-1658.
113. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM et al. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. Lancet 1999; 354: 197-202.
114. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. Clin Cancer Res 2001; 7: 4102-4108.
115. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G et al. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2007; 106: 239-243.
116. Janni W, Rack B, Schindlbeck C 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: 884-891.
117. Hartkopf AD, Banys M, Meier-Stiegen F et al. The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse. Breast Cancer Res Treat 2013; 138: 509-517.
118. Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are

frequently apoptotic. Am J Pathol 2001; 159: 17-20.

119. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. Am J Pathol 1998; 153: 865-873.
120. Franken B, de Groot MR, Mastboom WJ et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. Breast Cancer Res 2012; 14: R133.
121. Molloy TJ, Bosma AJ, Baumbusch LO et al. The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients. Breast Cancer Res 2011; 13: R61.
122. Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. Ann Oncol 2010; 21: 729-733.
123. Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. Br J Cancer 2009; 101: 589-597.
124. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. Clin Cancer Res 2008; 14: 7004-7010.
125. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M 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: 3756-3762.
126. Benoy IH, Elst H, Philips M 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: 672-680.
127. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M 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: 879-887.
128. Nieto Y, Franklin WA, Jones RB et al. Prognostic significance of occult tumor cells in the apheresis products of patients with advanced breast cancer receiving high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell support. Biol Blood Marrow Transplant 2004; 10: 415-425.

129. Zach O, Kasparu H, Wagner H et al. Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients. Acta Med Austriaca Suppl 2002; 59: 32-34.
130. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D 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: 3404-3412.
131. Rack B, Schindlbeck C, Andergassen U, al. E. Prognostic relevance of circulating tumor cells in the peripheral blood of primary breast cancer patients. Presented at the 33rd annual San Antonio Breast Cancer Symposium 2010; Abstract S6-5.
132. Rack B, Schindlbeck C, Andergassen U, al. e. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. ASCO Annual Meeting 2010 2010; 28: 15s (Suppl.; Abstr. 1003).
133. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M 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: 5145-5151.
134. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25: 5194-5202.
135. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. J Clin Oncol 2009; 27: 2177-2184.
136. Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S et al. Differential effect of adjuvant taxane-based and taxane-free chemotherapy regimens on the CK-19 mRNA-positive circulating tumour cells in patients with early breast cancer. Br J Cancer 2013; 108: 549-556.
137. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. Lancet Oncol 2012; 13: 688-695.
138. Xenidis N, Markos V, Apostolaki S et al. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. Ann Oncol 2007; 18: 1623-1631.
139. Mathiesen RR, Borgen E, Renolen A et al. Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival.

Breast Cancer Res 2012; 14: R117.
140. Hall C, Krishnamurthy S, Lodhi A et al. Disseminated tumor cells predict survival after neoadjuvant therapy in primary breast cancer. Cancer 2012; 118: 342-348.
141. Serrano MJ, Rovira PS, Martinez-Zubiaurre I et al. Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy. Exp Ther Med 2012; 4: 43-48.
142. von Minckwitz G, Rezai M, Loibl S et al. Capecitabine in addition to anthracycline- and taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: phase III GeparQuattro study. J Clin Oncol 2010; 28: 2015-2023.
143. Riethdorf S, Mueller V, Mauermann O et al. Changes in Circulating Tumor and Endothelial Cells in Peripheral Blood of Patients Treated in the Neoadjuvant Chemotherapy Plus Targeted Treatment Breast Cancer Study “GeparQuinto”. Abstract PD04-06. Abstracts: Thirty-Third Annual CTRC AACR San Antonio Breast Cancer Symposium- Dec 8-12, 2010; San Antonio, TX 2010.
144. Pierga JY, Petit T, Delozier T et al. Neoadjuvant bevacizumab, trastuzumab, and chemotherapy for primary inflammatory HER2-positive breast cancer (BEVERLY-2): an open-label, single-arm phase 2 study. Lancet Oncol 2012; 13: 375-384.
145. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med 2004; 351: 781-791.
146. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2005; 23: 1420-1430.
147. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT 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: 4218-4224.
148. Androulakis N, Agelaki S, Perraki M et al. Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer. Br J Cancer 2012; 106: 1917-1925.
149. Giordano A, Giuliano M, De Laurentiis M et al. Circulating tumor cells in immunohistochemical subtypes of metastatic breast cancer: lack of prediction in HER2-positive disease treated with targeted therapy. Ann Oncol 2012; 23: 1144-1150.
150. Pierga JY, Hajage D, Bachelot T et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large

prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. Ann Oncol 2012; 23: 618-624.

151. Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I et al. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2013; 137: 503-510.
152. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. Clin Breast Cancer 2007; 7: 471-479.
153. Dawood S, Broglio K, Valero V et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? Cancer 2008; 113: 2422-2430.
154. Nole F, Munzone E, Zorzino L et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. Ann Oncol 2008; 19: 891-897.
155. Giuliano M, Giordano A, Jackson S et al. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. Breast Cancer Res 2011; 13: R67.
156. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 2006; 12: 6403-6409.
157. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. J Clin Oncol 2014; 32: 3483-3489.
158. Slade MJ, Payne R, Riethdorf S et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. Br J Cancer 2009; 100: 160-166.
159. Liu MC, Shields PG, Warren RD et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2009; 27: 5153-5159.
160. Bidard FC, Mathiot C, Degeorges A et al. Clinical value of circulating endothelial cells and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients treated first line with bevacizumab and chemotherapy. Ann Oncol 2010; 21: 1765-1771.
161. Liu Z, Fusi A, Schmittel A et al. Eradication of EGFR-positive circulating tumor cells and objective tumor response with lapatinib and capecitabine. Cancer Biol Ther

2010; 10: 860-864.

162. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. Int J Cancer 2006; 118: 2013-2019.
163. Bartkowiak K, Wieczorek M, Buck F et al. Two-dimensional differential gel electrophoresis of a cell line derived from a breast cancer micrometastasis revealed a stem/ progenitor cell protein profile. J Proteome Res 2009; 8: 2004-2014.
164. Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. Cancer 2010; 116: 3330-3337.
165. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B 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; 19: 496-500.
166. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A 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: 1392-1400.
167. Peeters DJ, Van den Eynden GG, van Dam PJ et al. Circulating tumour cells in the central and the peripheral venous compartment in patients with metastatic breast cancer. Br J Cancer 2011; 104: 1472-1477.
168. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J 2000; 19: 3159-3167.
169. Franklin WA, Veve R, Hirsch FR et al. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. Semin Oncol 2002; 29: 3-14.
170. Sedlacek HH. Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. Drugs 2000; 59: 435-476.
171. Gutteridge E, Agrawal A, Nicholson R et al. The effects of gefitinib in tamoxifen-resistant and hormone-insensitive breast cancer: a phase II study. Int J Cancer 2010; 126: 1806-1816.
172. Morris C. The role of EGFR-directed therapy in the treatment of breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2002; 75 Suppl 1: S51-55; discussion S57-59.
173. Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL et al. Epidermal growth factor receptor expression

in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. Cancer 2010; 116: 1234-1242.

174. Arpino G, Weiss H, Lee AV et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1254-1261.
175. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C et al. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2012; 136: 331-345.
176. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med 2009; 361: 947-957.
177. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2010; 11: 121-128.
178. Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naive non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). Ann Oncol 2013; 24: 54-59.
179. Ciardiello F, Caputo R, Borriello G et al. ZD1839 (IRESSA), an EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor, enhances taxane activity in bcl-2 overexpressing, multidrug-resistant MCF-7 ADR human breast cancer cells. Int J Cancer 2002; 98: 463-469.
180. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res 2000; 6: 2053-2063.
181. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res 2001; 7: 1459-1465.
182. Gee JM, Harper ME, Hutcheson IR et al. The antiepidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves antihormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. Endocrinology 2003; 144: 5105-5117.
183. Chan KC, Knox WF, Gee JM et al. Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition on epithelial proliferation in normal and premalignant

breast. Cancer Res 2002; 62: 122-128.

184. Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. Clin Cancer Res 2000; 6: 3552-3559.

185. Normanno N, Campiglio M, De LA et al. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. Ann Oncol 2002; 13: 65-72.

186. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK et al. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Res 2001; 61: 8887-8895.

187. Green MD, Francis PA, Gebski V et al. Gefitinib treatment in hormone-resistant and hormone receptor-negative advanced breast cancer. Ann Oncol 2009; 20: 1813-1817.

188. Cristofanilli M, Valero V, Mangalik A et al. Phase II, randomized trial to compare anastrozole combined with gefitinib or placebo in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 2010; 16: 1904-1914.

189. Massarweh S, Tham YL, Huang J et al. A phase II neoadjuvant trial of anastrozole, fulvestrant, and gefitinib in patients with newly diagnosed estrogen receptor positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2011; 129: 819-827.

190. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235: 177-182.

191. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353: 1673-1684.

192. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med 2001; 344: 783-792.

193. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. Endocr Relat Cancer 2001; 8: 47-61.

194. Shewchuk L, Hassell A, Wisely B et al. Binding mode of the 4-anilinoquinazoline class of protein kinase inhibitor: X-ray crystallographic studies of 4-anilinoquinazolines bound to cyclin-dependent kinase 2 and p38 kinase. J Med Chem

2000; 43: 133-138.

195. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther 2001; 1: 85-94.
196. Xia W, Mullin RJ, Keith BR et al. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. Oncogene 2002; 21: 6255-6263.
197. Zhou H. Radiosensitization of human breast cancer cells by lapatinib, a dual EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor. Proc Am Assoc Cancer Res. Abstract 4459 2003.
198. Gomez H, Chavez M, Doval D. Results from a phase II randomized study of lapatinib as first-line treatment for patients with HER2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer. . Poster presentation at the 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; 2006. [Accessed June 19, 2007]. Abstract 1090. available at: http://www.posters2view.com/sabcs06/view.php?nu=1090. 2006.
199. Cameron D, Casey M, Press M et al. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. Breast Cancer Res Treat 2008; 112: 533-543.
200. Versola M, Burris H, Jones S, al. e. Clinical activity of GW572016 in EGF10003 in patients with solid tumors. Proc Am Soc Clin Oncol 23: (abstr 3047) 2004.
201. Burris HA, 3rd. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. Oncologist 2004; 9 Suppl 3: 10-15.
202. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. Clin Cancer Res 2008; 14: 2593-2600.
203. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D 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: 849-855.
204. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. Nat Rev Clin

Oncol 2009; 6: 339-351.

205. Balic M, Rapp N, Stanzer S et al. Novel immunofluorescence protocol for multimarker assessment of putative disseminating breast cancer stem cells. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2011; 19: 33-40.
206. Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. Breast Cancer Res 2009; 11: R84.
207. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. Breast Cancer Res Treat 2009; 118: 455-468.
208. Markou A, Strati A, Malamos N et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. Clin Chem 2011; 57: 421-430.
209. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-159.
210. Simon R, Nocito A, Hubscher T et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 1141-1146.
211. Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G et al. Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. Oncologist 2008; 13: 838-844.
212. Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S et al. Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. Breast Cancer Res 2007; 9: R74.
213. Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level. J Cell Physiol 2004; 198: 259-268.
214. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. Cancer Res 2001; 61: 7184-7188.
215. Stebbing J, Payne R, Reise J et al. The efficacy of lapatinib in metastatic breast

cancer with HER2 non-amplified primary tumors and EGFR positive circulating tumor cells: a proof-of-concept study. PLoS One 2013; 8: e62543.

216. Pestrin M, Bessi S, Puglisi F et al. Final results of a multicenter phase II clinical trial evaluating the activity of single-agent lapatinib in patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells. A proof-of-concept study. Breast Cancer Res Treat 2012; 134: 283-289.
217. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. N Engl J Med 2008; 359: 366-377.
218. Johnston S, Trudeau M, Kaufman B et al. Phase II study of predictive biomarker profiles for response targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) in advanced inflammatory breast cancer with lapatinib monotherapy. J Clin Oncol 2008; 26: 1066-1072.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΝΤΩΝΙΑ ΚΑΛΥΚΑΚΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

I. ΣΠΟΥΔΕΣ – ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

Α.ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ονοματεπώνυμο	: Αντωνία Καλυκάκη
Όνομα πατέρα	: Εμμανουήλ
Όνομα μητέρας	: Ελευθερία
Τόπος / Ημερομηνία Γέννησης	: Ηράκλειο Κρήτης 17/04/1969
Οικογενειακή Κατάσταση	: Έγγαμη, μητέρα δύο παιδιών
Διεύθυνση	: Αγίας Φιλοθέης 7 Ηράκλειο, Κρήτη.
Τηλέφωνο - E-Mail	: (0030) 2810- 228653, 6946953203 akalykaki@yahoo.gr

Β. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Προ-Πανεπιστημιακή Εκπαίδευση :

1987 Αποφοίτησα από το Α΄ Λύκειο Ηρακλείου Κρήτης

Πανεπιστήμιο

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Εισαγωγή: Σεπτέμβριος 1989, μετά από εισαγωγικές εξετάσεις

Πτυχίο: Ιούνιος 1995, με βαθμό «Λίαν Καλώς».

Ειδικότητα (5ετής)

29/05/1997 – 29/01/2003 Ειδίκευση στη Γενική Παθολογία στην Α' Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Κρήτης (ΠΑ.Γ.Ν.Η.) με διευθυντή αρχικά, τον καθηγητή κ. Δ. Εμμανουήλ, και στη συνέχεια τον καθηγητή κ. Δ. Μπούμπα.

Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας: 28/05/2003

Γ. ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ

27/10/1995-15/4/1997. Διορισμός στο Κ.Υ. Περάματος, Νομού Ρεθύμνης.

ΙΙ. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Α. ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΑΠΟ ΤΗ ΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΤΥΧΙΟΥ ΜΕΧΡΙ ΤΗ ΛΗΨΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. 27/10/1995-15/04/1997 Εκπλήρωσα την υπηρεσία υπαίθρου στο Κ.Υ. Περάματος του Νομού Ρεθύμνης.

2. 29/05/1997-29/01/2003 Ειδίκευση στην Παθολογία στην Α' Παθολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η

Κατά τη διάρκεια της ειδικότητας

Εκπαίδευση για 9 μήνες στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η με Δ/ντή τον Καθηγητή κ. Β. Γεωργούλια .

Εκπαίδευση για 3 μήνες στην Καρδιολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η με Δ/ντή τον καθηγητή κ. Βάρδα, στην Αιματολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η για 3 μήνες με Δ/ντή τον καθηγητή κ. Ηλιόπουλο, στη Νεφρολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η για 3 μήνες με Δ/ντή τον αν. καθ. κ. Ν. Τσαπάρα και στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του ΠΑ.Γ.Ν.Η για 3 μήνες με Δ/ντή τον καθ. κ. Γεωργόπουλο.

Συμμετοχή στη λειτουργία του Υπερτασικού εξωτερικού ιατρείου του ΠΑ.Γ.Ν.Η (01/09/2001-29/01/2003).

Β. ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΕΤΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ

11/05/2003 – 05/10/2006

Επιστημονικός συνεργάτης με πλήρη πρωϊνή απασχόληση στην Παν/κή Παθολογική Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η με καθήκοντα Επιμελήτριας Β' υπό την άμεση επιστημονική υπευθυνότητα του Καθ. κ. Β. Γεωργούλια.

06/10/2006-28/5/2013: Επιμελήτρια Β΄Ογκολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ

29/5/2013- σήμερα: Επιμελήτρια Α΄Ογκολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ

2008- σήμερα: Υπεύθυνη Φαρμακοεπαγρύπνισης της Ελληνικής Ογκολογικής Ερευνητικής Ομάδας.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΔΗΜΟΣΙΕΥΘΕΙ ΣΕ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Mazokopakis E, Kalikaki A, Stathopoulos E, Vrentzos G, Papadakis JA. Acute febrile neutrophilic dermatosis (Sweet's syndrome) with erythema nodosum and anterior scleritis. A case report. Int J Dermatol 44(12)1051-3 2005.

2. V.Georgoulias, A.Kalykaki Clinical benefit from the combination of docetaxel plus cisplatin as first -line treatment in a patient with advanced non-small lung cancer (NSCLC). American Journal of Oncology Review. 3:627-630, 2004.

3. Papadakis JA, Mikhailidis DP, Vrentzos GE, Kalikaki A. Kazakou I, Ganotakis ES. Effect of antihypertensive treatment on plasma fibrinogen level and serum HDL levels in patient with essential hypertension. Clin. Appl Thromb Hemost. 11(2):139-46, 2005.

4. Kourousis Ch, Androulakis N. Vamvakas L, Kalykaki A, Spiridonakou S, Kentepozidis N, Saridaki Z, Xiropoulos E. Phase I study of weekly docetaxel and liposomal doxoroubicin in patients with advanced solid tumors. Oncology. 69(3): 202-207, 2005.

5. Rapti A, Agelidou A, Stergiou I, Agelidou M, Nikolakopoulos I, Varthalitis J, Kalykaki A, Chainis K, Tzanakis N, Georgoulias V,Lung Cancer Committee of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). Combination of vinorelbine plus gemcitabine in previously treated patients with small cell lung cancer: a multicenter phase II study. Lung caner ; 49(2): 241-4, 2005.

6. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A, Kakolyris S, Tsousis S, Kouroussis Ch, Vamvakas L, Kalykaki A, Samonis G, Mavroudis D, Georgoulias V. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). Br J Cancer. 2006 Mar 27;94(6):798-805.

7. Makrantonakis P, Ziotopoulos P, Agelidou A, Polyzos A, Ziras A, Chandrinos V, Vossos

A, Kalykaki A, Androulakis N, Geroyianni A, Georgoulias V; Lung Cancer Committee of the Hellenic Oncology Research Group.Vinorelbine and cisplatin combination in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer pretreated with a taxane-based regimen: a multicenter phase II study.Lung Cancer. 2006 Jul;53(1):85-90.

8. Boukovinas I, Androulakis N, Vamvakas L, Papakotoulas P, Ziras N, Polyzos A, Kalykaki A, Kotsakis A, Xenidis N, Gioulmbasanis I, Mavroudis D, Georgoulias V. Sequential gemcitabine and cisplatin followed by docetaxel as first-line treatment of advanced urothelial carcinoma: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group.Ann Oncol. 2006 Nov;17(11):1687-92.

9. Kakolyris S, Ziras N, Vamvakas L, Varthalitis J, Papakotoulas P, Syrigos K, Vardakis N, Kalykaki A, Amarantidis K, Georgoulias V. Gemcitabine plus oxaliplatin combination (GEMOX regimen) in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a multicenter phase II study.Lung Cancer. 2006 Dec;54(3):347-52.

10. Pallis AG, Christofillakis Ch, Tselepatiotis E, Agelaki S, Vamvakas L, Souglakos J, Vardakis N, Kalykaki A, Kotsakis A, Argiraki A, Mavroudis D, Georgoulias V. Sequential administration of docetaxel followed by maintenance gefitinib, as salvage treatment in patients with advanced NSCLC: a multicenter phase II trial.Lung Cancer. 2007 Jan;55(1):101-7.

11. Souglakos J, Kalykaki A, Vamvakas L, Androulakis N, Kalbakis K, Agelaki S, Vardakis N, Tzardi M, Kotsakis AP, Gioulbasanis J, Tsetis D, Sfakiotaki G, Chatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulias V. Phase II trial of capecitabine and oxaliplatin (CAPOX) plus cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer who progressed after oxaliplatin-based chemotherapy.Ann Oncol. 2007 Feb;18(2):305-10.

12. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Bozionelou V, Agelaki S, Kanellou P, Kotsakis A, Politaki E, Kalbakis K, Kalykaki A, Vamvakas L, Georgoulias V, Mavroudis D. 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 May;18(5):851-8.

13. Emmanouilides C, Sfakiotaki G, Androulakis N, Kalbakis K, Christophylakis C, Kalykaki A, Vamvakas L, Kotsakis A, Agelaki S, Diamandidou E, Touroutoglou N, Chatzidakis A, Georgoulias V, Mavroudis D, Souglakos J. Front-line bevacizumab in combination with oxaliplatin, leucovorin and 5-fluorouracil (FOLFOX) in patients with metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II study.BMC Cancer. 2007 May 30;7:91.

14. Bozionelou V, Vamvakas L, Pappas P, Agelaki S, Androulakis N, Kalykaki A, Nikolaidou M, Kentepozidis N, Giassas S, Marselos M, Georgoulias V, Mavroudis D. A dose escalation and pharmacokinetic study of biweekly pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel and gemcitabine in patients with advanced solid tumours. Br J Cancer. 2007 Jul 2;97(1):43-9.

15. Kotsakis A, Kouroussis Ch, Androulakis N, Agelaki S, Kalbakis K, Vamvakas L, Vardakis N, Kalykaki A, Polyzos A, Georgoulias V, Mavroudis D.
A dose -escalation study of pegylated liposomal Doxorubicin and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors Oncology. 2006;71(3-4):190-6.

16. Kalykaki A, Vamvakas L, Agelaki S, Kalbakis K, Vardakis N, Sfakiotaki G, Ignatiadis M, Saridaki Z, Karampeazis A, Mavroudis D, Georgoulias V. A dose escalation study of gemcitabine plus pemetrexed administered biweekly in patients with solid tumors.Oncology. 2006;71(3-4):197-203.

17. Kalbakis K, Pappas P, Kouroussis C, Vamvakas L, Kalykaki A, Vardakis N, Nikolaidou M, Marselos M, Georgoulias V, Mavroudis D. A dose escalation and pharmacokinetic study of biweekly pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors.Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Aug;62(3):449-56.

18. Saridaki Z, Bozionelou V, Kentepozidis N, Kotsakis A, Vardakis N, Kalykaki A, Gioulbasanis I, Karampeazis A, Vamvakas L, Georgoulias V, Mavroudis D. A dose escalation study of the biweekly administration of paclitaxel, oxaliplatin and capecitabine

in patients with advanced solid tumors.Oncology. 2007;72(1-2):45-50.

19. Kalykaki A, Papakotoulas P, Tsousis S, Boukovinas I, Kalbakis K, Vamvakas L, Kotsakis A, Vardakis N, Papadopoulou P, Georgoulias V, Mavroudis D; Hellenic Oncology Research Group.Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) in pretreated patients with advanced ovarian cancer: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group (HORG).Anticancer Res. 2008 Jan-Feb;28(1B):495-500.

20. Pallis AG, Agelaki S, Kakolyris S, Kotsakis A, Kalykaki A, Vardakis N, Papakotoulas P, Agelidou A, Geroyianni A, Agelidou M, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulias V; Hellenic Oncology Research Group (HORG). Chemotherapy-induced neutropenia as a prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with front-line docetaxel-gemcitabine chemotherapy.Lung Cancer. 2008 Dec;62(3):356-63.

21. Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, Georgoulias V.Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients.Breast Cancer Res. 2008;10(5):R80.

22. Apostolaki S, Perraki M, Kallergi G, Kafousi M, Papadopoulos S, Kotsakis A, Pallis A, Xenidis N, Kalmanti L, Kalbakis K, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Stathopoulos E, Georgoulias V, Mavroudis D.Detection of occult HER2 mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic relevance.Breast Cancer Res Treat. 2009 Oct;117(3):525-34.

23. Gioulbasanis I, Saridaki Z, Kalykaki A, Vamvakas L, Kalbakis K, Ignatiadis M, Amarantidis K, Kakolyris S, Georgoulias V, Mavroudis D.Gefitinib in combination with gemcitabine and vinorelbine in patients with metastatic breast cancer pre-treated with taxane and anthracycline chemotherapy: a phase I/II trial.Anticancer Res. 2008 Sep-Oct;28(5B):3019-25.

24. Kouroussis C, Vamvakas L, Vardakis N, Kotsakis A, Kalykaki A, Kalbakis K, Saridaki Z, Kentepozidis N, Giassas S, Georgoulias V. Continuous administration of daily low-dose temozolomide in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer: a phase II

study.Oncology. 2009;76(2):112-7.

25. Bozionelou V, Kalbakis K, Vamvakas L, Agelaki S, Androulakis N, Kalykaki A, Georgoulias V, Mavroudis D. A phase I trial of gemcitabine, docetaxel and carboplatin administered every 2 weeks as first line treatment in patients with advanced breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2009 Sep;64(4):785-91.

26. Xenidis N, Kotsakis A, Kalykaki A, Christophyllakis C, Giassas S, Kentepozidis N, Polyzos A, Chelis L, Vardakis N, Vamvakas L, Georgoulias V, Kakolyris S.Etoposide plus cisplatin followed by concurrent chemo-radiotherapy and irinotecan plus cisplatin for patients with limited-stage small cell lung cancer: A multicenter phase II study.Lung Cancer. 2010 Jun;68(3):450-4

27. Saloustros E, Kalbakis K, Vardakis N, Kalykaki A, Milaki G, Rovithi M, Agelaki S, Saridaki Z, Georgoulias V, Mavroudis D. Metronomic vinorelbine plus bevacizumab as salvage therapy for patients with metastatic breast cancer. J BUON. 2011 Apr-Jun;16(2):215-8.

28. Rovithi M, Pallis AG, Kalykaki A, Lagoudaki E, Giannikaki L, Stathopoulos EN, Relakis K, Georgoulias V. Small cell ovarian cancer in adolescents: report of two cases and review of the literature. Case Report Med. 2011;2011:749516.

29. Saloustros E, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Kalbakis K, Agelaki S, Kalykaki A, Georgoulias V, Mavroudis D. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. Breast Cancer Res. 2011 Jun 10;13(3):R60.

30. Pallis AG, Karampeazis A, Vamvakas L, Vardakis N, Kotsakis A, Bozionelou V, Kalykaki A, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulias V. Efficacy and treatment tolerance in older patients with NSCLC: a meta-analysis of five phase III randomized trials conducted by the Hellenic Oncology Research Group. Ann Oncol. 2011 Nov;22(11):2448-55.

31. Kotsakis A, Agelaki S, Vardakis N, Stathopoulos G, Vamvakas L, Kalykaki A, Kentepozidis N, Kontopodis E, Sfakiotaki G, Mavroudis D, Georgoulias V. A dose-escalation study of pemetrexed and docetaxel in non-small-cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Aug;68(2):415-22.

32. Kotsakis A, Hatzidaki D, Vamvakas L, Vardakis N, Kalykaki A, Bozionelou V, Androulakis N, Kalbakis K, Saridaki Z, Georgoulias V, Agelaki S. A retrospective analysis of non-platinum-based first- and second-line chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Anticancer Res. 2010 Oct;30(10):4335-42.

33. Polyzos A, Kalbakis K, Kentepozidis N, Giassas S, Kalykaki A, Vardakis N, Bozionelou V, Saloustros E, Kontopodis E, Georgoulias V, Mavroudis D. Salvage treatment in metastatic breast cancer with weekly paclitaxel and bevasizumabCance.r Chemother Pharmacol. 2011 Jul;68(1):217-23.

34. Karachaliou N, Polyzos A, Kentepozidis N, Kakolyris S, Ziras N, Vardakis N, Kalykaki A, Milaki G, Georgoulias V, Androulakis N. A multicenter phase II trial with irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment for inoperable/metastatic cancer of the biliary tract. Oncology. 2010;78(5-6):356-60.

35. Kentepozidis N, Soultati A, Giassas S, Vardakis N, Kalykaki A, Kotsakis A, Papadimitraki E, Pantazopoulos N, Bozionellou V, Georgoulias V. Paclitaxel in combination with carboplatin as salvage treatment in patients with castration-resistant prostate cancer: a Hellenic oncology research group multicenter phase II study.Cancer Chemother Pharmacol. 2012 Jul;70(1):161-8

36. Karachaliou N, Ziras N, Syrigos K, Tryfonidis K, Papadimitraki E, Kontopodis E, Bozionelou V,Kalykaki A, Georgoulias V, Mavroudis D. A multicenter phase II trial of docetaxel and capecitabine as salvage treatment in anthracycline- and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2012 Jul;70(1):169-76.

37. Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Agelaki S, Kalbakis K, Vardakis N, Kalykaki A, Xyrafas A, Kakolyris S, Mavroudis D, Georgoulias V. Differential effect of adjuvant taxane-based and taxane-free chemotherapy regimens on the CK-19 mRNA-positive circulating tumour cells in patients with early breast cancer. Br J Cancer. 2013 Feb 19;108(3):549-56

38. Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Papadaki C, Voutsina A, Kalykaki A, Messaritakis I, Mpananis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulias V, Souglakos J. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. PLoS One. 2013 Dec 18;8(12):e84604.

39. Kalykaki A, Agelaki S, Kallergi G, Xyrafas A, Mavroudis D, Georgoulias V.Elimination of EGFR-expressing circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer treated with gefitinib. Cancer Chemother Pharmacol. 2014 Apr;73(4):685-93

40. Koinis F, Polyzos A, Christopoulou A, Zafeiriou Z, Emmanouilidis C, Papadimitraki E, Kalykaki A, Kalbakis K, Samonis G, Georgoulias V. Salvage chemotherapy with docetaxel and pegylated liposomal doxorubicin in pretreated patients with platinum- and taxane-sensitive ovarian cancer: a multicenter phase II trial of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). Cancer Chemother Pharmacol. 2014 Apr;73(4):819-25

41. Kontopodis E, Kentepozidis N, Christophyllakis Ch, Boukovinas I, Kalykaki A, Kalbakis K, Vamvakas L, Agelaki S, Kotsakis A, Vardakis N, Georgoulias V, Mavroudis D.
Docetaxel, gemcitabine and bevacizumab as salvage chemotherapy for HER-2-negative metastatic breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2015 Jan;75(1):153-60

42. Agelaki S, Kalykaki A, Markomanolaki H, Papadaki MA, Kallergi G, Hatzidaki D, Kalbakis K, Mavroudis D, Georgoulias V. Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer.PLoS One. 2015 Jun 17;10(6)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

1**. No16967A (Roche)**

Μία ανοιχτή τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης ΙΙΙ για τη διαλείπουσα χορήγηση από του στόματος Capecitabine σε συνδυασμό με ενδοφλέβια χορήγηση Oxaliplatin ανά τρεις εβδομάδες (XELOX) έναντι ταχείας δόσης και συνεχούς έγχυσης Flourouracil / ενδοφλέβιας Leukovorin με ενδοφλέβια Oxaliplatin ανά δύο εβδομάδες (FOLFOX4) (2nd line).

2. No16968B (Roche)

Μια ανοιχτή τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης ΙΙΙ για τη διαλείπουσα χορήγηση από του στόματος Capecitabine σε συνδυασμό με την ενδοφλέβια χορήγηση Oxaliplatin (Q3W) (XELOX) έναντι Fluorouracil/Leukovorin ως επικουρική θεραπεία σε ασθενείς που έχουν χειρουργηθεί για καρκίνο παχέως εντέρου, σταδίου 3 κατά AJCC/UICC (Σταδίου C κατά Dukes) (adjuvant).

3. CA163048 (ΚΔ-10/01/04) A phase III clinical trial of a new Epothilone (BMS-247550) plus capecitabine versus capecitabine monotherapy in pretreated patients with breast cancer. Bristol-ILS

4. Crystal (ΚΔ-113/01/04) Open, randomized, controlled, multicenter phase III study comparing 5-FU/FA plus irinotecan versus 5-FU/FA plus irinotecan plus **cetuximab (Erbitux)** as first-line treatment for epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing metastatic colorectal cancer.

5. HERA Study 31661 Transtuzumab after adjuvant chemotherapy in Her-2 positive brest cancer.

6.CA183001 A Phase II study of intrvenus (IV) Vinflunine in Patients with Locally Advanced or Metastatic Transitional Cell Carcinoma (TCC) of the Urothelium.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΟΜΕΝΗ

Α. Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα

1. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα στο σακχαρώδη διαβήτη. Διαβητολογικό κέντρο Β' Παθολογικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο. Αθήνα, 27/11/2000 έως 1/12/2000.

2. Μετά τη λήψη της ειδικότητας Παθολογίας εκπαιδεύτηκα στην Ογκολογία υπηρετώντας ως επιστημονικός συνεργάτης της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑ.Γ.Ν.Η από 11/5/2003 έως 05/10/2006.

3. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα στην Ογκολογία Yale University, Ιούλιος 2008.

4. Παρακολούθηση Σεμιναρίων Εκπαίδευσης στη Φαρμακοεπαγρύπνιση στο Ηράκλειο: 26/11/2008 και 22/01/2009.

ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΡΙΑ

1. Μαθήματα προς τους φοιτητές της Ιαρικής κατά τη διάρκεια της άσκησης τους στην Κλινική της Γενικής Παθολογίας κατά τα έτη της ειδικότητας μου.

2. Καθήκοντα επιμελητεύοντος στους νεότερους ειδικευόμενους κατά το τελευταίο έτος της ειδικότητας.

3. Συμμετοχή στα ενδοκλινικά μαθήματα της Ουρολογικής Κλινικής με ομιλία στο θέμα: "ορμονοάντοχος καρκίνος προστάτη-χημειοθεραπεία" στις 07/06/2004.

4. Διάλεξη στο πλαίσιο του 12ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης στις 12/11/2004 με θέμα: "Αντιμετώπιση των ασθενών με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο μαστού/ωοθηκών".

5. Διάλεξη στο πλαίσιο του 14ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης στις 26/10/2006 με θέμα: «Αντιμετώπιση υποτροπιάζοντος Επιθηλιακού καρκίνου ωοθηκών»

6. Διάλεξη στα πλαίσιο του Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου στο Ηράκλειο Κρήτης την 9/11/2006 με θέμα: ‘Στοχευμένες θεραπείες στους συμπαγείς όγκους’ .

7. Διάλεξη στα πλαίσιο του ετήσιου Εκπαιδευτικού Προγράμματος για τη χορήγηση του τίτλου Παθολογικής Νοσηλευτικής Ειδικότητας 2006-2007 στο Ηράκλειο με θέμα:

"Καρκίνος μαστού-Θεραπεία".

8. Διάλεξη στο πλαίσιο του 15ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης στις 8/11/2007 με θέμα: "Μυλλεριανοί όγκοι: Θεραπευτική αντιμετώπιση"

9. Διάλεξη στο πλαίσιο της 3ης Χειμερινής Διημερίδας Ελληνικής Εταιρείας Γηριατρικής Ογκολογίας στη Θεσσαλονίκη στις 08/12/2007 με θέμα: " Οστική μεταστατική νόσος στον ηλικιωμένο ασθενή".

10. Διάλεξη στο πλαίσιο του Συνεδρίου: Η Ογκολογία του σήμερα και του αύριο - Κατευθυντήριες Οδηγίες (gude-lines) για τη καθ' ημέρα πράξη και μελλοντικές προοπτικές στην Αθήνα την 14/12/2007 με θέμα: "Κρκίνος ωοθηκών-Θεραπεία υποτροπής στην καθ' ημέρα πράξη".

11. Διάλεξη στο πλαίσιο του 16ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης στις 12/11/2008 με θέμα: " Εξελίξεις στην αντιμετώπιση του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών".

12. Διάλεξη στο πλαίσιο του 3ου Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Μαιευτικής-Γυναικολογίας στο Ρέθυμνο Κρήτης την 5 Απριλίου 2009 με θέμα: "Θεραπεία του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών από τη θέση του Ογκολόγου-Παθολόγου".

13. Διάλεξη στο πλαίσιο της 5ης Εκπαιδευτικής Ημερίδας Ανασκόπησης ASCO στο Πόρτο Χέλι την 26/09/2009 με θέμα: "Σημαντικότερες εξελίξεις στο γυναικολογικό καρκίνο" .

14. Διάλεξη στο πλαίσιο του 17ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας στο Ηράκλειο Κρήτης στις 05/11/2009 με θέμα: "Στοχευμένες θεραπείες στον καρκίνο των ωοθηκών νεότερα δεδομένα".

15. Διάλεξη στα πλαίσιο του ετήσιου εκπαιδευτικού προγράμματος για τη χορήγηση του τίτλου Παθολογικής Νοσηλευτικής Ειδικότητας 2008-2009 στο Ηράκλειο με θέμα: "Γυναικολογικοί Καρκίνοι-Θεραπεία".

16. Διάλεξη στο πλαίσιο του Μετεκπαιδευτικού Προγράμματος της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ την 17/03/2010 με θέμα: "Χημειοθεραπεία στον καρκίνο των ωοθηκών".

17. Διάλεξη στο πλαίσιο του 15ου Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου με θέμα:Η Επιτήρηση ως θεραπεία επιλογής σε ασθενείς με καρκίνο προστάτου. Ρέθυμνο 30/10/2010.

18. Διάλεξη στο πλαίσιο Διημερίδας νεοπλασιών στις γυναίκες με θέμα: Καρκίνος ωοθηκών: Νέα φάρμακα ή γενετική ανάλυση ως οδηγός . Αθήνα 7/12 2012

19. Διάλεξη στα πλαίσια εκπαιδευτικών μαθημάτων σε ειδικευόμενους Ογκολογίας με θέμα Φαρμακοεπαγρύπνιση Ηράκλειο 2012

20. Μετεκπεδευτικό μάθημα στους νοσηλευτές με θέμα καρκίνος του στομάχου Ηράκλειο ΠΑΓΝΗ 25/10/2012

21. Φοιτητικό συνέδριο καρκίνος μήτρας και τραχήλου μήτρας Ηράκλειο Οκτώβριος 2013

22. Παρουσίαση επιλεγμένων ανακοινώσεων με θέμα Γυναικολογικός καρκίνος: Best of Asco Ερέτρια Σεπτέμβριος 2013.

23. Μετεκπαιδευτικό μάθημα στους Γυναικολόγους Ο ρόλος της χημειοθεραπείας στο γυναικολογικό καρκίνο 5/12/2013

24.Διάλεξη στα πλαίσια Διεπιστημονικής ημερίδας- Διεπιστημονική Εκπαίδευση για τη θεραπεία νεοπλασματικών νοσημάτων με θέμα: Αντι-αγγειογενετική θεραπεία στον καρκίνο της ωοθήκης Χανιά 28/11/2014

25. Διάλεξη στο πλαίσιο του 6^{ου} Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Κλινικής και Ερευνητικής Ογκολογίας με θέμα: Εξελίξεις στην αντιαγγειογενετική θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών Αθήνα 23/01/2014.

26.Διάλεξη στα πλαίσια του 5^{ου} Εκπαιδευτικού Σεμιναρίου του 4^{ου} κύκλου Σπουδών της Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας (ΕΑΚΟ/ΕΟΠΕ) με θέμα: Καρκίνος ωοθηκών, συστηματική θεραπεία υποτροπής. Αθήνα 14/3/2014

27. Διάλεξη στα πλαίσια Διεπιστημονικής Ημερίδας- Διεπιστημονική Εκπαίδευση για τη θεραπεία νεοπλασματικών νοσημάτων με θέμα: Πρότυπα αντιμετώπισης του καρκίνου της ωοθήκης το 2015: Πρωτοπαθής νόσος- Υποτροπή Χανιά. 2/10/2015

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Cancer Chemother Pharmacol
DOI 10.1007/s00280-014-2387-y

ORIGINAL ARTICLE

Elimination of EGFR-expressing circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer treated with gefitinib

Antonia Kalykaki · Sofia Agelaki · Galatea Kallergi · Alexandros Xyrafas · Dimitris Mavroudis · Vassilis Georgoulias

Received: 2 December 2013 / Accepted: 11 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Purpose The purpose of the study is to evaluate the effect of gefitinib, an anti-EGFR TKI on circulating tumor cells (CTCs) in patients with metastatic breast cancer (MBC).

Methods Seventeen patients with MBC with detectable CTCs after the completion of prior treatment received gefitinib 250 mg/day p.o. CTCs were monitored by immunofluorescence microscopy after double staining with anti-cytokeratin (A45-B/B3) and either anti-CD45 or anti-EGFR antibodies.

Results A median reduction of 96.4 and 94.1 % in CTC count was observed in 11 (64.7 %) and 12 (70.6 %) of patients after the first and the second treatment cycles, respectively. Total CTC numbers declined by 73 and 44 % after the first and second treatment cycles, respectively. In nine patients with EGFR(+)/CK(+) CTCs, gefitinib resulted in a reduction of both EGFR(+) and EGFR(−) CTCs, and after the third course, most detected CTCs were EGFR(−). In two patients, with a sustained decrease in CTC numbers, a PFS of 16.0 and 19.0 months was observed and in one of them, it was associated with clinical objective response.

Conclusion Treatment-resistant CTCs could be eliminated by gefitinib in MBC, and EGFR expression on CTCs merits further validation as a potential biomarker for specific and effective targeting of CTCs.

Keywords Circulating tumor cells · Gefitinib · Breast cancer · EGFR · Tyrosine kinase inhibitors

Antonia Kalykaki and Sofia Agelaki contributed equally to this work.

Clinicaltrials.gov: NCT00428896

A. Kalykaki · S. Agelaki · A. Xyrafas · D. Mavroudis · V. Georgoulias (✉)
Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, PO Box 1352, 711 10 Heraklion, Crete, Greece
e-mail: georgoul@med.uoc.gr; georgsec@med.uoc.gr

S. Agelaki · G. Kallergi · D. Mavroudis · V. Georgoulias
School of Medicine, Laboratory of Tumor Cell Biology, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Introduction

Breast cancer is considered a systemic disease since early tumor cell dissemination may occur even in patients with small tumors. Several investigators using immunocytochemistry or RT-PCR have shown the presence of cytokeratin-positive epithelial cells in the bone marrow aspirates and the peripheral blood of otherwise metastasis-free patients with stage I and II breast cancers [1–3]. The detection of occult tumor cells in bone marrow (disseminated tumor cells, DTCs) and peripheral blood (circulating tumor cells, CTCs) has been shown to be an independent unfavorable prognostic factor associated with increased distant relapse rate and decreased overall survival [4–7]. In addition, CTCs can be also detected in 40–70 % of patients with metastatic breast cancer (MBC) [8–10]. Using the Cell Search platform, the detection of 5 or more CTCs/7.5 ml of peripheral blood in women with MBC before starting a new line of treatment has been shown to predict progression-free and overall survival, whereas CTC counts in the first follow-up visit were also predictive of treatment outcome [11–16].

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a member of the HER growth factor receptors family. These receptors share a common structure consisting of an extracellular ligand-binding domain, a short transmembrane domain, and

Published online: 04 February 2014

an intracellular domain with intrinsic tyrosine kinase activity [17]. Binding of the ligand(s), such as EGF or transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) to the extracellular domain of the receptor, initiates a signal transduction cascade that regulates many aspects of tumor cell biology including cell growth, survival, metastasis, and angiogenesis, as well as tumor cell sensitivity to chemotherapy and radiotherapy [17].

Expression of EGFR has been demonstrated in 18–25 % of breast cancers and has been correlated with a higher risk of relapse and death from breast cancer [18, 19]. Substantial increases in EGFR expression have been demonstrated in *de novo* endocrine-resistant ER-positive disease, whereas a more modest increase in the expression of EGFR or ligands has been detected in acquired endocrine resistance of ER-positive disease [20]. In addition, approximately half of the cases of triple-negative breast cancer and inflammatory breast cancer overexpress EGFR, whereas high EGFR expression is an independent predictor of poor prognosis in inflammatory breast cancer [21].

Gefitinib, a signal transduction inhibitor of the EGFR tyrosine kinase, has demonstrated antitumor activity against chemo- and hormone-resistant breast cancer cell lines [20, 22–24]. Initial phase II studies suggested that gefitinib does not have significant efficacy in pre-treated patients with MBC. In addition, a phase II study, designed to test the efficacy of gefitinib in patients with hormone-resistant breast cancer, was stopped because of low clinical benefit rate [25]. However, in a small randomized study, gefitinib in combination with anastrozole was associated with a marked advantage in PFS compared with anastrozole plus placebo, in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic disease [26]. Moreover, in a recently reported trial, the combination of anastrozole, fulvestrant, and gefitinib, administered in the neoadjuvant setting in ER-positive breast cancer, resulted in both a significant reduction in cell proliferation, as measured by Ki-67 expression on tumor cells, and in a parallel reduction in the expression of cyclin D1 compared to anastrozole and fulvestrant alone [27].

Our group has previously reported the presence of EGFR-expressing CTCs in the peripheral blood of MBC patients using a double immunostaining cytomorphologic assay; all the enrolled patients in this study also had detectable CK-19mRNA-positive CTCs as assessed by a molecular assay [28]. In addition, phosphorylated EGFR was observed in 86 % of patients with EGFR-expressing CTCs, while the downstream PI3K/Akt signalling pathway was also activated on CTCs of 13 out of 16 evaluated patients, suggesting the involvement of this pathway in CTCs' survival.

Since the persistence of CTCs after the completion of treatment is associated with poor clinical outcome [9, 29, 30], we hypothesized that targeting CTCs surviving after prior chemotherapy and/or endocrine treatment could be beneficial for patients with breast cancer. This pilot study was designed to assess the effect of gefitinib on chemotherapy- or/and hormonotherapy-resistant CTCs in patients with MBC.

Patients and methods

Patients

Women with histologically confirmed MBC were eligible for the study. Patients had to have detectable CTCs detected by both a molecular (CK-19 mRNA-positive cells) and an immunocytochemical (CK-positive cells) assay. After the enrollment of the first eight patients, the trial was amended to include only patients with EGFR-expressing CTCs, since we observed, in a parallel study, activation of both EGFR and downstream signalling pathways in CTCs of patients with MBC [28]. Other eligibility criteria were age >18 years old; performance status 0–2 (WHO); adequate bone marrow, renal, and liver function; and non-progressing disease (stable disease or partial response) as best response to prior treatment. Eight patients with MBC and detectable CK-19mRNA-positive and CK-positive CTCs, fulfilling the inclusion criteria of this study, who had not received gefitinib, were retrospectively selected from a pool of patients followed in our Department. These patients had to have sequential monthly (up to 4 months) assessments of CTC status (using the molecular assay) as well as PBMCs cytospins available for the detection of cytokeratins using immunostaining (historical control group).

Gefitinib was administered at the dose of 250 mg/day orally (1 month equals one cycle) until disease progression, consent withdrawal, or unacceptable toxicity. The primary end point of the study was to evaluate the efficacy of gefitinib in eliminating CK-positive CTCs. Secondary end point was to assess the effect of gefitinib on patients' clinical outcome.

Disease assessment

Before treatment initiation, all patients had complete physical examination, blood chemistry, and a diagnostic evaluation including computed tomography scans (CT scans) of the chest and abdomen [or magnetic resonance imaging (MRI) if clinically indicated]. Physical examination and blood chemistry were repeated before each treatment cycle. Patients were assessed by CT scans (or MRI if clinically indicated) every 2 months, and response evaluation was performed according to RECIST criteria. The trial was approved by the Institutional Ethics and Scientific

Table 1 Patients' characteristics

	EGFR expression on CTCs			
	Known		Unknown	
	$n = 9$	%	$n = 8$	%
Median age				
Min–max	56 (32–85)		65.5 (54–74)	
PS				
0–2	9	100	8	100
Menopausal status				
Pre-/post-/peri-	5/4/0	56.0/44.0/0.0	0/7/1	0.0/88.0/12.0
Prior adjuvant treatment				
Yes/no	8/1	89.0/11.0	5/3	62.0/38.0
Hormone receptor expression				
Positive	5	56.0	4	50.0
Negative	3	33.0	3	38.0
Unknown	1	11.0	1	12.0
HER2 expression				
Positive	2	22.0	2	25.0
Negative	6	67.0	4	50.0
Unknown	1	11.0	2	25.0
Visceral disease				
Yes/No	4/5	45.0/55.0	5/3	62.0/38.0
Prior lines of Tx				
1/2/≥ 3	3/3/3	33.3/33.3/33.3	4/3/1	50.0/38.0/12.0
Prior hormone Tx				
Yes/No	6/3	67.0/23.0	6/2	75.0/25.0
Best response to prior treatment				
PR/SD	6/3	67.0/33.0	6/2	75.0/25.0

PS performance status, *SD* stable disease, *PR* partial response

Committee as well as by the Hellenic Drug Organization (EOF), and all patients gave written informed consent in order to participate in the study.

Detection of CK-19 mRNA-positive CTCs

Peripheral blood (20 ml in EDTA) was obtained before the initiation of gefitinib and monthly thereafter. Blood samples were obtained at the middle of vein puncture after the first 5 ml of blood was discarded, in order to avoid contamination of blood with epithelial cells from the skin during sample collection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using density gradient (Ficoll-hypaque; $d = 1.077$g/mol) centrifugation at 1,800 rpm for 30 min. PBMCs were washed three times with PBS and centrifuged at 1,500 rpm for 10 min. Patients were screened for the presence of CK-19 mRNA-positive cells using the RT-PCR assay, which has been previously described in detail [31, 32]. The presence of CK-positive CTCs was also confirmed by double immunofluorescence staining as described below, and only patients with CTCs detected by both methods were enrolled into the study. The monitoring of CTCs during gefitinib treatment was performed monthly by immunofluorescence microscopy.

Immunofluorescence microscopy

Cytospins were prepared using aliquots of 250.000 PBMCs/slide by cytocentrifugation at 2,000 rpm for 2 min, and slides were dried up and stored at −80 °C until use. Four slides (10^6 PBMCs) were analyzed per patient. PBMCs' cytospins were fixed with cold aceton/methanol 9:1 (v/v) for 20 min and stained with mouse A45-B/B3 antibody (detecting CK8, CK18, and CK19; Micromet, Munich, Germany) for 1 h. Subsequently, slides were stained with either CD45 (common leukocyte antigen; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) or anti-EGFR (Santa Cruz, CA, USA) antibodies for 1 h. Cells were then incubated with the corresponding secondary antibodies for 45 min [28]. The cytomorphological criteria proposed by Meng et al. [33] (high nuclear/cytoplasmic ratio, larger cells than white blood cells, etc.) were used to characterize a CK-positive cell as a CTC. CTCs were characterized as EGFR-positive if the intensity of EGFR staining was higher than the respective intensity of PBMCs that served as an internal

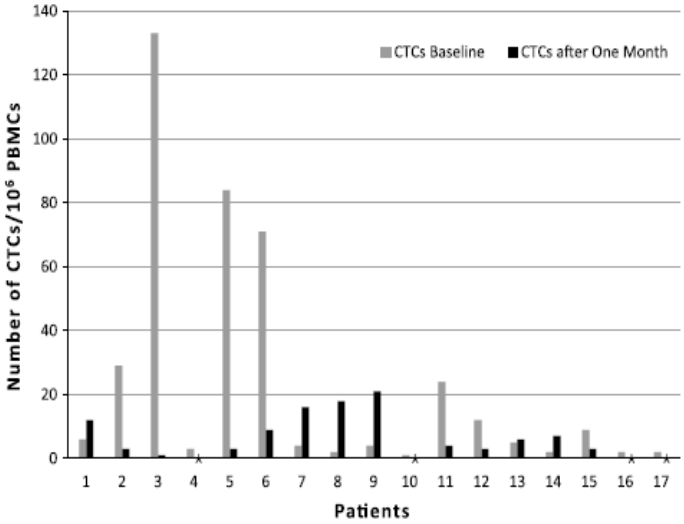


Fig. 1 Comparison of CTCs' numbers at baseline (*gray bar*) and after 1 month of gefitinib administration (*black bar*). *Asterisk* denotes the absence of detectable CTCs after 1 month of treatment with gefitinib

negative control. Furthermore, to verify the specificity of the staining procedure, positive and negative controls prepared by adding or omitting EGFR primary antibodies in SKBR3 breast cancer cells that express EGFR [28] were also included in each experiment. Patients with at least one EGFR(+) CTC were determined as having EGFR(+) CTCs. Slides were analyzed using a confocal laser scanning microscope module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) and a fluorescent microscope (Leica DM 2500). Results are expressed as number of CTCs/10^6 PBMCs.

Results

Patient characteristics

Forty-seven patients with MBC were screened for the presence of CTCs using both a real-time PCR assay (CK-19 mRNA-positive cells) and an immunofluorescence assay. Seventeen patients with CTCs detectable by both methods were enrolled into the study. Nine patients, after the amendment was implemented, were enrolled on the basis of the detection of EGFR-expressing CTCs. Patients' characteristics are listed in Table 1. Eleven (64.7 %) patients were postmenopausal and 13 (76.4 %) had received prior adjuvant treatment. Nine (52.9 %) and four (23.5 %) patients had hormone receptor- and HER2-positive tumors, respectively. Nine (52.9 %) patients had visceral disease and 10 (58.8 %) had received two or more prior lines of treatment.

Effect of gefitinib on CTCs

Ninety-one treatment courses were administered in the whole group of patients (median: four courses/patient; range 2–19); all patients completed at least two and 14 (82 %) at least three treatment courses. After the completion of the first treatment course, the total CTC numbers, as detected by double immunostaining, decreased in 11 out of 17 (64.7 %) patients by a median of 96.4 % (range 66.7–100.0 %), whereas in the remaining six (35.3 %) patients, their number was increased (Fig. 1). After the second treatment course, CTC numbers were decreased, by a median of 94.1 % (range 50.0–100.0 %), in 12 (70.6 %) patients and increased in five (29.4 %). Conversely, a progressive increase in CTCs' numbers was observed in seven out of the eight patients of the historical control group (Table 2).

A total of 393 CTCs were detected at baseline in the whole group of patients with a median of five CTCs/patient (range 1–33). CTC counts decreased to 106 (median: three CTCs/patient; range 0–21) and 220 (median: three CTCs/patient; range 0–53), corresponding to a 73 and 44 % decrease compared to the baseline, after the first, and second treatment courses, respectively.

Table 2 Serial enumeration of CTCs in patients with metastatic breast cancer after chemotherapy

Patient	Post-chemo	1mo	2mo	3mo	4mo
CK(+) CTCs/10^6 PBMCs					
HC1	1	1	3	4	5
HC2	0	3	2	6	15
HC3	4	3	6	18	24
HC4	0	2	5	9	13
HC5	3	2	2	3	2
HC6	12	14	20	22	28
HC7	2	6	9	11	17
HC8	0	4	7	10	22

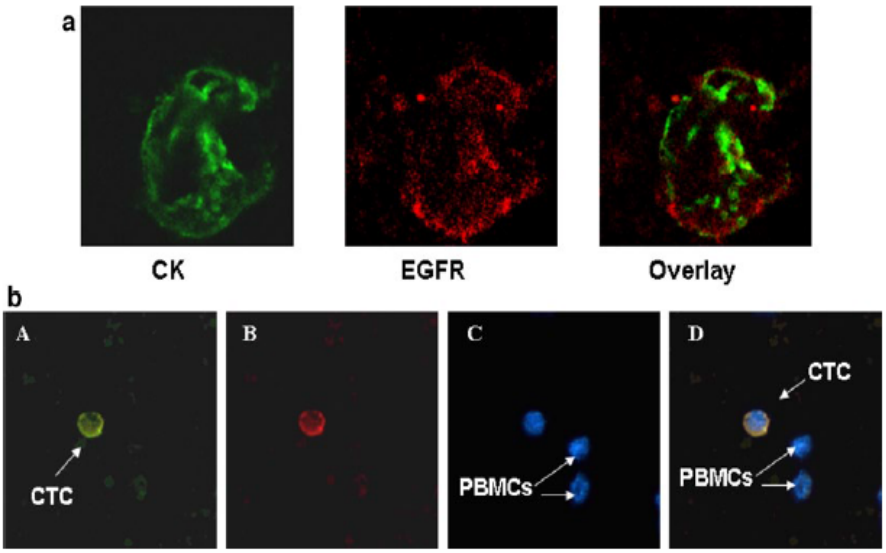


Fig. 2 EGFR expression in CTCs from breast cancer patients. **a** Confocal laser scanning microscopic sections of a patient's CTC stained with antibodies against pan-cytokeratins (A45-B/B3; *green*) and EGFR (*red*); magnification (×60). **b** Double immunofluorescence staining of patient's CTCs with anti-pancytokeratin (*green*) and anti-EGFR (*red*) antibodies and Dapi (for nucleus staining); magnification (×20) (ARIOL system)

Effect of gefitinib on CTCs according to EGFR expression

Nine patients had been enrolled on the basis of EGFR expression on CTCs. As shown in Fig. 2a and b, EGFR expression on CTCs was mainly membranous and to a lesser extent intracellular, whereas CK staining was mainly cytoplasmic. Among a total of 336 CTCs (median: six CTCs/patient; range 2–133) detected at baseline in this cohort of patients, 74 (22 %) expressed EGFR (median: two EGFR(+)/CK(+) CTCs/patient; range 1–28). As a negative control, PBMCs from 10 healthy female blood donors were also evaluated for CK/EGFR co-expression by double staining immunofluorescence; there were no cells that stained positive for EGFR and CK in these healthy blood donors.

Sixty-three treatment courses were administered in this group of patients; 8 out of 9 patients completed at least three courses. CTC numbers were decreased by a median of 100 % (range 87.3–100 %) and 98.3 % (range 66.7–100 %) in five (55.5 %) and six (66.7 %) patients, after the completion of the first and second treatment courses, respectively. Total CTC numbers detected in all patients declined from 336 to 83 (a decrease by 75.3 %) and 114 (a decrease by 66.1 %) after the first and second treatment course, respectively (Table 3). The number of EGFR(+) CTCs was reduced from 74 at baseline to 25 (a 66.2 % decrease) at the end of the first course and to 23 (a 68.9 % decrease) at the end of the second treatment course (Table 3). Similarly, EGFR(−) CTCs were also reduced from 262 to 58 (a 77.8 % decrease) and 91 (a 65.2 % decrease) at the end of the first and second treatment courses, respectively (Table 3). However, among a total of 89 CTCs identified at the end of the third course in 7 out of the 8 patients who completed 3 treatment courses (no available sample in one patient), only 8 CTCs (8.9 %) expressed EGFR, whereas 81 (91.0 %) were EGFR(−) (Table 3).

Clinical outcome according to the effect on CTCs

The median duration of gefitinib treatment was 3.9 months (range 1.9–18.8) and 4.2 months (range 1.9–18.8) in the whole group of patients and in patients with known EGFR status of CTCs, respectively. Disease control rate (DCR) was 41.2 and 44.4 %, and the median PFS was 16 (range 5–76) and 18 weeks (range 8–76) in the whole group and in patients with known EGFR status, respectively.

As shown in Table 3, gefitinib was associated with a significant decrease in the absolute number of EGFR(+)/CK(+) and EGFR(−)/CK(+) CTCs after the first month of treatment in 4 (44.4 %) patients; this effect was sustained for at least 3 months. Among them, one patient had a partial response, two had disease stabilization, and one progressed. Moreover, in 2 (22.2 %) of these patients (#5, #6; Table 3), the elimination of CTCs was maintained for the whole period that sequential monthly blood samples were evaluated (up to 6 months);

Table 3 CTC numbers in patients with known EGFR expression on CTCs

Pt no	No. of cycles	Best response	PFS (months)	Baseline			First cycle			Second cycle			Third cycle			Fourth cycle			Fifth cycle			Sixth cycle		
				CTC numbers																				
				Total	EGFR (+)	EGFR (−)	Total	EGFR (+)	EGFR (−)	Total	EGFR (+)	EGFR (−)	Total	EGFR (+)	EGFR (−)	Total	EGFR (+)	EGFR (−)	Total	EGFR (+)	EGFR (−)	Total	EGFR (+)	EGFR (−)
1	2	PD	2	6	3*	3	12	6	6	0	0	0	Stop											
2	4	PD	4	29	27	2	3	0	3	1	0	1	4	1	3		ND	3	ND	ND	ND	Stop		
3	5	PD	5	133	1	132	1	0	1	0	0	0	3	3	0		ND	1	Stop					
4	6	SD	6	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	19	SD	19	84	28	56	3	0	3	3	0	3	0	0	0	0	0	0	2	1	1	6	0	6
6	16	PR	16	71	8	63	9	0	9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	0	4	1	0	1
7	4	SD	4	4	2	2	16	2	14	25	3	22	14	0	14	16	1	15	Stop					
8	4	PD	4	2	2	0	18	12	6	37	19	18	59	5	64	43	5	38	Stop					
9	3	PD	3	4	2	2	21	5	16	48	1	47	ND	ND	ND	Stop								
				336	74	262	83	25	58	114	23	91	89	8	81									

* Number of CTCs/10^6 PBMCs

PFS progression-free survival, *PD* progressive disease, *SD* stable disease, *PR* partial response, *ND* not done, *Stop* treatment discontinuation

in these particular patients, a prolonged PFS of 16.0 and 19.0 months, associated with disease stabilization in one and objective partial response in the other, was recorded. Both patients had visceral disease and had been previously treated with one and two chemotherapy regimens for advanced disease, respectively.

In 3 (33.3 %) patients (#7, #8, #9; Table 3), a significant increase in both EGFR(+)/CK(+) and EGFR(−)/CK(+) subpopulations was documented after the first treatment course and this was further confirmed after the second course. Interestingly, in two of them, the subsequent increase in CTC numbers mainly concerned the EGFR(−)/CK(+) subpopulation. Two out of these three patients with increasing CTC numbers experienced progressive disease as best response to treatment.

Discussion

Increasing evidence supports the role of CTCs as a potent prognostic and predictive tool in MBC patients. Indeed, using the FDA-approved Cell Search system, it has been shown that increased numbers of CTCs before and after one cycle of a systemic treatment for metastatic disease or at any time during therapy were associated with shorter median PFS and OS representing an earlier and more reliable indicator of response to treatment compared to imaging studies. In addition, serial enumeration of CTCs was strongly correlated with radiologic assessment and accurately predicted disease progression [16]. CTCs surviving after the administration of chemotherapy and/or hormone therapy are expected to present resistance to these therapeutic modalities, and this is associated with a poor clinical outcome [9, 29, 30]. Therefore, it is an unmet need to identify new therapeutic targets for the treatment for patients with "resistant" CTCs.

The molecular characterization of CTCs is extremely important since it might guide the implementation of targeted therapies. In the current pilot and exploratory study, we sought to investigate whether gefitinib could eradicate cytokeratin-positive CTCs, detectable by using both a molecular and an immunocytochemical assay, after the completion of prior therapy in patients with MBC, since phosphorylated EGFR and downstream signalling kinases have been shown to be expressed on CTCs and could be involved in the metastatic potential of CTCs [28].

The presented results indicate that the administration of gefitinib was associated with an early and significant decrease in CTC numbers in more than 50 % of treated patients. In addition, the sustained elimination of CTCs seems to be associated with a better clinical outcome. A similar decrease in CK-positive CTCs could not be observed in an historical control group of eight patients

who did not received gefitinib; however, this comparison has serious and obvious limitations and should be considered with caution. Despite the important individual variability of the frequency of EGFR-expressing CTCs, similar results could also be observed when the group of patients with known CTCs' EGFR status was analyzed separately. It is interesting to note that EGFR(+) and EGFR(−) subpopulations of CTCs presented comparable elimination rates during gefitinib treatment, although the effect on EGFR(+) CTCs was more important and sustainable. The elimination of EGFR(−)/CK(+) CTCs during gefitinib administration seems unexpected; however, we cannot exclude a low, but undetectable by immunofluorescence, expression of EGFR which could be sufficient enough to transactivate other HER receptors through heterodimerization. Indeed, breast cancer cell lines with low EGFR expression levels are sensitive to the antitumor effect of gefitinib, if they co-express high levels of HER2 and this effect is mediated, at least partly, by gefitinib-induced reduction of HER1/HER2 heterodimer phosphorylation [34–36]. Although in the present study the co-expression of HER2 and EGFR on individual CTCs has not been evaluated, we have previously shown that 44 and 63 % of patients with MBC have detectable EGFR(+)/CK(+) and HER2(+)/CK(+) CTCs, respectively; in addition, triple-staining experiments demonstrated the co-expression of both EGFR and HER2 on the same CTCs [28]. Therefore, it could be hypothesized that gefitinib might be effective even against CTCs with low, but undetectable by immunofluorescence, EGFR levels that express HER2.

The kinetics of the EGFR(+) and EGFR(−) subpopulations of CTCs revealed that at the end of the third treatment course, CTC counts showed an increasing trend that mainly concerned the EGFR(−)/CK(+) subpopulation, whereas the number of EGFR(+)/CK(+) CTCs was further decreased. However, the small number of the enrolled patients limits the importance of this observation, which needs to be confirmed in a subsequent and larger study. However, these observations seem to indicate that the EGFR(−)/CK(+) subpopulation of CTCs, which increases during treatment, could represent gefitinib-resistant cells.

The evaluation of the kinetics of EGFR(+) and EGFR(−) CTCs in individual patients is noteworthy since it appears to be correlated with clinical outcome. Indeed, two main groups of patients could be distinguished; the first one is characterized by a clear decrease in both subpopulations of CTCs after the first treatment cycle, which was sustained for the subsequent two cycles; conversely, the second group is characterized by an early increase in EGFR(+) and EGFR(−) subpopulations of CTCs (Table 3), which further supports the hypothesis that EGFR(−)/CK(+) CTCs have to be gefitinib-resistant. Clinically, in 2 out of 5 patients of the first group, a prolonged PFS of 16.0 and 19.0 months was observed in association with a long-lasting objective response in one of them. On the contrary, in 2 out of 3 patients with increasing CTC numbers, progressive disease as best response to treatment was recorded. Therefore, the prolonged elimination of both EGFR(+) and EGFR(−) CTCs upon treatment with gefitinib might be a signal indicating treatment efficacy and disease control, supporting the relevance of CTCs as a clinical biomarker for treatment monitoring.

Although these results are interesting, they should be considered as hypothesis generating due to the pilot and exploratory design of the trial, which enrolled only a small number of patients. Therefore, our observations should be interpreted with caution since there is not a parallel non-treated control group studied prospectively. The used historical control group was consisted of patients selected on the basis of the sequential monthly enumeration of CTCs and the availability of cytospins for further immunostaining for the detection of CK-positive CTCs. In addition, the detection of CTCs was not confirmed with the Cell Search assay, which represents the gold standard assay for the enumeration of CTCs in the metastatic setting, since at the time that the study was initiated, the Cell Search platform was not available in our laboratory. Finally, the correlation of CTC changes during treatment with the clinical outcome was retrospective and exploratory. However, the presented results are in favor of the hypothesis that the molecular characterization of CTCs could used as a potential tool for the selection of targeted treatments in breast cancer. Indeed, it has been demonstrated that the administration of trastuzumab is associated with the elimination of HER2(+) CTCs in pre-treated patients with MBC [37]. Furthermore, a randomized phase II study reported that in patients with HER2-negative early breast cancer with CK-19mRNA-positive CTCs detectable both before and after the completion of adjuvant chemotherapy, the administration of trastuzumab was associated with a significantly lower incidence of clinical relapses and a longer disease-free survival compared to patients who received the standard of care [38]. In two small phase II trials, lapatinib was administered in MBC patients with HER2-negative disease and HER2-positive [39] or EGFR-positive [40] CTCs. In the second study, lapatinib was reported to result in a decrease in CTC counts in 43 % of patients, with most of these having a greater decrease in their EGFR-positive CTC pool [40].

In summary, the current study implies that the assessment of molecular targets on CTCs is a reasonable, feasible, and clinically relevant approach in order to select patients for targeted treatments. Large, well-designed and controlled studies are needed to further evaluate the molecular characterization of CTCs in the individualization of treatment for breast cancer patients.

Acknowledgments This work was supported by a grant from Astra Zeneca (UK) and from the Cretan Association for Biomedical Research (CABR).

Disclosure There is no conflict of interest.

References

1. Lambrechts AC, van 't Veer LJ, Rodenhuis S (1998) The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: use, limitations and future of RNA-based methods. Ann Oncol 9(12):1269–1276
2. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O (1999) Detection and clinical importance of micrometastatic disease. J Natl Cancer Inst 91(13):1113–1124
3. Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Xenidis N, Stathopoulos E, Kontopodis E, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulias V (2009) Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. Br J Cancer 101(4):589–597
4. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP (1991) Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. J Clin Oncol 9(10):1749–1756
5. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. New Engl J Med 342(8):525–533
6. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G (1996) Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. J Natl Cancer Inst 88(22):1652–1658
7. Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HT, Dearnaley D, Coombes RC (1991) Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. Eur J Cancer 27(12):1552–1555
8. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Dieras V, Mathiot C, Mignot L, Thiery JP, Sastre-Garau X, Pierga JY (2008) Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. Ann Oncol 19(3):496–500
9. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW (2005) Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J Clin Oncol 23(7):1420–1430
10. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K (2007) Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the cell search system. Clin Cancer Res 13(3):920–928
11. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. New Engl J Med 351(8):781–791
12. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW (2006) 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 12(14 Pt 1):4218–4224
13. Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, Jackson S, Hortobagyi GN, Fritsche H, Cristofanilli M (2008) Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? Cancer 113(9):2422–2430
14. Nole F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A, Sandri MT (2008) Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. Ann Oncol 19(5):891–897
15. Botteri E, Sandri MT, Bagnardi V, Munzone E, Zorzino L, Rotmensz N, Casadio C, Cassatella MC, Esposito A, Curigliano G, Salvatici M, Verri E, Adamoli L, Goldhirsch A, Nole F (2010) Modelling the relationship between circulating tumour cells number and prognosis of metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 122(1):211–217
16. Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, Rao SB, Eng-Wong J, Seillier-Moiseiwitsch F, Noone AM, Isaacs C (2009) Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. J Clin Oncol 27(31):5153–5159
17. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signalling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J 19(13):3159–3167
18. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM (2005) Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. J Natl Cancer Inst 97(17):1254–1261
19. Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL, Schiff R, Osborne CK, Chamness GC, Elledge RM (2010) Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. Cancer 116(5):1234–1242
20. Gutteridge E, Agrawal A, Nicholson R, Leung Cheung K, Robertson J, Gee J (2010) The effects of gefitinib in tamoxifen-resistant and hormone-insensitive breast cancer: a phase II study. Int J Cancer 126(8):1806–1816
21. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 136(2):331–345
22. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, De Placido S, Bianco AR, Tortora G (2001) Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res 7(5):1459–1465
23. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G (2000) Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res 6(5):2053–2063
24. Ciardiello F, Caputo R, Borriello G, Del Bufalo D, Biroccio A, Zupi G, Bianco AR, Tortora G (2002) ZD1839 (IRESSA), an EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor, enhances taxane activity in bcl-2 overexpressing, multidrug-resistant MCF-7 ADR human breast cancer cells. Int J Cancer 98(3):463–469
25. Green MD, Francis PA, Gebski V, Harvey V, Karapetis C, Chan A, Snyder R, Fong A, Basser R, Forbes JF (2009) Gefitinib treatment in hormone-resistant and hormone receptor-negative advanced breast cancer. Ann Oncol 20(11):1813–1817
26. Cristofanilli M, Valero V, Mangalik A, Royce M, Rabinowitz I, Arena FP, Kroener JF, Curcio E, Watkins C, Bacus S, Cora EM, Anderson E, Magill PJ (2010) Phase II, randomized trial to compare anastrozole combined with gefitinib or placebo in postmenopausal women with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 16(6):1904–1914

27. Massarweh S, Tham YL, Huang J, Sexton K, Weiss H, Tsimelzon A, Beyer A, Rimawi M, Cai WY, Hilsenbeck S, Fuqua S, Elledge R (2011) A phase II neoadjuvant trial of anastrozole, fulvestrant, and gefitinib in patients with newly diagnosed estrogen receptor positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 129(3):819–827
28. Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, Georgoulias V (2008) Phosphorylated EGFR and PI3 K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients. Breast Cancer Res 10(5):R80
29. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos N, Kouroussis C, Kakolyris S, Apostolaki S, Vardakis N, Lianidou E, Georgoulias V (2003) Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. Ann Oncol 14(6):849–855
30. Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Sfakiotaki G, Papadatos-Pastos D, Kalmanti L, Kafousi M, Stathopoulos E, Kakolyris S, Mavroudis D, Georgoulias V (2007) Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. Ann Oncol 18(10):1623–1631
31. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulias V, Lianidou ES (2003) Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. Clin Cancer Res 9(14):5145–5151
32. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Pallis T, Christophylakis C, Argyraki K, Lianidou ES, Stathopoulos S, Georgoulias V, Mavroudis D (2006) 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 24(23):3756–3762
33. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clin Cancer Res 10(24):8152–8162
34. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N (2001) The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signalling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. Cancer Res 61(19):7184–7188
35. Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C, Normanno N, Somenzi G, Vigano L, Fumagalli M, Menard S, Gianni L (2004) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level. J Cell Physiol 198(2):259–268
36. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL (2001) Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Res 61(24):8887–8895
37. Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, Stathopoulou A, Lianidou E, Georgoulias V (2004) 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 10(24):8185–8194
38. Georgoulias V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D (2012) Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. Ann Oncol 23(7):1744–1750
39. Pestrin M, Bessi S, Puglisi F, Minisini AM, Masci G, Battelli N, Ravaioli A, Gianni L, Di Marsico R, Tondini C, Gori S, Coombes CR, Stebbing J, Biganzoli L, Buyse M, Di Leo A (2012) Final results of a multicenter phase II clinical trial evaluating the activity of single-agent lapatinib in patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells. A proof-of-concept study. Breast Cancer Res Treat 134(1):283–289
40. Stebbing J, Payne R, Reise J, Frampton AE, Avery M, Woodley L, Di Leo A, Pestrin M, Krell J, Coombes RC (2013) The efficacy of lapatinib in metastatic breast cancer with HER2 non-amplified primary tumors and EGFR positive circulating tumor cells: a proof-of-concept study. PLoS One 8(5):e62543

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer

Sofia Agelaki[1,2☯]*, Antonia Kalykaki[1☯], Harris Markomanolaki[2], Maria A. Papadaki[2], Galatea Kallergi[2], Dora Hatzidaki[1], Kostas Kalbakis[1], Dimitrios Mavroudis[1,2], Vassilis Georgoulias[1,2]

1 Department of Medical Oncology, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece, 2 Laboratory of Tumor Biology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

☯ These authors contributed equally to this work.
* georgsec@med.uoc.gr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Agelaki S, Kalykaki A, Markomanolaki H, Papadaki MA, Kallergi G, Hatzidaki D, et al. (2015) Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. PLoS ONE 10(6): e0123683. doi:10.1371/journal.pone.0123683

Academic Editor: Xiaoan Liu, The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, CHINA

Received: June 20, 2014

Accepted: February 12, 2015

Published: June 17, 2015

Copyright: ©2015 Agelaki et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data are included within the manuscript.

Funding: This work was partly supported by a research grant from the Hellenic Society of Medical Oncology (HESMO), GlaxoSmithKline (GSK), and the Cretan Association for Biomedical Research (CABR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: This work was partly supported by a research grant from the Hellenic

Abstract

Background

To evaluate the efficacy of lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, in therapy-resistant HER2-positive CTCs in metastatic breast cancer (MBC).

Patients and Methods

Patients with MBC and HER2-positive CTCs despite disease stabilization or response to prior therapy, received lapatinib 1500 mg daily in monthly cycles, till disease progression or CTC increase. CTC monitoring was performed by immunofluorescent microscopy using cytospins of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) double stained for HER2 or EGFR and cytokeratin.

Results

A total of 120 cycles were administered in 22 patients; median age was 62.5 years, 15 (68.2%) patients were post-menopausal and 20 (90.1%) had HER2-negative primary tumors. At the end of the second course, HER2-positive CTC counts decreased in 76.2% of patients; the median number of HER2-positive CTCs/patient also declined significantly ($p = 0.013$), however the decrease was significant only among patients presenting disease stabilization ($p = 0.018$) but not among those with disease progression during lapatinib treatment. No objective responses were observed. All CTC-positive patients harbored EGFR-positive CTCs on progression compared to 62.5% at baseline ($p = 0.054$). The ratio of EGFR-positive CTCs/total CTCs detected in all patients increased from 17.1% at baseline to 37.6% on progression, whereas the mean percentage of HER2-negative CTCs/patient increased from 2.4% to 30.6% ($p = 0.03$).

Society of Medical Oncology (HESMO), GlaxoSmithKline (GSK), and the Cretan Association for Biomedical Research (CABR). VG has received research grants and honorarium for participation in advisory boards from GSK, Amgen, Novartis and Sanofi. All other authors have declared that no competing interests exist. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Conclusions

The above results indicate that lapatinib is effective in decreasing HER2-positive CTCs in patients with MBC irrespectively of the HER2 status of the primary tumor and imply the feasibility of monitoring the molecular changes on CTCs during treatment with targeted agents.

Trial Registration

Clinical trial.gov NCT00694252

Introduction

Several lines of evidence suggest that metastatic spread in breast cancer is the result of tumour cell dissemination from the primary site to distant organs which occurs early in the course of malignant progression [1]. Indeed, cytokeratin-positive epithelial cells in the bone marrow aspirates (disseminated tumor cells; DTCs) and the peripheral blood (circulating tumor cells; CTCs) have been identified in otherwise metastasis-free patients with early breast cancer by the use of immunocytochemistry or Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) [2]; the detection of these cells has been proven to be an independent unfavourable prognostic factor associated with increased distant relapse rate and decreased overall survival [3–6]. In addition, CTCs can be detected in 40–70% of patients with metastatic breast cancer (MBC) [7,8]. Using the CellSearch platform, the presence of 5 or more CTCs/7.5 ml of peripheral blood in women with MBC before starting a new line of treatment has been shown to predict progression-free and overall survival, whereas CTC counts in the first follow-up visit were also predictive of patient outcome [9].

Besides CTC detection, significant effort has been undertaken towards CTC characterization [10]. Thus it has been recognized that CTCs consist of a heterogeneous population of cells [11]. In addition, a significant discordance has been observed between the molecular characteristics of the primary tumor and those of corresponding CTCs [12–15]. Accordingly, taking into account the ease of blood sampling, it has been suggested that CTCs could serve as a "real-time liquid biopsy" for the identification of relevant therapeutic targets [16]. Our group, using a double staining immunofluorescence assay, has previously reported the presence of HER2- and EGFR-expressing CTCs in the peripheral blood of MBC patients [17,18]. The downstream PI3K/Akt signalling pathway was also shown to be activated in CTCs suggesting the involvement of this pathway in CTC survival [18].

Disease relapse after prior therapy is the major cause of mortality in patients with metastatic disease. Residual tumor cells that survive previous treatments could be responsible for this relapse. Indeed it has been shown that CTCs are detected after the administration of chemotherapy and/or hormonal therapy and their persistence is associated with poor clinical outcome [19–21]. Targeting these CTCs could be beneficial for patients with breast cancer. The primary objective of this pilot study was to assess the efficacy of the dual HER2 and EGFR inhibitor, lapatinib, on chemotherapy- or/and hormonal therapy-resistant CTCs in patients with MBC.

Patients and Methods

The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see S1 CONSORT Checklist and S1 Protocol.

Patients

Women with MBC and at least one HER2-positive CTC per 10^6 PBMCs irrespectively of the HER2 status of the primary tumor, were eligible. Patients had to have non-progressive disease (stable disease or partial response) after the completion of prior therapy for advanced disease. Other eligibility criteria were: age >18 years old, adequate bone marrow, renal and liver function, Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF) within normal range and performance status 0–2 (World Health Organization, WHO); at least 4 weeks to have elapsed after the end of prior treatment. Before treatment initiation, all patients had a complete physical examination, blood chemistry and a diagnostic evaluation including computed tomography scans (CT scans) of the chest and abdomen [or magnetic resonance imaging (MRI)] if clinically indicated as well as whole body radionuclide bone scan. Physical examination and blood chemistry were repeated every month. Patients were assessed by bone scan, CT scans (or MRI if indicated) every 3 months (or at any time in case of suspected clinical disease progression) and response evaluation was performed according to Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST), version 1.0 [22]. No other anticancer treatment was allowed during the period of lapatinib administration. All patients provided written informed consent in order to participate in the trial. The study protocol was approved by the Ethics and Scientific Committees of the University Hospital of Heraklion as well as by the Hellenic Drug Organization (EOF). Clinical investigation has been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Treatment administration

Patients received lapatinib, 1500 mg/day orally in monthly cycles. CTC counts were evaluated at baseline and then monthly prior to the initiation of each subsequent cycle of treatment. Patients presenting a CTC response before the start of the second cycle (CTC counts lower than the baseline values), or with stable CTC counts were continued on lapatinib. Those presenting an increase in CTC counts (CTC counts higher than the baseline values) were taken off study providing that further increase was documented before the third course. In subsequent cycles, treatment was also discontinued in case of two consecutive increases in CTC counts. Moreover, treatment was discontinued in case of disease progression, occurrence of unacceptable toxicity or consent withdrawal, irrespectively of CTC counts.

Sample collection

Peripheral blood (10 ml in EDTA) was obtained before the initiation of lapatinib and monthly thereafter. To avoid cell contamination from the epidermis the first 5ml of blood were discarded. Blood was diluted with equal volume of 0.9% NaCl and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by gradient density centrifugation using Ficoll Hypaque-1077 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) at 1800rpm for 30 min at room temperature. The interface cells were removed, washed twice with 40 mL of sterile PBS (pH: 7.3) at 1500 rpm for 10 min, and resuspended in 10mL of PBS. PBMCs cytospins were prepared using aliquots of 500,000 cells by cyto-centrifugation at 2000 rpm for 2 min and slides were dried up and stored at -80 ^{0}C until further use.

Double immunofluorescence for the detection of HER2 and EGFR on PBMC cytospins

The presence of HER2-positive CTCs in cytospin preparations of PBMCs was determined using the mouse A45-B/B3 (detecting CK8, CK18, and CK19; Micromet, Munich, Germany) antibody and the rabbit HER2 antibody (Cell Signaling Technology) as previously described

[18]. Briefly, PBMCs' cytospins were fixed with cold aceton:methanol 9:1 for 20 minutes and stained with A45-B/B3 antibody for 1h. Subsequently, the same slide was stained with anti-HER2 for 1h. For the detection of EGFR positive CTCs, staining was performed using the EGFR antibody (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) for 1h [18]. Cells were then incubated with the corresponding secondary antibodies for 45 minutes. To verify the specificity of the staining procedure, positive and negative controls for both markers were included in each experiment. HER2 amplified SKBR3 breast cancer cells that express both HER2 and EGFR were used as positive controls [18]; negative controls were also prepared using SKBR3 cells by omitting HER2 or EGFR primary and adding the secondary immunoglobulin G (IgG) isotype antibody [18]. Cytospins of PBMCs obtained from 10 female healthy blood donors were also double stained with A45-B/B3 and HER2 or EGFR antibodies.

The cytomorphological criteria proposed by Meng et al [23] (high nuclear/cytoplasmic ratio, larger cells than white blood cells, etc) were used to characterize a CK-positive cell as a CTC. CTCs were characterized as HER2-positive if the intensity of HER2-staining was higher compared to the HER2-negative control. Similarly, a CTC was determined as EGFR-positive if the intensity of EGFR staining was higher than the respective negative control. A total of 10^6 PBMCs per patient were analyzed by the use of immunofluorescence microscopy (Leica DM 2500). Patients with at least one HER2-positive or EGFR-positive CTC per 10^6 PBMCs were determined as HER2-positive or EGFR-positive, respectively. The evaluation of PBMC cytospins from healthy female blood donors revealed that there were no cells staining positive for HER2 or EGFR and cytokeratins (CK) (data not shown). Results are expressed as number of CTCs/10^6 PBMCs.

Study design

This is a pilot feasibility study designed to evaluate the effect of lapatinib on HER2-positive CTC counts in patients with MBC who present disease stabilization or response after the completion of prior therapy for metastatic disease. Secondary endpoints were to correlate the kinetics of HER2-positive CTCs with response to treatment and the assessment of treatment-induced toxicity. As a correlative study, EGFR expression on CTCs at baseline and on progression was also evaluated.

Statistical analysis

This is a pilot study aiming to demonstrate the effect of lapatinib on HER2-positive CTC counts. Since no prior experience exists for this approach, no formal sample size estimation was carried out.

Progression-free survival (PFS) was calculated from the date of the study enrolment until the date of the first evidence of disease and/or CTC progression. The Kaplan–Meier method was used to plot the corresponding PFS curve. The distribution of values was tested by Kolmogorov-Smirnov normality test. Categorical variables were compared by Chi-square test, whereas Wilcoxon signed rank test (2 related samples) was used to compare quantitative factors between different time points. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics version 20. P values were considered statistically significant at the 0.05 level.

Results

Patients

Seventy-six consecutive patients with MBC and disease stabilization or response following previous treatment were screened from September 2008 to November 2011. Twenty-eight (36.9%)

were CTC-positive, 23 (30.3%) had at least one HER2-positive CTC and 22 patients were enrolled into the study. The last patient was enrolled on November 2011 and the date of the last follow-up was on February 2013. All patients were evaluable for toxicity and 21 for efficacy analysis. A CONSORT flow diagram of the study is presented in Fig 1. Patients' characteristics are listed in Table 1. Median age was 62.5 years, 15 (68.2%) patients were post-menopausal and 20 (90.1%) had HER2-negative primary tumors. Twelve (54.5%) patients had visceral disease and 11 (50%) had received 2 or more prior lines of treatment for advanced disease.

Effect of lapatinib on HER2-positive CTCs

A median of 130 HER2-positive CTCs (range 1–617) per patient were detected at baseline among the 21 evaluable patients; HER2 expression (Fig 2) was evident in 93.45% of the total number of CTCs detected in these patients.

At the end of the first treatment cycle, a decrease in HER2-positive CTC counts was observed in 14 (66.6%) patients (95% C.I: 49.9%-90.1%); the median percentage of decrease per patient was 100% (range, 45–100%). In 5 (23.8%) patients, HER2-positive CTC counts increased and in one (4.8%) remained stable (Fig 3). In one (4.8%) patient although blood sample was not available for CTC analysis after the end of the first cycle, treatment with lapatinib was continued due to lack of clinical disease progression. At the end of the second treatment cycle, HER2-positive CTCs declined in 16 (76.2%) of 21 patients (95% C.I: 58.0%-94.4%). The median time to nadir counts was 1 month (range, 1–5 months). Total CTC and HER2-positive CTC counts during treatment in all patients are presented in Table 2. Furthermore, Fig 4 depicts the patient-specific trajectories of HER2-positive CTCs.

Two patients had HER2-positive primary tumors and both had received prior trastuzumab-based therapy (# 8 and #12, Table 1). In both patients CTC levels were also reduced significantly by the end of the first and second cycle of treatment (Table 2). After the completion of the first and second cycles of treatment, a median of 2 (range 0–542) and 2 (range 0–513) HER2-positive CTCs were identified per patient, respectively ($p = 0.103$ and $p = 0.013$, post-first and post-second cycles, respectively, compared to the baseline values) (Fig 5). On the other hand, no difference in the median number of HER2-negative CTCs per patient was evident between baseline and post-first ($p = 0.625$) or post-second cycle ($p = 0.156$).

Effect of lapatinib on CTCs according to outcome

A total of 120 treatment cycles were administered (median 4 cycles per patient, range 0.6–27.4). At the time of data cut-off, treatment had been discontinued in 12 (57%) patients due to disease progression, in six (28.6%) due to CTC progression, in one (4.8%) due to both clinical and CTC progression and in one due to toxicity; one patient was still on treatment and one withdrew consent after 3 cycles prior to the documentation of disease or CTC progression. Disease evaluation, revealed stable disease as best response in 11 (52.4%) patients (95% C.I: 31.02%-73.74%) and progressive disease in 10 (47.6%) (Table 2); no objective responses to lapatinib treatment were observed. Median PFS was 4.0 months (range, 1.1–27.4 months, 95% CI: 2.471–5.462) and the 1-year PFS rate was 14.3%. A Kaplan-Meier estimate of PFS is presented as a curve in Fig 6. In seven (33.3%) of 21 patients treatment was administered for a period of 6–27.4 months (Table 2).

In patients with clinically stable disease, a median of 105 HER2-positive CTCs per patient (range 10–305) were detected at baseline. After the completion of the first and second cycles of treatment, HER2-positive CTC counts declined to a median of 0 per patient at both timepoints (range 0–500 and 0–175, respectively) (post-first, $p = 0.193$ and post-second, $p = 0.018$) (Fig 7A). On the contrary, in patients with clinical disease progression, no statistically

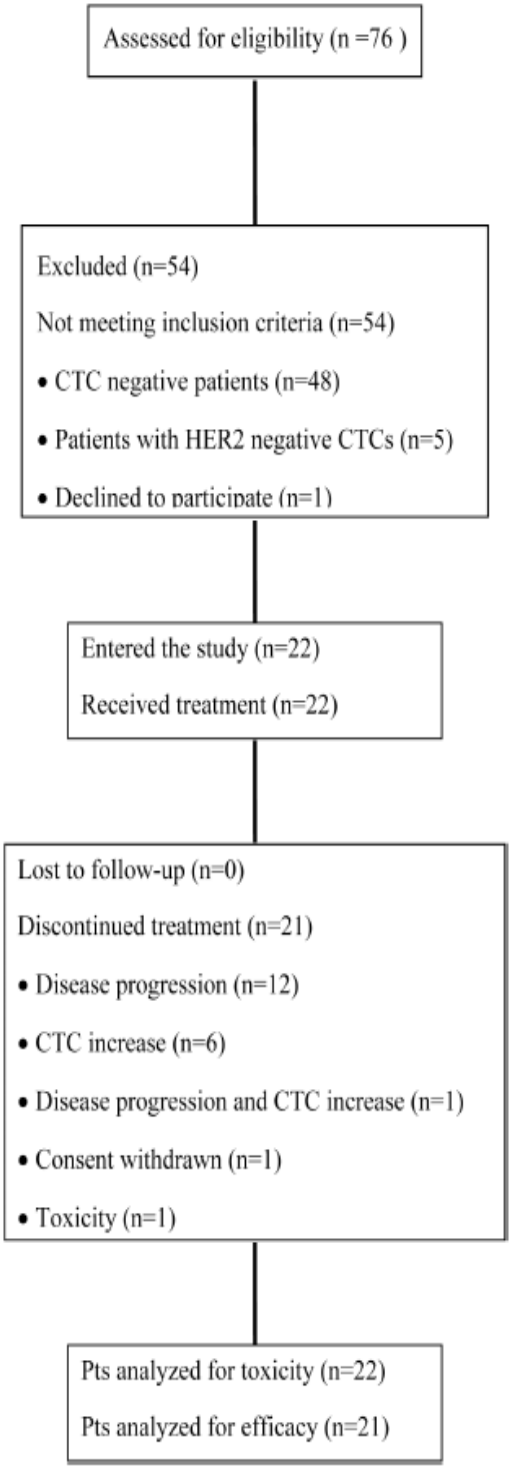


Fig 1. CONSORT flow diagram of the study.

doi:10.1371/journal.pone.0123683.g001

Table 1. Patient characteristics.

	Patients	
	n = 22	%
Age		
Median (min-max)	62.5 (37–77)	
Menopausal status		
Pre-menopausal	7	31.8
Post-menopausal	15	68.2
HER2 status of primary tumor		
Positive	2	9.1
Negative	20	90.1
Hormone receptor status		
ER positive PR positive	14	63.6
ER positive PR negative	4	18.2
ER negative PR positive	2	9.1
Uknown	2	9.1
Disease sites		
Visceral	12	54.5
Non-visceral	10	45.5
Number of prior regimens		
1	11	50.0
≥2	11	50.0
Prior hormone therapy in the metastatic setting		
Yes	20	90.9
No	2	9.1

doi:10.1371/journal.pone.0123683.t001

significant differences were observed between the baseline HER2-positive CTC counts and the counts after the completion of the first ($p = 0.275$) or second ($p = 0.250$) cycles of treatment (Fig 7B).

Evaluation of HER2 and EGFR expression on CTCs at baseline and on progression

HER2 and EGFR expression on CTCs was evaluated at baseline and on progression (either clinical or CTC progression) in 19 out of 21 patients; one patient was still on treatment at the time of data cut-off and the other withdrew consent while clinically stable and in CTC response. The number of HER2-positive CTCs remained decreased at the end-of-treatment sample (median 95 per patient, range 0–513) albeit the difference was not significant compared to the baseline values ($p = 0.409$). The mean percentage of HER2-negative CTCs increased from 2.4% (range, 0–19.4%) per patient to 30.6% (range, 0–100%) in the end of treatment sample ($p = 0.03$). In addition, 21.05% of patients harbored HER2-negative CTCs at baseline, compared to 52.94% on progression ($p = 0.667$), whereas, seven (36.8%) patients had exclusively HER2-negative CTCs. Moreover, 38.04% of the total CTCs detected on progression were HER2-negative (compared to only 1.4% at baseline).

Separate cytospins were evaluated at the same time-points for EGFR expression; all CTC-positive patients had EGFR-positive CTCs on progression compared to 62.5% at baseline ($p = 0.054$). In addition, both the median number as well as the median percentage of EGFR-positive CTCs per patient increased from 1 and 2% at baseline, to 4 and 87% on the progression

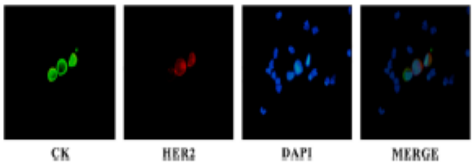


Fig 2. A representative picture of CTCs detected on a patient's cytospin. Cells were double stained using A45 B/B3 (green), HER2 (red) antibodies, and DAPI (blue) and evaluated by immunofluorescence microscopy. Presented is a HER2-negative CTC in comparison with two HER2-positive CTCs.

doi:10.1371/journal.pone.0123683.g002

sample, respectively, albeit the differences were not statistically significant. Similarly, the ratio of EGFR-positive CTCs/total CTCs detected in all patients increased from 17.1% at baseline to 37.6% on progression.

Toxicity

Twenty-two patients were evaluable for toxicity. The most common adverse events of any grade were fatigue, diarrhoea and rash reported in 10 (45.4%), 12 (54.5%) and seven (31.8%) patients, respectively (S1 Table). Nausea and vomiting occurred in six (27.3%) patients, whereas paronychia and epistaxis was recorded in four (18.2%) patients each. In general, the toxicity profile of the regimen was easily manageable. One patient presented colitis and gastritis of grade III on day 17 of cycle 1 that persisted despite dose reduction. In this patient, treatment was discontinued before the completion of the first cycle. Another patient withdrew consent after the completion of cycle 3 because of rash, stomatitis and diarrhea all grade II in severity.

Discussion

CTCs have been shown to persist after previous therapy both in early and metastatic disease and their presence is predictive of subsequent disease recurrence [19,20,24]. These cells are deemed resistant to treatment and are possibly involved in tumor regrowth. Therefore, there is an unmet need to identify effective therapies and new therapeutic targets in patients with "therapy-resistant" CTCs.

A significant discordance between the molecular profile of the primary tumor and corresponding metastases [25,26] as well as between the primary tumor and corresponding CTCs [12–15,27], has questioned the conventional approach of treatment administration according to the characteristics of the primary tumor. In particular, it has been shown that HER2 amplification may be acquired during breast cancer progression [12], whereas in other studies,

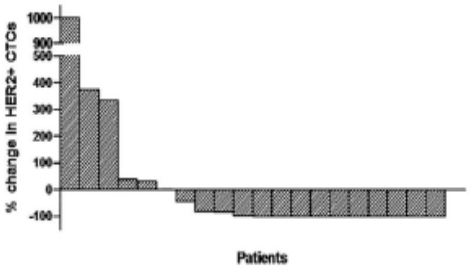


Fig 3. Waterfall plot of the % change in HER2-positive CTC numbers in patients treated with lapatinib (n = 20) after the completion of the first treatment cycle as compared to the baseline; in one patient no information on CTC counts was available.

doi:10.1371/journal.pone.0123683.g003

Table 2. Total CTCs and HER2-positive CTC counts during lapatinib treatment and patient outcome.

Patient no	Baseline		Post-1st		Post-2nd		Post-3rd		Post-4th		Post-5th		Post-6th		Post-7th		Post-8th		Best response (cycles on Tx)
	CTC counts																		
	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	Total	HER2	
1	133	125	551	542	2	2	46	46											PD (3)
2	201	201	281	281															PD (1)
3	107	107	3	3	33	32	95	95											PD (3)
4	37	37	0	0	MV[a]	MV													PD (2)
5	53	53	53	53	0	0	0	0	0	0	21	21	0	0	4	4			SD (7)
6	617	617	107	107	0	0	230	230											PD (3)
7	31	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	18	60	60			SD (7)
8	170	170	30	30	5	3	872	872	1	1	0	0	252	250	23	23	1	1	SD (27, ongoing)
9	178	178	0	0	2	2	1	1											PD (3)
10	10	10	MV	MV	0	0	0	0	0	0	MV	MV	314	314	67	67	0	0	SD (10)
11	105	105	509	500	0	0	MV	MV	0	0	0	0	21	21	206	206			SD (7)
12	183	183	1	1	0	0	22	22	0	0	4	4	447	431	127	59	5	5	SD (15)
13	292	292	0	0	68	68	4	4	991	991	0	0	1	1					SD (6)
14	1	1	0	0	78	78	122	121											PD (3)
15	130	130	0	0	64	64													PD (2)
16	11	11	121	121	175	175													SD (2)
17	321	321	420	420	513	513													PD (2)
18	406	406	398	223	0	0	MV	MV											PD (3)
19	160	136	0	0	0	0	MV	MV	107	97	MV	MV							SD (5)
20	507	305	0	0	59	47	3	1											SD (3)
21	31	25	0	0	4	4	6	3	702	471	3	1							SD (5)

Presented are the baseline values and the values till the completion of the 8th cycle.

[a]MV: missing value

doi:10.1371/journal.pone.0123683.t002

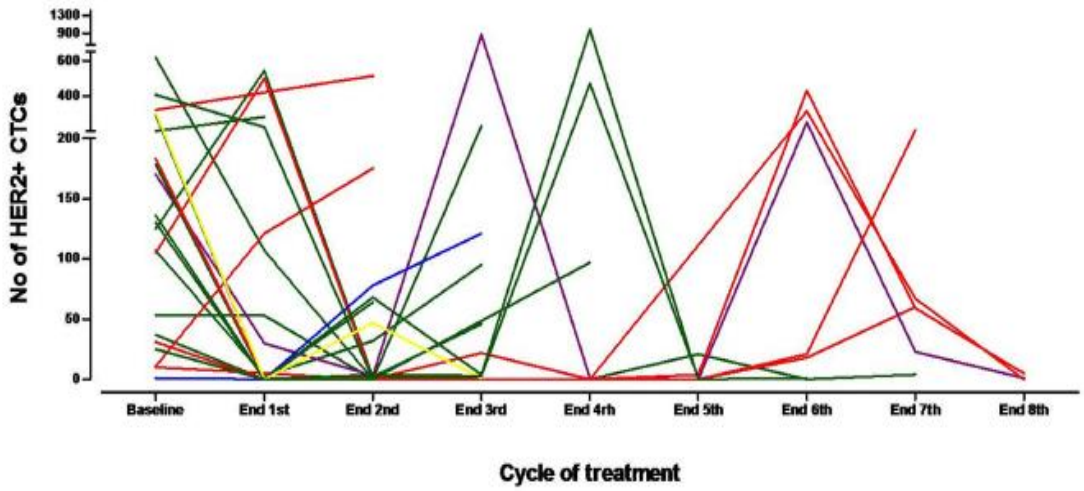


Fig 4. Patient-specific trajectories of HER2-positive CTCs during the first 8 cycles of treatment. The trajectories of CTCs are marked red in patients that discontinued treatment due to increase in CTC counts (n = 6), green in cases with disease progression (n = 12) and blue for both CTC increase and disease progression (n = 1). One patient withdrew consent (depicted in yellow) and one was still on treatment at the time of the analysis (purple).

doi:10.1371/journal.pone.0123683.g004

clinically relevant discrepancies in HER2 expression on CTCs and in corresponding primary tumors were reported [13,15,27]. On the other hand, CTCs are increasingly considered as a "liquid biopsy" of the tumor at the time of blood sampling whereas HER2-positive CTCs have been associated with poor clinical outcome in early breast cancer [17,28,29]. We have previously demonstrated the effectiveness of trastuzumab in eliminating CK-19 mRNA-positive CTCs in breast cancer patients after prior chemotherapy exposure [30]. In the current study we further demonstrate that lapatinib is effective in decreasing HER2-positive CTC counts in patients with MBC irrespectively of the HER2 status of the primary tumor.

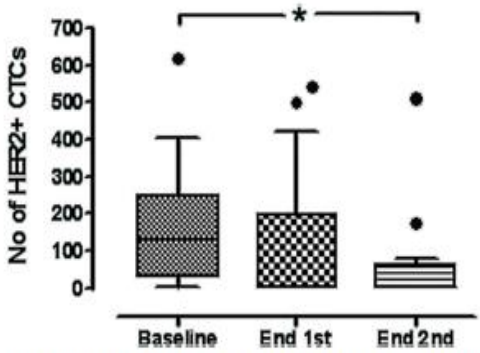


Fig 5. Box-plot of total HER2-positive CTC counts detected in the whole group of patients at baseline and after the completion of the first and second treatment cycles. Shown are the median values ± SD of HER2-positive CTC numbers. HER2-positive CTCs declined from a median of 130 per patient (range 1–617), to a median of 2 (range 0–542) (p = 0.103) and 2 per patient (range 0–513) at the end of the first and second treatment courses, respectively (p = 0.013). Boxes represent the 25th and 75th percentile; line within the box shows the median value (Whiskers: Tukey).

doi:10.1371/journal.pone.0123683.g005

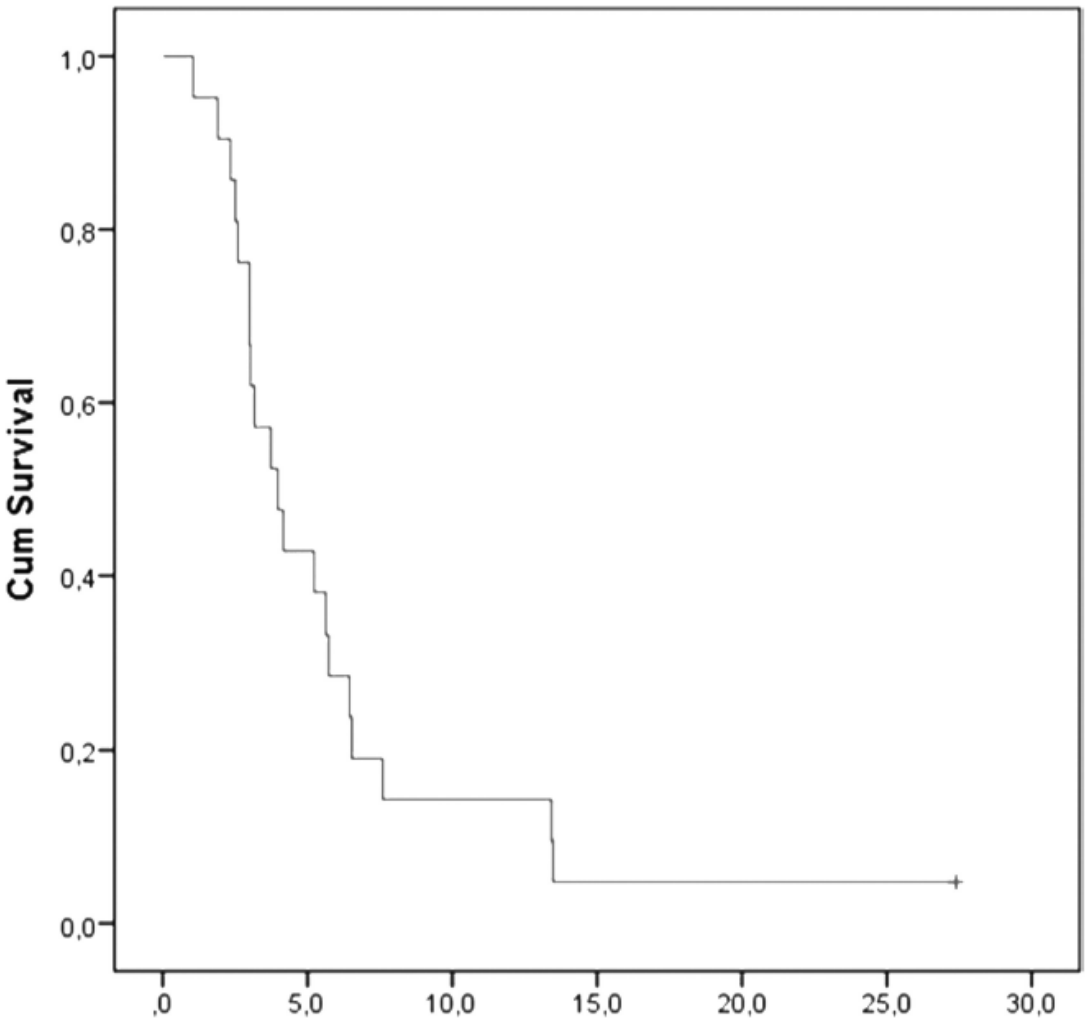


Fig 6. Kaplan-Meier estimate of Progression-Free-Survival (PFS) in patients with metaststic breast cancer receiving lapatinib (n = 21).

doi:10.1371/journal.pone.0123683.g006

The decline in the levels of HER2-positive CTCs was an early effect of lapatinib treatment since by the end of the first treatment cycle a reduction was observed in 14 (66.6%) patients and the median time to nadir CTC levels was 1 month (range, 1–5 months). Moreover, lapatinib effectively decreased CTC counts in 2 patients with HER2-positive tumors despite prior administration of trastuzumab-based therapy which could influence the effect of lapatinib. This finding suggests that lapatinib can effectively target CTCs presenting resistance to trastuzumab.

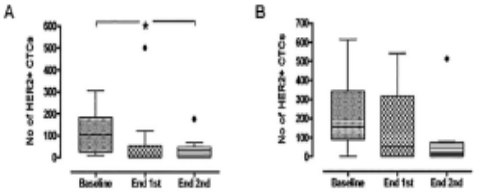


Fig 7. Box-plot of total HER2-positive CTC counts detected in patients with stable disease (A) and progressive disease (B) as best response to treatment at baseline and after the completion of the first and second treatment cycles. Shown are the median values ± SD of HER2-positive CTC numbers. In patients with stable disease CTCs declined from a median of 105 per patient (range 10–305) at baseline to 0 (range 0–500) and 0 (range 0–175), post-first ($p = 0.193$) and post-second cycles ($p = 0.018$), respectively. No significant differences in CTC counts were observed in patients with progressive disease. Boxes represent the 25th and 75th percentile; line within the box shows the median value (Whiskers: Tukey).

doi:10.1371/journal.pone.0123683.g007

Similarly, in preclinical studies, lapatinib was effective against breast cancer with resistance to trastuzumab [31] whereas, lapatinib added to capecitabine provided superior efficacy compared to capecitabine alone in women with HER2-positive, MBC progressing after prior trastuzumab-based therapy [32].

It should be noted here that any alteration in CTC counts compared to the baseline values was considered as a change and that this trial was not designed to determine which level of CTC change could be clinically relevant. Moreover, due to the small number of patients included in this trial, the above results need to be confirmed in future studies.

The number of HER2-positive CTCs detected in the whole group of patients was also reduced significantly after the end of the second cycle of treatment. This effect was specific for the HER2-positive CTCs, since HER2-negative CTC counts were not significantly altered. When CTC kinetics was evaluated separately in patients with disease stabilization or disease progression, it was shown that HER2-positive CTCs declined significantly only in patients with stable disease. This observation indicates that disease stabilization could be related to the depletion of the HER2-positive CTC population during treatment with lapatinib.

The monitoring of the molecular changes on CTCs during treatment with targeted agents provides the unique opportunity to investigate the mechanisms that contribute to drug resistance [33]. In the current study, the pool of HER2-positive CTCs was numerically lower in the samples obtained on progression compared to the pre-treatment sample, although this difference was not statistically significant; on the other hand, HER2-negative CTCs counts increased during progression. These observations suggest the emergence of a population of lapatinib-resistant HER2-positive and HER2-negative CTCs potentially associated with disease progression.

When EGFR expression was evaluated at the same time-points, it was shown that more patients harbored EGFR-positive CTCs on disease progression compared to the pre-treatment sample and this difference showed a trend for statistical significance. In addition, the percentage of EGFR-positive CTCs per patient, as well as the ratio of EGFR-positive CTCs among the total CTCs detected, was increased at the end-of-treatment sample. It has been shown that lapatinib lacks efficacy in HER2-negative, EGFR-overexpressing inflammatory breast cancer [34]. In our study, the pool of HER2-negative CTCs was increased in the blood samples obtained on progression. Thus, one could postulate that EGFR-positive/HER2-negative CTCs may contribute to lapatinib resistance.

No objective responses were observed in this cohort of patients. However, disease and/or CTC-stabilization of 6–27 months duration were evident in seven out of 21 patients. Similarly, lapatinib failed to induce clinical responses in patients with HER2-negative MBC and HER2-

positive [35] or EGFR-positive [36] CTCs. However, in the aforementioned study, one of seven patients with HER2-positive CTCs presented disease stabilization lasting for 8.5 months [35]. In these trials lapatinib was administered in MBC patients progressing after prior treatment. In addition, CTC characterization was performed by immunofluorescence staining for HER2 or EGFR by using the fourth spare filter of the CellSearch System. In this trial we demonstrate the feasibility of targeting CTCs resistant to previous therapy in non-progressing patients using a CTC-directed approach as maintenance therapy. In addition, HER2 characterization was performed by immunofluorescent staining of CTCs isolated by density gradient centrifugation of peripheral blood and not selected based on EpCam-positivity as is the case of the CellSearch system.

A possible limitation of our study is that HER2-positivity was not scored quantitatively; HER2 expression was subjectively characterized as positive or negative according to the expression levels observed in the negative control. Moreover, the cut-off for patient eligibility was arbitrarily set as the detection of at least one HER2-positive CTC. Finally, one could argue that the observed effect of lapatinib on CTCs, does not necessarily imply that the drug is also clinically effective in this setting; the differential kinetics of CTCs in progressing patients compared to those with disease stabilization could simply reflect the natural course of the disease and should not necessarily be assigned to the effect of lapatinib. Nevertheless, it should be also noted that CTCs have been previously demonstrated to be a surrogate marker of treatment efficacy [37].

The failure of lapatinib to induce clinical responses in the present as well in other studies [35,36] designed to target a marker present on CTCs rather than the primary tumor, should not be considered as a failure of this strategy. We have previously shown that the administration of 6 cycles of trastuzumab in patients with HER2-negative early breast cancer harbouring CK-19mRNA-positive CTCs both before and after the completion of adjuvant chemotherapy, was associated with a significantly lower incidence of clinical relapses and a longer disease-free survival compared to patients who received the standard of care [38]. Larger studies such as the TREAT CTC trial (NCT01548677) in early breast cancer and the DETECT III trial (NCT01619111) in metastatic disease, will further investigate whether treatment individualization according to the molecular characteristics of CTCs could be a practice changing approach in breast cancer.

In conclusion, the results of this study demonstrate that lapatinib is effective in decreasing HER2-positive CTC counts in patients with MBC, and that this effect is correlated with disease stabilization. Furthermore they show that HER2-negative CTC counts increase on disease progression. The above observations imply that CTC isolation and molecular characterization could be a novel tool for the real time phenotyping of tumor cells during treatment with targeted agents. Moreover, our results suggest that tailoring therapy according to targets present on CTCs could be clinically relevant in patients with breast cancer. To this end, standardized assays and validated cut-offs should be established in order to use these targets for the individualization of treatment.

Supporting Information

S1 CONSORT Checklist. CONSORT checklist.
(DOC)

S1 Protocol. Trial Protocol.
(DOC)

S1 Table. All grades toxicity observed in all patients and all cycles (n = 22).
(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SA VG DM. Performed the experiments: HM. Analyzed the data: SA HM DH MAP. Contributed reagents/materials/analysis tools: VG. Wrote the paper: SA AK VG DM. Took care of the patients: KK AK. Retrieved patient data: KK AK. Developed the immunofluorescent protocol: GK.

References

1. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, et al. (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. Cancer Cell 13: 58–68. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.003 PMID: 18167340
2. Ignatiadis M, Georgoulias V, Mavroudis D (2008) Circulating tumor cells in breast cancer. Curr Opin Obstet Gynecol 20: 55–60. doi: 10.1097/GCO.0b013e3282f22b2e PMID: 18197007
3. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, et al. (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. N Engl J Med 353: 793–802. PMID: 16120859
4. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, et al. (2002) 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 20: 3404–3412. PMID: 12177100
5. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, et al. (2006) 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 24: 3756–3762. PMID: 16769987
6. Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Xenidis N, et al. (2009) Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. Br J Cancer 101: 589–597. doi: 10.1038/sj.bjc.6605183 PMID: 19623181
7. Androulakis N, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Bozionelou V, et al. (2012) Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer. Br J Cancer 106: 1917–1925. doi: 10.1038/bjc.2012.202 PMID: 22669159
8. Reinholz MM, Kitzmann KA, Tenner K, Hillman D, Dueck AC, et al. (2011) Cytokeratin-19 and mammaglobin gene expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients enrolled in North Central Cancer Treatment Group trials, N0234/336/436/437. Clin Cancer Res 17: 7183–7193. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0981 PMID: 21976532
9. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, et al. (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med 351: 781–791. PMID: 15317891
10. Lianidou ES, Markou A (2011) Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. Clin Chem 57: 1242–1255. doi: 10.1373/clinchem.2011.165068 PMID: 21784769
11. Powell AA, Talasaz AH, Zhang H, Coram MA, Reddy A, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. PLoS One 7: e33788. doi: 10.1371/journal.pone.0033788 PMID: 22586443
12. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, et al. (2004) HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 9393–9398. PMID: 15194824
13. Sieuwerts AM, Mostert B, Bolt-de Vries J, Peeters D, de Jongh FE, et al. (2011) mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. Clin Cancer Res 17: 3600–3618. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0255 PMID: 21505063
14. Munzone E, Nole F, Goldhirsch A, Botteri E, Esposito A, et al. (2010) Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer. Clin Breast Cancer 10: 392–397. doi: 10.3816/CBC.2010.n.052 PMID: 20920984
15. Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, et al. (2007) Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. Breast Cancer Res 9: R74. PMID: 17963511
16. Alix-Panabieres C, Pantel K Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. Clin Chem 59: 110–118. doi: 10.1373/clinchem.2012.194258 PMID: 23014601
17. Apostolaki S, Perraki M, Kallergi G, Kafousi M, Papadopoulos S, et al. (2009) Detection of occult HER2 mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of

their prognostic relevance. Breast Cancer Res Treat 117: 525–534. doi: 10.1007/s10549-008-0239-3 PMID: 19016323

18. Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, et al. (2008) Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients. Breast Cancer Res 10: R80. doi: 10.1186/bcr2149 PMID: 18822183
19. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, Perraki M, Kalbakis K, et al. (2009) Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. J Clin Oncol 27: 2177–2184. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0497 PMID: 19332733
20. Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, et al. (2007) Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. Ann Oncol 18: 1623–1631. PMID: 17515404
21. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, et al. (2006) 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 12: 4218–4224. PMID: 16857794
22. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, et al. (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst 92: 205–216. PMID: 10655437
23. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, et al. (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clin Cancer Res 10: 8152–8162. PMID: 15623589
24. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, et al. (2005) Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. J Clin Oncol 23: 1420–1430. PMID: 15735118
25. Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G, Bettelli S, Maiorana A, et al. (2008) Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. Oncologist 13: 838–844. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0048 PMID: 18650259
26. Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, et al. (2001) Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. J Natl Cancer Inst 93: 1141–1146. PMID: 11481385
27. Ignatiadis M, Rothe F, Chaboteaux C, Durbecq V, Rouas G, et al. (2011) HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. PLoS One 6: e15624. doi: 10.1371/journal.pone.0015624 PMID: 21264346
28. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, et al. (2008) Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. Clin Cancer Res 14: 2593–2600. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4758 PMID: 18451221
29. Wulfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zanker KS, et al. (2006) HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. Clin Cancer Res 12: 1715–1720. PMID: 16551854
30. Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, et al. (2004) 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 10: 8185–8194. PMID: 15623593
31. O'Brien NA, Browne BC, Chow L, Wang Y, Ginther C, et al. (2010) Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. Mol Cancer Ther 9: 1489–1502. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1171 PMID: 20501798
32. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, et al. (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 355: 2733–2743. PMID: 17192538
33. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, et al. (2008) Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. N Engl J Med 359: 366–377. doi: 10.1056/NEJMoa0800668 PMID: 18596266
34. Johnston S, Trudeau M, Kaufman B, Boussen H, Blackwell K, et al. (2008) Phase II study of predictive biomarker profiles for response targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) in advanced inflammatory breast cancer with lapatinib monotherapy. J Clin Oncol 26: 1066–1072. doi: 10.1200/JCO.2007.13.9949 PMID: 18212337
35. Pestrin M, Bessi S, Puglisi F, Minisini AM, Masci G, et al. (2012) Final results of a multicenter phase II clinical trial evaluating the activity of single-agent lapatinib in patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells. A proof-of-concept study. Breast Cancer Res Treat 134: 283–289. doi: 10.1007/s10549-012-2045-1 PMID: 22476856

36. Stebbing J, Payne R, Reise J, Frampton AE, Avery M, et al. (2013) The efficacy of lapatinib in metastatic breast cancer with HER2 non-amplified primary tumors and EGFR positive circulating tumor cells: a proof-of-concept study. PLoS One 8: e62543. doi: 10.1371/journal.pone.0062543 PMID: 23667487

37. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, et al. (2006) Circulating tumor cells versus imaging—predicting overall survival in metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 12: 6403–6409. PMID: 17085652

38. Georgoulias V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, et al. (2012) Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. Ann Oncol 23: 1744–1750. doi: 10.1093/annonc/mds020 PMID: 22377561