



## **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής  
Τομέας Παθολογίας  
Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ TRASTUZUMAB (HERCEPTIN)  
ΣΕ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ CK-19 mRNA ΘΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΣΤΟ  
ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΜΥΕΛΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ, ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ  
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.**

## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Βασιλική Γ. Μποζιονέλου**  
Παθολόγος Ογκολόγος

**Ηράκλειο 2012**

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### **Γενικό μέρος**

1. Επιδημιολογία
2. Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού
3. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (Minimal Residual Disease, MRD)
4. Βιολογία της μετάστασης
5. Μέθοδοι ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων
6. Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού
7. Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στον πρώιμο καρκίνο του μαστού
  - A. Διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (DTCs)
  - B. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)
    - B1. Προγνωστική αξία των CTCs πριν τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία
    - B2. Προγνωστική αξία των CTCs μετά τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία
    - B3. Προγνωστική αξία των CTCs σε πρώιμο καρκίνο μαστού με αρνητικούς λεμφαδένες
    - B4. Προγνωστική αξία των CTCs κατά τη διάρκεια της συμπληρωματικής ορμονοθεραπείας
    - B5. Προγνωστική αξία των CTCs σε μοριακούς υποτύπους του πρώιμου καρκίνου του μαστού
8. Ετερογένεια και χρήση πολλαπλών δεικτών στην ανίχνευση CTCs
9. CTCs με φαινότυπο βλαστικών κυττάρων
10. Δράση της χημειοθεραπείας/ορμονοθεραπείας στα DTCs/ CTCs
11. Στόχευση των μικρομεταστατικών κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα
12. HER-2
13. Έκφραση του HER2 στα DTCs
14. Έκφραση του HER2 στα CTCs
15. Trastuzumab (Herceptin)
16. Στόχος της διατριβής

## **Πειραματικό μέρος**

### **A. Μελέτη της επίδρασης του trastuzumab στα CK19mRNA-θετικά CTCs ή/και DTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού**

1. Ασθενείς / Κριτήρια ένταξης

2. Δείγματα / Θεραπεία

2.1. Λήψη δειγμάτων

2.2. Θεραπεία

2.3. Παρακολούθηση

3. Μέθοδοι

Μοριακή ανίχνευση CK19mRNA+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών

3.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων

3.2. Απομόνωση ολικού RNA

3.3. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

3.4. Έλεγχος ποιότητας των RNA δειγμάτων της RT-PCR

3.5. Ανίχνευση του CK19mRNA με RT-PCR

3.6. Ανίχνευση του HER2mRNA με RT-PCR

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

3.8. Ανοσοϊστοχημεία για την έκφραση του HER-2 στον πρωτοπαθή όγκο

3.9. Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH) για έκφραση του HER-2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα και ανευσωμία

### **B. Μελέτη της επίδρασης του trastuzumab στην κλινική έκβαση των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά κύτταρα μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας**

1. Σκεπτικό

2. Ασθενείς και μέθοδοι

3. Δείγματα και ανίχνευση CK19mRNA

4. Θεραπεία και παρακολούθηση
5. Στόχοι – στατιστική ανάλυση

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **A. Μελέτη της επίδρασης του trastuzumab στα CK19mRNA-θετικά CTCs ή/και DTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού**

- A.1. Χαρακτηριστικά ασθενών προ της ένταξης στη μελέτη
- A.2. Ανταπόκριση στο trastuzumab του CK-19mRNA με nested RT-PCR
- A.3. Ανταπόκριση στο trastuzumab του CK-19mRNA με real-time RT-PCR
- A.4. Χορήγηση ανοσοσφαιρίνης
- A.5. Τοξικότητα του trastuzumab

### **B. Τυχασιοποιημένη κλινική μελέτη φάσης II της χορήγησης trastuzumab σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας**

- B.1. Ασθενείς
- B.2. Ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων
- B.3. Έκφραση HER2 στα CK+ CTCs
- B.4. Υποτροπή και επιβίωση

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα και τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, στις γυναίκες<sup>1</sup>. Στη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα η επίπτωση της νόσου αυξήθηκε στις αναπτυγμένες χώρες λόγω αλλαγών στις διατροφικές συνήθειες και τη γονιμότητα, συγκεκριμένα λόγω αυξημένης κατανάλωσης τροφών πλούσιων σε ζωικό λίπος και τεκνοποίησης σε ηλικία μεγαλύτερη των 30 ετών. Αντίθετα, τις τελευταίες 2 δεκαετίες παρατηρείται μείωση στη θνητότητα από τη νόσο λόγω της δυνατότητας για πρωιμότερη διάγνωση και αποτελεσματικότερη θεραπεία.

Με τη συστηματική εφαρμογή του μαστογραφικού screening, το 75-80% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού είναι σταδίου I ή II κατά τη διάγνωση και τα 2/3 περίπου αυτών έχουν ιστολογικά αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Επίσης, το 5% περίπου των ασθενών έχουν κλινικά ανιχνεύσιμη μεταστατική νόσο κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί στην πραγματικότητα μια ετερογενή νοσολογική οντότητα με κύριο χαρακτηριστικό την τάση για πρώιμη αιματογενή διασπορά των καρκινικών κυττάρων που καθορίζει και την πρόγνωση<sup>2</sup>. Το ποσοστό των ασθενών που, ενώ κλινικά είναι ελεύθεροι μεταστάσεων, εντούτοις έχουν μικρομεταστατική νόσο κατά τη στιγμή της διάγνωσης φτάνει το 30-40%<sup>2</sup>.

## **2. Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού**

Οι διάφοροι γνωστοί προγνωστικοί παράγοντες, όπως το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης των κυττάρων και η έκφραση ορμονικών υποδοχέων, παρέχουν έμμεσες μόνο πληροφορίες για την επιθετικότητα της νόσου και την πιθανότητα απομακρυσμένης διασποράς. Η παρουσία διηθημένων από καρκινικά κύτταρα μασχαλιαίων λεμφαδένων κατά τη διάγνωση, αποτελεί τον πιο σημαντικό δυσμενή προγνωστικό παράγοντα που σηματοδοτεί το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη συστηματικής νόσου<sup>2</sup>. Εντούτοις, το 30% περίπου των γυναικών χωρίς διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων στο αρχικό χειρουργείο θα αναπτύξει μεταστατική νόσο και θα πεθάνει από αυτή εντός των πρώτων 5-10 χρόνων από τη διάγνωση, ενώ το 10-20% αυτών με εξαρχής απομακρυσμένες μεταστάσεις έχει αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες<sup>3,4</sup>. Η υποτροπή επομένως σε απομακρυσμένες θέσεις μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και απουσία διήθησης των μασχαλιαίων λεμφαδένων, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία της αιματογενούς διασποράς των καρκινικών κυττάρων στη διαδικασία αυτή.

## **3. Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (Minimal Residual Disease, MRD)**

Το καθιερωμένο για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού σύστημα TNM, δεν μπορεί με ακρίβεια να διακρίνει την υποομάδα εκείνη των γυναικών με μικρούς όγκους και αρνητικούς

μασχαλιαίους λεμφαδένες οι οποίες υποτροπιάζουν και πεθαίνουν από τον καρκίνο του μαστού<sup>5</sup>. Γι' αυτό πολλοί ερευνητές υπέθεσαν ότι η ανίχνευση «μικρομεταστάσεων» στο μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα των ασθενών μπορεί να βελτιώσει την πληροφορία που παίρνουμε από το TNM σύστημα σχετικά με την πρόγνωση. Επιπλέον, στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, τα ανιχνεύσιμα μικρομεταστατικά κύτταρα αμέσως μετά τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου αποτελούν στόχο της συμπληρωματικής θεραπείας. Κατά συνέπεια, η παρακολούθηση αυτών των κυττάρων θα μπορούσε να παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της ανταπόκρισης της ασθενούς στη θεραπεία. Ωστόσο, η μελέτη της μικρομεταστατικής νόσου παραμένει σε ερευνητικό επίπεδο, χωρίς να έχει ακόμη καθιερωθεί στην κλινική πράξη ως βασικό εργαλείο για τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, τη λήψη θεραπευτικής απόφασης και την παρακολούθηση των ασθενών<sup>6</sup>.

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 ( $\leq 0.2$  mm) στο μυελό των οστών (DTCs) ή σε άλλους ιστούς πλην των περιοχικών λεμφαδένων (π.χ. ωθήκες που αφαιρέθηκαν προφυλακτικά) ταξινομείται σε μια νεοσυσταθείσα (M) κατηγορία με τον όρο M0(i+). Παρόλα αυτά, με το δεδομένο ότι δεν υπάρχει κλινικά ή/και απεικονιστικά μεταστατική νόσος, η σταδιοποίηση των ασθενών δεν αλλάζει και γίνεται με βάση τα (T) και (N).



#### 4. Βιολογία της μετάστασης

Η ανάπτυξη μεταστάσεων οφείλεται στη «διασπορά» των καρκινικών κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου σε άλλα όργανα. Η μελέτη της μικρομεταστατικής νόσου έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης. Ο Klein και συν.<sup>7</sup> έδειξαν ότι τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα του μυελού των οστών είχαν πιο πρώιμες γενωμικές αλλαγές σε σχέση με τα καρκινικά κύτταρα του πρωτοπαθούς όγκου. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό ότι η διασπορά των καρκινικών κυττάρων είναι πρώιμο φαινόμενο που πιθανότατα συμβαίνει νωρίς κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης<sup>7</sup>. Συνεπώς, ακόμη και όταν η διάγνωση γίνεται σε πρώιμο στάδιο, ο καρκίνος του μαστού θα πρέπει να θεωρείται σε πολλούς ασθενείς ως ήδη συστηματική νόσος. Πρόκειται για μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία διαδοχικών βημάτων που ξεκινά με την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος και καταλήγει στον πολλαπλασιασμό τους και το σχηματισμό δευτεροπαθών αποικιών σε απομακρυσμένες θέσεις. Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (μικρότερο του 0.01%) των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνει τελικά αυτό το στόχο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαδικασία της μετάστασης είναι ιδιαίτερα αναποτελεσματική και ευνοεί την επιβίωση μιας μικρής μειοψηφίας καρκινικών κυττάρων<sup>8</sup>. Σύμφωνα με τα στοιχεία αυτά, η μελέτη των διεσπαρμένων/κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ή, όπως αλλιώς ονομάζεται της μικρομεταστατικής νόσου, παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες και επιτρέπει το χαρακτηρισμό των ασθενών υψηλού κινδύνου για υποτροπή και την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης<sup>9,10</sup>.

## 5. Μέθοδοι ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων

Όπως έχουν δείξει διάφοροι ερευνητές, είναι δυνατή η ανίχνευση των μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων τόσο στο περιφερικό αίμα (κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα – *Circulating Tumor Cells, CTCs*) όσο και στο μυελό των οστών (δισσπαρμένα καρκινικά κύτταρα – *Disseminated Tumor Cells, DTCs*) ασθενών με πρώιμο ή και μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

Η παρουσία των κυττάρων αυτών διαφεύγει των συμβατικών ιστοπαθολογοανατομικών τεχνικών, δηλαδή εξ' ορισμού δεν είναι ανιχνεύσιμα με την καθιερωμένη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Συνήθως προηγείται ένα αρχικό στάδιο εμπλουτισμού (διαβαθμιζόμενη φυγοκέντριση με τη χρήση Ficoll/Hyraque, OncoQuick, διήθηση, τεχνικές ανοσομαγνητικού διαχωρισμού-όπως διαχωρισμός κυττάρων με τη χρήση μαγνητικού πεδίου και μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με ειδικά αντισώματα).

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων (ανοσοκυτταροχημεία, ανοσοφθορισμός, κυτταρομετρία ροής) βασίζονται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά μορίων, όπως οι κυτταροκερατίνες, τα οποία εκφράζονται στα επιθηλιακής προέλευσης καρκινικά κύτταρα αλλά όχι στα μεσεγχυματικά αιμοποιητικά κύτταρα<sup>11-13</sup>. Η παρουσία των πρωτεϊνών αυτών στο περιφερικό αίμα ή/και το μυελό των οστών, αποτελεί ισχυρή ένδειξη αιματογενούς διασποράς επιθηλιακής προέλευσης νεοπλασματικών κυττάρων<sup>14</sup>. 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)<sup>15</sup>.

Μοριακές τεχνικές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της μικρομεταστατικής νόσου στο μυελό των οστών, εναλλακτικά της ευρύτερα χρησιμοποιούμενης ανοσοκυτταροχημείας. 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<sup>11-13</sup>. Διάφοροι ερευνητές έχουν συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης των μικρομεταστατικών κυττάρων<sup>16,17</sup>. 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.

Ανοσοκυτταροχημικά έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία καρκινικών κυττάρων στο μυελό των οστών σε ποσοστό 20-30% των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού<sup>15</sup>. Η ευαισθησία της μεθόδου εκτιμάται σε περίπου 1 καρκινικό κύτταρο ανά  $10^4$  έως  $10^5$  φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα<sup>18,19</sup>. Ο περιορισμός στη διαγνωστική αξία της μεθόδου οφείλεται στη διασταυρούμενη αντίδραση των χρησιμοποιούμενων μονοκλωνικών αντισωμάτων με τα φυσιολογικά κύτταρα του μυελού<sup>20-22</sup>.

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 καρκινικού κυττάρου ανά  $10^6$  μονοπύρηννα 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<sup>12</sup>.

Μια τεχνική που βασίζεται στον ανοσοφθορισμό και την κυτταρομετρία ροής αποτελεί τη βάση ενός ημι-αυτοματοποιημένου συστήματος, CellSearch system (Veridex, Warren, New Jersey, USA), το οποίο έχει πρόσφατα εγκριθεί από τον FDA. Το σύστημα αυτό επιτρέπει την ανίχνευση και 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 με αντίσωμα ειδικό για τις κυτταροκερατίνες 8,18,19, με αντίσωμα ειδικό για το CD45 και με 4'6-diamidino-2-phenylindole-2 (DAPI)<sup>23</sup>. 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<sup>24,25</sup>. 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<sup>24</sup>. Με τη FAST κυτταρομετρία, μπορεί να γίνει διέγερση φθορίζουσών χρωστικών σε 300.000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο και η εκπομπή φθορισμού συλλέγεται

με ένα εξαιρετικά μεγάλο οπτικό πεδίο. Με τον τρόπο αυτό, η ταχύτητα σάρωσης είναι 500 φορές μεγαλύτερη από την ταχύτητα σάρωσης με την τεχνική της ADM με παρόμοια ευαισθησία και αυξημένη ειδικότητα<sup>24</sup>. Οι ερευνητές προτείνουν τη συνδυασμένη χρήση της τεχνολογίας FAST και της ADM για την ανίχνευση σπάνιων CTCs σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο καρκίνου<sup>24</sup>. Εκτιμάται ότι σε πρώιμα στάδια καρκίνου, μικρομεταστατικά κύτταρα ανευρίσκονται στην κυκλοφορία σε συγκεντρώσεις 1 ανά  $10^6$  έως  $10^7$  μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος<sup>26</sup>. Αν λάβουμε υπόψη μας το κατώτερο όριο ανίχνευσης, χρειαζόμαστε ένα δείγμα με 100 εκατομμύρια αιμοποιητικά κύτταρα για να ανιχνεύσουμε 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 όμως 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<sup>24</sup>.

Μια άλλη μέθοδος έχει προταθεί για την ανίχνευση κυκλοφορούντων επιθηλιακών κυττάρων (Circulating Epithelial Tumor Cells, CETCs) χωρίς να προηγηθεί στάδιο εμπλουτισμού. Αυτή χρησιμοποιεί laser scanning κυτταρομετρητή για την ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων μετά από χρώση με αντισώματα έναντι του EpCAM και CD45 σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες<sup>25</sup>.

Πρόσφατα, ο Nagrath και συν. 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 ErCAM κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες μικροροής, και δεν απαιτεί προηγουμένως σήμανση ή άλλη επεξεργασία των δειγμάτων<sup>27</sup>.

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί χρησιμοποιώντας είτε τις μεθόδους που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα είτε αυτές που βασίζονται στα αντισώματα<sup>28</sup>. 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 μονοπύρηννα αιμοποιητικά κύτταρα ή λεμφοκύτταρα από κυτταροκίνες και η παρουσία ψευδογονιδίων της CK-19 έχουν αναφερθεί ως αίτια για τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, με τη χρήση των μεθόδων που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα<sup>28-32</sup>. 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<sup>33</sup>.

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 βάφουν 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 λήψη μέχρι την επεξεργασία του δείγματος, ο χρόνος της ανάλυσης και η θερμοκρασία κατά την επεξεργασία, τα οποία επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση<sup>34</sup>. Επιπλέον, τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να προκληθεί από την επιμόλυνση, την επαφή με ξένες επιφάνειες ή ακόμη την έκθεση σε συστατικά από λυμένα κύτταρα, όπως η αιμοσφαιρίνη. Το ενδοκυττάριο RNA μπορεί να αποδομηθεί κατά την ex vivo παραμονή του αίματος, από ειδικές και μη ειδικές ενδογενείς ριβονουκλεάσες<sup>34</sup>. 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. Πιθανολογούν ότι σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την υποξία και το κυτταρικό στρες 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<sup>34</sup>. Αξιοσημείωτο είναι ότι μεταγραφικές αποκρίσεις στο στρες συμβαίνουν μόλις 2 ώρες μετά την αιμοληψία<sup>34</sup>.

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 στρες, ιδιαίτερα όταν η ποσότητα του RNA στόχου είναι πάρα πολύ μικρή, όπως ισχύει στην 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 για 5 ημέρες μετά τη δειγματοληψία.

## **6. Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού**

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την εκτίμηση της επίπτωσης και της προγνωστικής αξίας των μικρομεταστατικών κυττάρων σε ασθενείς τόσο με πρώιμο όσο και με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

Στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, η πλειοψηφία των μελετών αναφορικά με την προγνωστική σημασία των



κυκλοφορούντων στο περιφερικό αίμα καρκινικών κυττάρων (CTCs) προέρχεται από την ομάδα του Cristofanilli και συν. (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center) με τη χρήση του CellSearch system. Ως κατώτατο όριο διάκρισης των ασθενών σε θετικούς και αρνητικούς ορίσθηκε η παρουσία 5 CTCs/7.5ml αίματος (θετικοί:  $\geq 5$  CTCs/7.5ml, αρνητικοί  $< 5$  CTCs/7.5ml).

Σε 177 ασθενείς με μετρήσιμη νόσο από μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ο αριθμός των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων πριν την έναρξη θεραπείας αποδείχθηκε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (PFS) και την ολική επιβίωση (OS)<sup>10</sup>. Συγκεκριμένα, θετικοί ασθενείς με  $\geq 5$  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 ( $< 5$  CTCs/7.5ml). Η διαφορά μεταξύ των ομάδων διατηρείται και στην 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 στην πρώτη επίσκεψη, γεγονός που υποδηλώνει ότι το 40% περίπου των αρχικά θετικών ασθενών ωφελήθηκε από τη θεραπεία<sup>10</sup>.

Οι ίδιοι ερευνητές δημοσίευσαν ανάλυση της υποομάδας των 83 από τους 177 ασθενείς, με πρόσφατα διαγνωσμένο μεταστατικό καρκίνο του μαστού που ήταν υποψήφιοι για έναρξη θεραπείας πρώτης γραμμής<sup>35</sup>. Πρόκειται για την υποομάδα που αναμένεται να έχει το μεγαλύτερο όφελος από το σχεδιασμό και την αξιολόγηση της θεραπείας με βάση προγνωστικούς παράγοντες. Η ανίχνευση κατά τη διάγνωση και η παραμονή

αυξημένων CTCs 3 με 4 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας έχει σημαντική προγνωστική αξία, ιδιαίτερα για τις γυναίκες με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία<sup>35</sup>. Με τη χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας μπορούν να αναγνωρισθούν οι ανθεκτικές στη χημειοθεραπεία ασθενείς που ενδεχόμενα θα ωφεληθούν από την έγκαιρη αλλαγή θεραπευτικού χειρισμού.

Είναι ενδιαφέρον ότι, όταν εκτός των απεικονιστικών εξετάσεων υπάρχει διαθέσιμη και η πληροφορία για την ανίχνευση των CTCs, οι ασθενείς μπορούν να σταδιοποιηθούν περαιτέρω σε υποομάδες διαφορετικής πρόγνωσης και ενδεχομένως διαφορετικής θεραπευτικής προσέγγισης. Επιπλέον, η παρακολούθηση των CTCs με το CellSearch προτείνεται ως ανώτερος δείκτης έκβασης της νόσου συγκριτικά με τις κλασικές απεικονιστικές μεθόδους<sup>36</sup>. Η πληροφορία από τα CTCs παρέχεται πιο πρώιμα, αναπαράγεται ευκολότερα και έχει ισχυρότερη προγνωστική αξία για την επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού.

Στην ίδια σειρά των 177 ασθενών με μετρήσιμη νόσο από μεταστατικό καρκίνο του μαστού, η ανίχνευση αυξημένων CTCs σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της θεραπείας συσχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση, ταχύτερη επιδείνωση της νόσου και μικρότερη επιβίωση<sup>37</sup>. Η εκτίμηση της PFS και OS από τους Hayes και συν. έγινε σε 4 διαφορετικές ομάδες ασθενών με: (ομάδα 1) <5 CTCs/7.5ml αίματος σε όλα τα δείγματα, (ομάδα 2) ≥ 5 CTCs στο αρχικό δείγμα πριν τη θεραπεία και < 5 CTCs στο τελευταίο, (ομάδα 3) < 5 CTCs στο αρχικό που αυξήθηκαν σε ≥ 5 CTCs στο τελευταίο δείγμα και (ομάδα 4) ≥ 5 CTCs 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. Αναφορικά με την ολική 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 αλλά καλύτερη από την ομάδα 4 με συνεχώς  $\geq 5$  CTCs (σχήμα 1)<sup>37</sup>.

Οι Cristofanilli και συν. έδειξαν επίσης ότι η ύπαρξη  $\geq 5$  CTCs/7.5ml αίματος σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση σε ασθενείς με ER-θετικό/HER2-αρνητικό και triple-negative μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ενώ αποτελεί προγνωστικό παράγοντα ανεξάρτητο της έκτασης της νόσου<sup>38</sup>.

Σε πολυκεντρική μελέτη όπου συμμετείχαν 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα ερευνητικά εργαστήρια εκτιμήθηκε η αναλυτική ικανότητα και αξιοπιστία του CellSearch στην ανίχνευση των κυκλοφορούντων κυττάρων από μεταστατικό καρκίνο του μαστού<sup>39</sup>. Η ασυμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων ήταν σε ποσοστό 21.4%, και αφορούσε σε δείγματα αίματος με μικρό αριθμό CTCs.

Σε εξέλιξη βρίσκεται προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III (Southwest Oncology Group - SWOG) για την επίδραση που έχει στην κλινική έκβαση της νόσου η αλλαγή θεραπευτικού σχήματος ή η διατήρησή του μέχρι κλινικής/απεικονιστικής προόδου νόσου, με κριτήριο την ανίχνευση αυξημένων CTCs μετά από 1 κύκλο χημειοθεραπείας 1<sup>ης</sup> γραμμής, σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (SWOG protocol S0500).

## **7. Προγνωστική αξία των μικρομεταστατικών κυττάρων στον πρώιμο καρκίνο του μαστού**

Ο δείκτης που περισσότερο έχει μελετηθεί για την ανίχνευση της μικρομεταστατικής νόσου είναι η Cytokeratin-19 (CK-19). Διάφοροι άλλοι δείκτες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ανεξάρτητα ή σε συνδυασμούς (CK-18, mucin-1, καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο και mammaglobin). Η CK-19 είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που εκφράζεται στα επιθηλιακά αλλά όχι στα μεσεγχυματικά κύτταρα. Το γονίδιο της CK-19 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 (17q21-q22), αποτελείται από 4667 νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει 6 εξόνια και 5 ιντρόνια, ενώ το mRNA της αποτελείται από 1360 νουκλεοτίδια. Επίσης, έχουν βρεθεί και δύο ψευδογονίδια της CK-19, το CK-19a(102) και το CK-19b(103) τα οποία εμφανίζουν ομολογία με το γονίδιο της CK-19 κατά 90% και 85%, αντίστοιχα. Η CK-19 πρωτεΐνη αποτελείται από 400 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 44098D. Η CK-19 έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί από διάφορους ερευνητές για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων μαστού σε λεμφαδένες, μυελό των οστών και περιφερικό αίμα.

### **A. Διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα (DTCs)**

Σ' ότι αφορά στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, η παρουσία διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων στο μυελό των οστών αποτελεί ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα και σχετίζεται με στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης απομακρυσμένων μεταστάσεων, ιδιαίτερα στα οστά, αλλά και σε άλλα όργανα. Επίσης, η ύπαρξη μικρομεταστατικής νόσου σχετίζεται με στατιστικά σημαντική μείωση της συνολικής

επιβίωσης<sup>20,21,40-45</sup>. Σε μελέτη του Braun και συν.<sup>40</sup>, CK-θετικά κύτταρα στο μυελό των οστών βρέθηκαν σε 199 (36%) από τους 552 συνολικά ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου I-III, στη φάση της αρχικής εξαίρεσης του πρωτοπαθούς όγκου. Στα τέσσερα χρόνια παρακολούθησης, η συνολική επιβίωση των ασθενών χωρίς μικρομεταστατική νόσο ήταν 93% έναντι 68% αυτών με ένα ή περισσότερα CK-θετικά κύτταρα στο μυελό των οστών. Η συσχέτιση είναι ανεξάρτητη της ύπαρξης ή όχι διηθημένων λεμφαδένων, καθώς και της χορήγησης ή όχι συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Συγκεκριμένα, η συνολική επιβίωση των ασθενών με DTCs και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες είναι ανάλογη αυτής των ασθενών με θετικούς λεμφαδένες, χωρίς DTCs. Επιπλέον, η παρουσία DTCs συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο απομακρυσμένης υποτροπής, όχι όμως και τοπικής<sup>40</sup>.

Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώθηκαν και σε μετα-ανάλυση 9 μελετών που συμπεριέλαβε 4703 ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου I, II και III<sup>46</sup>. Η παρουσία DTCs ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 30.6% των ασθενών, κατά τη διάρκεια της επέμβασης για εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου, και ήταν ανεξάρτητος δυσμενής προγνωστικός παράγοντας. Οι ασθενείς αυτές, συγκρινόμενες με τις γυναίκες χωρίς μικρομεταστατικά κύτταρα στο μυελό, είχαν όγκους μεγαλύτερης διαμέτρου και υψηλότερου βαθμού ιστολογικής κακοήθειας, μεγαλύτερη συχνότητα διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων και μεγαλύτερο ποσοστό αρνητικών ορμονικών υποδοχέων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ανίχνευσης DTCs σε ασθενείς με T3-4 όγκους είναι 72% έναντι 38% σε ασθενείς με T1-2 όγκους, ενώ DTCs βρέθηκαν στο 55%

των ασθενών με θετικούς λεμφαδένες έναντι 31% των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες<sup>46</sup>.

Στο διάμεσο διάστημα παρακολούθησης των ασθενών που ήταν 62 μήνες, 1192 ασθενείς (ποσοστό 25.3%) υποτροπίασαν ενώ το 75% των θανάτων προήλθε από καρκίνο του μαστού. Τόσο η ελεύθερη νόσου και απομακρυσμένων μεταστάσεων επιβίωση όσο και η συνολική επιβίωση ήταν σημαντικά βραχύτερα στους ασθενείς με μικρομεταστατική νόσο. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η παρουσία DTCs αποτέλεσε ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα της επιβίωσης<sup>46</sup>.

Αξιοσημείωτο είναι ότι για την υποομάδα των 1036 ασθενών χαμηλού κινδύνου, με όγκους μέχρι 2 cm και αρνητικούς λεμφαδένες (pT1N0), η παρουσία DTCs σχετίσθηκε με αυξημένο κίνδυνο απομακρυσμένων μεταστάσεων και θανάτου κατά τη διάρκεια των 5 πρώτων ετών. Επίσης, οι 807 ασθενείς της υποομάδας αυτής με αρνητική μικρομεταστατική νόσο που δεν έλαβαν συστηματική συμπληρωματική θεραπεία, είχαν ένα ποσοστό 5-ετούς επιβίωσης της τάξεως του 94%<sup>46</sup>.

Σύμφωνα με μελέτες που δημοσιεύθηκαν το 1989, επιβεβαιώθηκε το όφελος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας στην ελεύθερη νόσου επιβίωση ασθενών με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες<sup>47-50</sup>. Παρά ταύτα, και λόγω των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμάκων, επιβάλλεται η καθιέρωση συγκεκριμένων κριτηρίων για τη διάκριση των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες που δυνητικά ωφελούνται από τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Η παρουσία DTCs θα μπορούσε να αποτελέσει κριτήριο επιλογής των υποψήφιων για συμπληρωματική θεραπεία pT1N0 ασθενών. Ωστόσο, τα υπάρχοντα δεδομένα δεν είναι επαρκή για να συμπεριληφθεί στις

κατευθυντήριες οδηγίες του ASCO<sup>6</sup>. Η πλειοψηφία των μελετών δεν έχει την απαιτούμενη στατιστική ισχύ, λόγω του μικρού αριθμού ασθενών και του περιορισμένου χρόνου παρακολούθησης. Δύο μόνο μελέτες, δημοσίευσαν δεδομένα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα DTCs για διάστημα παρακολούθησης μεγαλύτερο των 5 ετών<sup>51,52</sup>.

Ο Janni και συν.<sup>51</sup> μελέτησαν την προγνωστική αξία της παρουσίας μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων στο μυελό ασθενών μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής θεραπείας. Η ανίχνευση DTCs κατά το διάστημα παρακολούθησης των ασθενών, ήταν προγνωστικός παράγοντας για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν προγενέστερη μελέτη των Wiedswang και συν.<sup>52</sup> σε 356 ασθενείς με ανιχνεύσιμα DTCs 3 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση. Μετά από διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 66 μηνών, η παρουσία DTCs ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη DFS και OS<sup>52</sup>.

## **B. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)**

Η συστηματική παρακολούθηση των CTCs πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής θεραπείας στον καρκίνο του μαστού, θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη για την έγκαιρη διάγνωση της ανθεκτικής νόσου και την επιλογή της αποτελεσματικότερης θεραπευτικής στρατηγικής.

## **B1. Προγνωστική αξία των CTCs πριν τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία**

Η Stathoroulou et al δημοσίευσαν για πρώτη φορά σχετικά με την προγνωστική σημασία της ανίχνευσης CTCs στο αίμα γυναικών με πρώιμο καρκίνο του μαστού πριν από τη συμπληρωματική θεραπεία<sup>53</sup>. Σε 148 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού (σταδίου I και II) ανιχνεύθηκε το CK19mRNA στο αίμα με τη μέθοδο της nested RT-PCR. Το ποσοστό των ασθενών με CK19mRNA-θετικά κύτταρα ήταν 29.7% (44 ασθενείς), ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση της ανίχνευσης CTCs με το στάδιο, το μέγεθος και το βαθμό κακοήθειας του όγκου, τον αριθμό των διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων, ή τους ορμονικούς υποδοχείς. Μετά από 28 μήνες διάμεσης παρακολούθησης, 19 ασθενείς (12.8%) είχαν υποτροπή και 8 (5.4%) πέθαναν από τη νόσο. Επίσης, οι CTC-θετικές ασθενείς είχαν φτωχότερη PFS ( $p=0.0007$ ) και OS ( $p=0.01$ ) από τις CTC-αρνητικές. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η ανίχνευση CTCs ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου<sup>53</sup>.

Η ίδια ομάδα ερευνητών ανέπτυξε μια real-time RT-PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των CK19mRNA μεταγράφων<sup>54</sup>. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε από τον Ignatiadis et al για την ανίχνευση CTCs σε μια μεγαλύτερη σειρά 444 γυναικών με καρκίνο μαστού σταδίου I-III πριν τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας<sup>55</sup>. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν το βραχύτερο DFS και OS ( $p<0.001$ ) των CTC-θετικών ασθενών (ποσοστό 40.8%).

## **B2. Προγνωστική αξία των CTCs μετά τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία**



Η πρώτη αναφορά στην προγνωστική σημασία των CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας έγινε από τον Xenidis et al<sup>56</sup>. Με τη χρήση της nested RT-PCR, έδειξαν ότι ασθενείς με CK19mRNA θετικά κύτταρα και λιγότερους από 4 διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες είχαν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και βραχύτερο DFS<sup>56</sup>.

Πρόσφατα, οι ίδιοι ερευνητές επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα σε μια μεγαλύτερη σειρά ασθενών, εκτιμώντας ταυτόχρονα την ανταπόκριση των CTCs στη συμπληρωματική χημειοθεραπεία<sup>57</sup>. Δείγμα αίματος από 437 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού ελήφθη πριν τη χορήγηση και μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. 179 ασθενείς (41%) ήταν αρχικά CTC-θετικές και οι μισές ασθενείς (51%) αρνητικοποίησαν τα CTCs μετά τη θεραπεία. Αξιοσημείωτο είναι ότι, 22% των ασθενών με αρχικά μη ανιχνεύσιμα CTCs έγιναν θετικές για ανίχνευση CTCs παρά τη χορήγηση της θεραπείας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι συχνά τα CTCs είναι ανθεκτικά στην καθιερωμένη συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Σημαντικά βραχύτερο DFS και OS αναφέρθηκε για τις CTC-θετικές ασθενείς μετά τη χημειοθεραπεία, ενώ η ανίχνευση CK19mRNA θετικών κυττάρων πριν και μετά τη θεραπεία σχετίστηκε με χειρότερη κλινική έκβαση και ήταν ανεξάρτητος δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για DFS και OS στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Επίσης, η ανίχνευση CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, ενδεικτικό της ύπαρξης χημειο-ανθεκτικής υπολειπόμενης νόσου<sup>57</sup>.

### **B3. Προγνωστική αξία των CTCs σε πρώιμο καρκίνο μαστού με αρνητικούς λεμφαδένες**

Περίπου 30% των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού και αρνητικούς λεμφαδένες θα υποτροπιάσει με απομακρυσμένες μεταστάσεις και θα πεθάνει από αυτό<sup>58</sup>. Οι Xenidis et al μελέτησαν την προγνωστική αξία των CTCs σε 167 τέτοιες ασθενείς<sup>59</sup>. CK19-θετικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο της real-time RT-PCR σε ποσοστό 21.6% των ασθενών. Δεν υπήρχε συσχέτιση της ανίχνευσης CTCs με άλλους γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες· μόνο ασθενείς με HER2-θετικούς όγκους (score 2+ ή 3+ με ανοσοϊστοχημεία) είχαν συχνότερα ανιχνεύσιμα CTCs σε σχέση με ασθενείς με HER2-αρνητικούς όγκους ( $p=0.033$ ). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η ανίχνευση CTCs σχετίσθηκε με πρώιμη απομακρυσμένη υποτροπή και θάνατο λόγω νόσου<sup>59</sup>. Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά ότι η αιματογενής διασπορά καρκινικών κυττάρων συμβαίνει πρώιμα στην πορεία της νόσου και προηγείται της λεμφογενούς διασποράς.

### **B4. Προγνωστική αξία των CTCs κατά τη διάρκεια της συμπληρωματικής ορμονοθεραπείας**

Ο Xenidis et al μελέτησαν την κλινική σημασία της ανίχνευσης CTCs σε 119 γυναίκες με HR-θετικούς όγκους που έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με ταμοξιφαίνη, χρησιμοποιώντας τη real-time RT-PCR<sup>60</sup>. Συνολικά, 22 ασθενείς (18.5%) ήταν CTC-θετικές μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας και πριν την έναρξη της

ταμοξιφαίνης. Η πλειοψηφία αυτών (68.2%) ήταν επίσης ανθεκτικές στην ταμοξιφαίνη (12.6% των 119 γυναικών παρέμειναν CTC-θετικές), ενώ 68 ασθενείς (57.1%) παρέμειναν συνεχώς CTC-αρνητικές σ' όλο το διάστημα της παρακολούθησης. Η αποτυχία της ταμοξιφαίνης να εξαλείψει τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη DFS και OS<sup>60</sup>.

Δεδομένης της ύπαρξης των αναστολέων αρωματάσης ως εναλλακτικής της ταμοξιφαίνης ορμονοθεραπείας για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ασθενείς που παραμένουν CTC-θετικές κατά τη λήψη ταμοξιφαίνης θα μπορούσαν να αλλάξουν σε αναστολέα αρωματάσης.

## **B5. Προγνωστική αξία των CTCs σε μοριακούς υποτύπους του πρώιμου καρκίνου του μαστού**

Στην πραγματικότητα, ο καρκίνος του μαστού δεν είναι μία νόσος με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, αλλά μια ομάδα μοριακά ετερογενών νεοπλασιών<sup>61</sup>. Τέσσερα κύρια μοριακά πορτραίτα καρκίνου του μαστού έχουν αναγνωριστεί με βάση το προφίλ γονιδιακής έκφρασης<sup>62</sup>. Ο basal-like τύπος (αντιστοιχεί κυρίως στους ER, PR και HER2-αρνητικούς όγκους, δηλ. τους «τριπλά αρνητικούς»), ο luminal-A (ER-θετικοί, χαμηλού βαθμού κακοήθειας), ο luminal-B (ER-θετικοί αλλά με χαμηλή έκφραση ορμονικών υποδοχέων, υψηλού βαθμού ιστολογικής κακοήθειας) και ο HER2-θετικός, όγκοι με υπερέκφραση του *Her2* γονιδίου.

Εκτός των διαφορών στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης, οι ER-αρνητικοί και ER-θετικοί όγκοι διαφέρουν τόσο στην ανταπόκρισή τους στη θεραπεία όσο και στη βιολογική τους

συμπεριφορά<sup>58</sup>. Σύμφωνα με την τελευταία μετα-ανάλυση του 2000 από το Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) που δημοσιεύτηκε το 2005, γυναίκες με ER-αρνητικό πρώιμο καρκίνο του μαστού υποτροπιάζουν συχνότερα στη διάρκεια των 5 πρώτων χρόνων από τη διάγνωση σε σχέση με τις ER-θετικές γυναίκες. Επιπλέον, γυναίκες με ER-θετικούς όγκους συχνά υποτροπιάζουν μετά από 5-15 χρόνια<sup>58</sup>.

Οι Ignatiadis et al δημοσίευσαν την πρώτη μελέτη για την προγνωστική αξία των CTCs στους διαφορετικούς υποτύπους του πρώιμου καρκίνου του μαστού<sup>55</sup>. Συνολικά 444 ασθενείς ελέγχθηκαν για CK19mRNA-θετικά κύτταρα με real-time RT-PCR πριν την έναρξη της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας και 181 (40.8%) ήταν CTC-θετικές. Αναλυτικά, CTCs ανιχνεύθηκαν σε 109 (41.9%) από 260 ER-θετικές ασθενείς, 71 (40.6%) από 175 ER-αρνητικές, 27 (35%) από 77 «τριπλά αρνητικές», 35 (39.8%) από 88 HER2-θετικές ασθενείς και 82 (44.1%) από 186 ασθενείς με ER-θετικούς/HER2-αρνητικούς όγκους. Μετά από διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 53.5 μηνών, η ανίχνευση CTCs σχετίσθηκε με μειωμένη DFS και OS στο σύνολο των ασθενών. Ωστόσο, στην ανάλυση των υποομάδων, η παρουσία CTCs ήταν δυσμενής προγνωστικός παράγοντας στις ER-αρνητικές αλλά όχι και στις ER-θετικές γυναίκες, παρά το παρόμοιο ποσοστό ασθενών με κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στις 2 υποομάδες. Επιπλέον, η παρουσία CTCs σχετίσθηκε με μειωμένη DFS και OS στις «τριπλά αρνητικές» και τις HER2-θετικές, αλλά όχι στις ER-θετικές/HER2-αρνητικές γυναίκες. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η αλληλεπίδραση μεταξύ CTCs και ER υποδοχέων ήταν ο ισχυρότερος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη DFS και OS<sup>55</sup>.

Η μελέτη έδειξε για πρώτη φορά τη διαφορετική προγνωστική σημασία της ανίχνευσης CTCs στους διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους του πρώιμου καρκίνου του μαστού<sup>55</sup>. Θα ήταν ενδιαφέρον, επομένως, να μελετηθεί προοπτικά ο συνδυασμός ανάλυσης του γονιδιακού προφίλ του πρωτοπαθούς όγκου και ανίχνευσης μικρομεταστατικών κυττάρων, με σκοπό την βελτίωση της πρόγνωσης στον πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Στην ίδια μελέτη<sup>55</sup>, κατά τη διάρκεια της 5-ετούς παρακολούθησης, ασθενείς με ER-αρνητικούς όγκους υποτροπίασαν συχνότερα σε σχέση με τις ER-θετικές ασθενείς (28% έναντι 16.5%,  $p=0.004$ ), γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της EBCTCG μετα-ανάλυσης. Επομένως, τα CTCs σχετίσθηκαν με την «πρώιμη» ανάπτυξη μεταστάσεων στα 5 πρώτα χρόνια από τη διάγνωση, στους ER-αρνητικούς αλλά όχι και στους ER-θετικούς όγκους. Πιθανά το γεγονός ότι οι ER-αρνητικές ασθενείς λαμβάνουν μόνο χημειοθεραπεία ενώ οι ER-θετικές λαμβάνουν και ορμονοθεραπεία με σκοπό την εξάλειψη των μικρομεταστατικών κυττάρων, να είναι μια εξήγηση. Πράγματι, οι καμπύλες επιβίωσης στις ER-θετικές γυναίκες τείνουν να διαφοροποιηθούν μετά τα 5 χρόνια που διακόπτουν την ορμονοθεραπεία. Συνεπώς, η παρουσία CTCs αρχικά στις ER-θετικές ασθενείς θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάκριση εκείνων που μπορεί να ωφεληθούν από την παράταση της ορμονοθεραπείας και πέραν των 5 ετών.

## 8. Ετερογένεια και χρήση πολλαπλών δεικτών στην ανίχνευση CTCs

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών, μόνο το 30% των CK19mRNA-θετικών ασθενών θα υποτροπιάσει, ενώ 15% των αρνητικών ασθενών επίσης υποτροπιάζει και πεθαίνει από καρκίνο του μαστού μετά από διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 5 ετών<sup>55</sup>. Σ' ότι αφορά στους ασθενείς με ανιχνεύσιμα DTCs ή CTCs που δεν υποτροπιάζουν, γεννιέται το ερώτημα αν τα κύτταρα αυτά είναι βιώσιμα ή αποπτωτικά και αν μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των DTCs από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και άλλους επιθηλιακούς όγκους έχει τεκμηριωθεί δεδομένου ότι μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro*<sup>63</sup>. Στην περίπτωση των DTCs του μυελού των οστών, πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα αυτά και το στρώμα του μυελού που μπορεί να ευνοήσουν την ανάπτυξη ή όχι κλινικά εμφανών μεταστάσεων. Αξιοσημείωτο είναι ότι, σε μία μελέτη τα CTCs εξέφραζαν δείκτες που υποδηλώνουν ότι είναι περισσότερο επιρρεπή στην απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο από τα DTCs<sup>64</sup>. Επιπλέον, η Kallergi et al έδειξαν ότι μεμονωμένα CTCs παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση ενεργοποιημένων κινασών, οι οποίες ρυθμίζουν «μεταναστευτικούς» μηχανισμούς, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της μεταστατικής ικανότητας των κυττάρων αυτών<sup>65</sup>.

Σ' ότι αφορά στους DTCs ή CTCs-αρνητικούς ασθενείς που υποτροπιάζουν, αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε πρόβλημα κατά τη λήψη του δείγματος ή μπορεί να αποδοθεί στην μη ικανοποιητική ευαισθησία των κυτταροκερατινών ως δείκτη για την ανίχνευση μικρομεταστατικών κυττάρων. Πράγματι, η διασπορά

των καρκινικών κυττάρων έχει συσχετισθεί με την απώλεια των επιθηλιακών δεικτών<sup>66</sup>.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο καρκίνος του μαστού είναι μια γενετικά ετερογενής νόσος<sup>62,67</sup>. Επίσης, DTCs προερχόμενα από ένα συγκεκριμένο ασθενή με καρκίνο του μαστού χωρίς κλινικά εμφανή μετάσταση (στάδιο M0), είναι γενετικά ετερογενή<sup>68</sup> ενώ με την κλινική εμφάνιση μεταστάσεων η ετερογένεια αυτή ελαττώνεται σημαντικά<sup>69</sup>. Στη μελέτη του Pantel et al<sup>70</sup>, αντισώματα εναντίον κυτταροκερατινών τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση DTCs έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με αντισώματα εναντίον αντιγόνων καρκινικών κυττάρων, για το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των μικρομεταστατικών κυττάρων. Όπως προκύπτει, τα DTCs εκφράζουν σε ποσοστό έως 10% αντιγόνα που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε ποσοστό 35% το HLA-class 1 (Human leukocyte antigen-class 1), σε ποσοστό 70% το αντιγόνο ERBB2 και το uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor)<sup>70</sup>.

Σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η ευαισθησία ανίχνευσης των CTCs και να αναγνωρισθούν υποπληθυσμοί CTCs με επιθετική βιολογική συμπεριφορά και ιδιαίτερη προγνωστική αξία, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτός της CK19 και άλλοι δείκτες, όπως οι mucins, mammaglobin-A(MGB1), maspin, καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), HER2, EGFRvIII, cathepsin D, survivin<sup>18,71-73</sup>.

Οι Ignatiadis et al<sup>74</sup> μελέτησαν την προγνωστική σημασία της ανάλυσης τριών δεικτών μικρομεταστατικής νόσου (CK19, mammaglobin-A και HER2) στο αίμα 175 γυναικών με καρκίνο μαστού σταδίου I-III πριν την έναρξη συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Η ανάλυση έγινε με real-time (CK19) και nested (MGB1 και HER2) RT-PCR. Ασθενείς με CK19mRNA-θετικά και

MGB1mRNA-θετικά κύτταρα είχαν τη χειρότερη OS, ενώ ασθενείς με HER2mRNA-θετικά κύτταρα είχαν βραχύτερο DFS. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η ανίχνευση CK19mRNA-θετικών και MGB1mRNA-θετικών κυττάρων και το ER-αρνητικό status του όγκου ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες μικρότερου DFS<sup>74</sup>.

## 9. CTCs με φαινότυπο βλαστικών κυττάρων

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, οι όγκοι αναπτύσσονται με αφετηρία ένα μικρό υποπληθυσμό καρκινικών κυττάρων, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Με την ίδια λογική, υποθέτουμε ότι τα ικανά κύτταρα να δώσουν μεταστάσεις είναι διεσπαρμένα βλαστικά κύτταρα από τον πρωτοπαθή όγκο<sup>75</sup>. Συγκεκριμένα, τα καρκινικά κύτταρα του μαστού με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων έχουν ταυτοποιηθεί με τον CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> φαινότυπο<sup>76</sup>.

Ο Balic et al χρησιμοποίησαν ανοσοϊστοχημεία τριπλής χρώσης για να ανιχνεύσουν την παρουσία κυττάρων με τον CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> φαινότυπο σε 50 δείγματα μυελού των οστών ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού<sup>78</sup>. Ο ανωτέρω φαινότυπος ανιχνεύθηκε σε όλα τα CK-θετικά δείγματα, ενώ σε άλλη μελέτη<sup>77</sup> η παρουσία των συγκεκριμένων κυττάρων σχετίσθηκε με την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων. Πρόσφατα έχει περιγραφεί η αυξημένη δραστηριότητα της aldehyde dehydrogenase (ALDH 1)1 ως δείκτης αναγνώρισης των βλαστικών κυττάρων καρκίνου μαστού<sup>79</sup>.

Οι Theodoropoulos et al<sup>80</sup> ανακοίνωσαν πρόσφατα την ανίχνευση ενός υποπληθυσμού CTCs με φαινοτύπους βλαστικών κυττάρων (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> και ALDH1<sup>high</sup>/CD24<sup>-/low</sup>) σε δείγματα



αίματος 30 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Συνολικά, 1439 CTCs ανιχνεύθηκαν σε 20 (66.7%) από τις 30 γυναίκες, ενώ 16 (80%) από τις 20 ήταν θετικές για CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> CTCs. Το ποσοστό των CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> κυττάρων στο συνολικό πληθυσμό των CTCs που ανιχνεύθηκαν ήταν 35.2%. Παρομοίως, ποσοστό 17.7% των CTCs από 7 ασθενείς που αναλύθηκαν είχαν τον ALDH1<sup>high</sup>/CD24<sup>-/low</sup> φαινότυπο. Παρόλα αυτά, η ετερογένεια του υπό μελέτη πληθυσμού (διαφορετικά σχήματα χημειοθεραπείας για μεταστατική νόσο), δεν επιτρέπει την κλινική συσχέτιση των αποτελεσμάτων<sup>80</sup>.

Επιπλέον μελέτες απαιτούνται για το συσχετισμό της παρουσίας CTCs με φαινότυπο βλαστικών κυττάρων και της κλινικής έκβασης ασθενών με καρκίνο του μαστού. Απώτερος σκοπός είναι η ανεύρεση πιθανών θεραπευτικών στόχων για την αποτελεσματική εξάλειψη των κυττάρων αυτών.

## **10. Δράση της χημειοθεραπείας/ορμονοθεραπείας στα DTCs/ CTCs**

Διάφοροι ερευνητές έχουν δείξει ότι τα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία, πιθανώς λόγω της ελαττωμένης ικανότητάς τους για πολλαπλασιασμό.

Ο Braun και συν.<sup>81</sup> από το 2000 επισήμαναν την ανάγκη ανεύρεσης προβλεπτικών δεικτών για τη δράση της συμπληρωματικής θεραπείας σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους και μελέτησαν την ανταπόκριση των DTCs στη χημειοθεραπεία σε 59 ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Από τους 59 ασθενείς, 29 (49.2%) είχαν CK-θετικά κύτταρα στο μυελό των οστών πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας. Μετά τη

χημειοθεραπεία, λιγότεροι από το 50% των αρχικά CK-θετικών ασθενών (14 στους 29, ποσοστό 48.3%) ήταν αρνητικοί, ενώ 11 (36.7%) από τους 30 προηγούμενα CK-αρνητικούς είχαν θετικοποιηθεί. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η παρουσία DTCs μετά τη χημειοθεραπεία ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μειωμένη OS<sup>81</sup>. Οι ερευνητές καταλήγουν ότι τα συνήθως χρησιμοποιούμενα κυτταροτοξικά φάρμακα δεν εξαλείφουν πλήρως τα μικρομεταστατικά κύτταρα, γεγονός που σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση.

Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι λίγα μόνο από τα κύτταρα αυτά είναι σε φάση πολλαπλασιασμού, ενώ στην πλειοψηφία τους βρίσκονται στη φάση G<sub>0</sub> του κυτταρικού κύκλου. Αυτό επιβεβαιώνεται από τους Pantel et al<sup>69</sup> που μελέτησαν την έκφραση δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki-67 και p120) και του ογκογονιδίου ErbB2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, έκφραση Ki-67 ή p120 στα μικρομεταστατικά κύτταρα παρατηρήθηκε μόνο σε 11 (15.9%) από τους 69 ασθενείς με καρκίνο που μελετήθηκαν. Αντίθετα, η υπερέκφραση του ErbB2 πρωτο-ογκογονιδίου φαίνεται να είναι ιδιαίτερα συχνή στα κύτταρα αυτά (67.6% των ασθενών με καρκίνο του μαστού), γεγονός ενδεικτικό «επιλογής» συγκεκριμένων κυττάρων νωρίς κατά τη διαδικασία της μετάστασης<sup>69</sup>.

Τα ίδια συμπεράσματα έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές. Οι Becker et al<sup>82</sup> συσχέτισαν την ανίχνευση DTCs και την ανταπόκριση στην προεγχειρητική θεραπεία ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού. 60 (50%) από τους 120 ασθενείς της μελέτης είχαν ανιχνεύσιμα DTCs πριν τη χημειοθεραπεία. Τα ποσοστά ανταπόκρισης ήταν 18% για παθολογοανατομική πλήρη ανταπόκριση και 52% για μερική ανταπόκριση. Ωστόσο, 36% των

ασθενών στην ομάδα της πλήρους ανταπόκρισης και 48% στην ομάδα της μερικής ανταπόκρισης, ήταν DTC-θετικοί μετά τη χημειοθεραπεία<sup>82</sup>.

Οι Xenidis et al<sup>57</sup> μελέτησαν επίσης την ανταπόκριση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στη συμπληρωματική χημειοθεραπεία σε 437 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Μόνο το 49% των αρχικά θετικών ασθενών αρνητικοποίησε τα CTCs μετά τη θεραπεία, ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι 22% των αρχικά CTC-αρνητικών ασθενών έγινε θετικό παρά τη θεραπεία. Επίσης, η ίδια ομάδα ερευνητών έδειξε την αντοχή των CTCs και στην ορμονική θεραπεία<sup>60</sup>. Η πλειοψηφία των ασθενών της μελέτης (68.2%) που παρέμειναν CTC-θετικές μετά τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία, ήταν ανθεκτικές και στη χορήγηση ταμοξιφαίνης. Οι ερευνητές καταλήγουν ότι η συνεχής ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων σε ασθενείς με ορμονοευαίσθητη νόσο κατά τη χορήγηση ταμοξιφαίνης, είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένη DFS και OS<sup>60</sup>.

#### **11. Στόχευση των μικρομεταστατικών κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα**

Δεδομένου ότι η χημειοθεραπεία και ορμονοθεραπεία δεν μπορούν να εξαλείψουν τα μικρομεταστατικά κύτταρα, ενώ η συνεχής ανίχνευσή τους αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα, ερευνητές επιχείρησαν τη στόχευση των μικρομεταστατικών κυττάρων με ανεξάρτητα του κυτταρικού κύκλου μόρια, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα.

Οι Braun et al<sup>83</sup> μελέτησαν τη δράση του μονοκλωνικού αντισώματος 17-1A (Edrecolomab) στην εξάλειψη των ErCAM+/CK+ DTCs στο μυελό των οστών 10 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Το 17-1A είναι αντίσωμα εναντίον του επιθηλιακού μορίου προσκολλησεως ErCAM. Σε όλες τις ασθενείς, με τη χορήγηση μίας μόνο δόσης 500 mg Edrecolomab, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο μέσο αριθμό τόσο των CK+ κυττάρων (73 έναντι 15,  $p=0.003$ ) όσο και των ErCAM+/CK+ κυττάρων (17 έναντι 1,  $p=0.003$ ) ανά  $10^6$  κύτταρα μυελού. Πλήρης εξάλειψη των ErCAM+ κυττάρων παρατηρήθηκε σε 4 ασθενείς<sup>83</sup>.

## 12. HER-2

Το ογκογονίδιο HER2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 (17q21) και κωδικοποιεί την έκφραση του C-erbB2, μιας διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης 185 Kd με δράση κινάσης της τυροσίνης. Η πρωτεΐνη HER2/ErbB2 ανήκει σε μία οικογένεια που περιλαμβάνει 4 μέλη (EGFR-1 ή ErbB1, HER2 ή ErbB2, ErbB3 και ErbB4). Οι υποδοχείς αυτοί σχηματίζουν διμερή (ομο- και/ή ετερο-διμερή) στην κυτταρική μεμβράνη, συνδέονται με αυξητικούς παράγοντες, ενεργοποιούνται και μεταδίδουν τα κυτταρικά μηνύματα<sup>84</sup>.

Διάφοροι ερευνητές με πρώτο τους Slamon et al έδειξαν ότι η υπερέκφραση του HER2 υποδοχέα, που παρατηρείται στο 20-25% των πρωτοπαθών όγκων καρκίνου του μαστού<sup>85</sup>, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για μειωμένη επιβίωση<sup>86</sup>. Συγκεκριμένα, ενώ η μέση επιβίωση των ασθενών με πρώιμο

καρκίνο του μαστού και υπερέκφραση του HER-2 είναι 3 χρόνια, η μέση επιβίωση αυτών με φυσιολογικά επίπεδα HER-2 είναι 6-7 χρόνια<sup>87</sup>. Εξίσου σημαντική φαίνεται ότι είναι και η σχέση της υπερέκφρασης του HER-2 με την πτωχή κλινική ανταπόκριση της νόσου μετά από συστηματική θεραπεία (χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία), αν και τα δεδομένα είναι ακόμη αλληλοσυγκρουόμενα<sup>88-90</sup>. Επιπλέον, η ενίσχυση και/ή η υπερέκφραση του HER2 γονιδίου είναι προβλεπτικός παράγοντας του οφέλους από τη χορήγηση του αντι-HER2 μονοκλωνικού αντισώματος trastuzumab (Herceptin).

### **13. Έκφραση του HER2 στα DTCs**

Σύμφωνα με διάφορους ερευνητές, τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό, με κάποια από αυτά να έχουν περισσότερο επιθετική συμπεριφορά που οδηγεί στη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Ως προγνωστικός δείκτης της βιολογικής συμπεριφοράς και της «μεταστατικότητας» των DTCs έχει προταθεί η έκφραση του HER2 υποδοχέα<sup>69</sup>. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, σε αντίθεση με τον πρωτοπαθή όγκο όπου η υπερέκφραση του HER2 υποδοχέα περιορίζεται στο 20-25% των περιπτώσεων, η έκφρασή του στα διεσπαρμένα στο μυελό των οστών καρκινικά κύτταρα φτάνει το 67.6% των ασθενών<sup>69</sup>. Το γεγονός αυτό δεν έχει μόνο σημαντική προγνωστική αξία για την κλινική έκβαση των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, αλλά και προβλεπτική αξία για την ανταπόκριση στη συμπληρωματική θεραπεία που στοχεύει τη μικρομεταστατική νόσο. Επιπλέον, ο HER2 υποδοχέας αποτελεί στόχο βιολογικών θεραπειών, όπως το μονοκλωνικό αντίσωμα

trastuzumab, και η έκφρασή του φαίνεται να σχετίζεται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού<sup>88-90</sup>.

Οι Braun et al δημοσίευσαν πρώτοι δεδομένα για την προγνωστική αξία της υπερέκφρασης του erbB2 στα διασπαρμένα στο μυελό των οστών καρκινικά κύτταρα, 52 ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού<sup>91</sup>. Έκφραση HER2 πρωτεΐνης στα CK18-θετικά DTCs βρέθηκε σε 31 από τους 52 (60%) ασθενείς, ανεξαρτήτως διηθημένων λεμφαδένων, μεγέθους όγκου, βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης ή έκφρασης HER2 στα κύτταρα του πρωτοπαθούς όγκου. Μετά από διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 64 μηνών, ασθενείς με HER2-θετικά DTCs εμφάνιζαν μεγαλύτερη συχνότητα ανάπτυξης μεταστάσεων σε σχέση με ασθενείς με HER2-αρνητικά DTCs (21 έναντι 7 επεισόδια,  $p=0.032$ ). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η παρουσία HER2-θετικών DTCs ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μειωμένη ολική επιβίωση (OS)<sup>91</sup>.

Οι Solomayer et al<sup>92</sup> πήραν 10-20ml μυελού των οστών και αφού απομόνωσαν μονοπύρηννα κύτταρα με διαβαθμισμένη φυγοκέντριση με Ficoll, χρησιμοποίησαν διπλό ανοσοφθορισμό με αντίσωμα έναντι πανκυτταροκερατίνης και anti-HER2. Ανέφεραν HER2-θετικότητα σε 20 από τους 46 ασθενείς με CK-θετικά DTCs<sup>92</sup>.

#### **14. Έκφραση του HER2 στα CTCs**

Οι Wülfing et al<sup>93</sup> πρώτοι μελέτησαν την προγνωστική αξία των HER2-θετικών CTCs σε ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου

I-III. Για την ταυτοποίηση των HER2-θετικών CTCs χρησιμοποίησαν 50ml περιφερικού αίματος ανά ασθενή σε συνδυασμό με διαβαθμισμένη φυγοκέντριση και ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και στη συνέχεια διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωματα έναντι της κυτταροκερατίνης και του HER2. Ένα έως οκτώ CTCs ανιχνεύθηκαν στο περιφερικό αίμα των 17 από τους 35 (48.6%) ασθενών. Η παρουσία HER2-θετικών CTCs σχετίσθηκε με σημαντικά μειωμένη DFS ( $p < 0.005$ ) και OS ( $p < 0.05$ ) σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού<sup>93</sup>.

Η Apostolaki et al<sup>72</sup> απομόνωσαν μονοπύρηνια του περιφερικού αίματος μετά από φυγοκέντρηση σε Ficoll και χρησιμοποιώντας μία μεθοδολογία nested RT-PCR μελέτησαν την παρουσία HER2mRNA-θετικών κυττάρων σε 214 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού μετά το τέλος της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. HER2-θετικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 21% των ασθενών και η παρουσία τους ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένη DFS<sup>72</sup>.

Οι Ignatiadis et al<sup>94</sup> έδειξαν ότι η ταυτόχρονη ανίχνευση CK19mRNA-θετικών και HER2mRNA-θετικών κυττάρων σε 185 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού πριν τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για ελαττωμένη DFS. Συνολικά, 63 από τους 185 (34%) ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά κύτταρα και 33 (52.3%) από αυτούς είχαν και ανιχνεύσιμα HER2mRNA-θετικά κύτταρα. CK19mRNA+ / HER2mRNA+ ασθενείς είχαν σημαντικά μικρότερη DFS αλλά όχι και OS σε σχέση με τους CK19mRNA+ / HER2mRNA- ασθενείς<sup>94</sup>.

## 15. Trastuzumab (Herceptin)

Το trastuzumab είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά ανοσολογικά με τον υποδοχέα HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2). Η ανάπτυξη του αντισώματος είναι αποτέλεσμα μακρόχρονης έρευνας σχετικά με τη δράση και το ρόλο του HER-2 στην ανάπτυξη και την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού<sup>85</sup>. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του trastuzumab δεν είναι πλήρως γνωστός. Από τα έως τώρα επιστημονικά δεδομένα φαίνεται ότι οι σημαντικότεροι αντινεοπλασματικοί μηχανισμοί δράσης του είναι ο άμεσος ανταγωνισμός του με παράγοντες ανάπτυξης/ενεργοποίησης του δικτύου HER2, επιτάχυνση της ενδοκύττωσης και αποδόμησης των υποδοχέων HER2, καταστολή των παραγόντων ανάπτυξης του αγγειακού ενδοθηλίου και της νεοαγγείωσης και ενεργοποίηση του μηχανισμού καταστροφής των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω των φυσικών κυτταροκτόνων κυττάρων (NK κύτταρα) και της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταρικής τοξικότητας (ADCC)<sup>95</sup>.

Η αξιολόγηση της έκφρασης και ο ρόλος του HER-2 έχουν διερευνηθεί τα τελευταία χρόνια σε πολλές κλινικές μελέτες. Μεταξύ των διαθέσιμων μεθόδων οι πιο κοινές είναι η ανοσοϊστοχημική μέθοδος, η οποία αξιολογεί την πρωτεϊνική έκφραση, και ο φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH), που αξιολογεί τη γονιδιακή ενίσχυση. Η σημερινή πρακτική της χρήσης αυτών των μεθόδων είναι ότι σε ασθενείς με μέτρια ανοσοϊστοχημική θετική έκφραση του C-erbB2 (2+) είναι απαραίτητος ο έλεγχος της γονιδιακής ενίσχυσης με τη μέθοδο του FISH<sup>96</sup>.

Η πρωτεΐνη HER2 αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο στον καρκίνο του μαστού<sup>97</sup>. Σε προκλινικές μελέτες μονοκλωνικά



αντισώματα που αντιδρούν με το C-erbB2 προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων που εμφάνιζαν υπερέκφραση του HER2<sup>98</sup>. Στη συνέχεια, το trastuzumab έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα (ανταποκρίσεις 12-27%) σε κλινικές μελέτες φάσεως II ως μονοθεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού (MKM) και υπερέκφραση του HER2<sup>99,100</sup>. Τα σχετικά χαμηλά ποσοστά ανταποκρίσεων αυτών των μελετών αποδόθηκαν αφενός στο γεγονός ότι οι ασθενείς είχαν προηγουμένως λάβει πολλές γραμμές χημειοθεραπείας και αφετέρου στην περιορισμένη γνώση που υπήρχε σχετικά με την αξιολόγηση της θετικότητας του HER2.

Το εβδομαδιαίο σχήμα χορήγησης του trastuzumab (αρχική δόση εφόδου 4 mg/Kg και στη συνέχεια 2 mg/Kg) καθιερώθηκε στη συνέχεια από τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες. Επιπλέον, δεδομένου ότι το αντίσωμα έχει μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, η αύξηση της δόσης δεν βρέθηκε να συνοδεύεται και από αύξηση της αποτελεσματικότητάς του<sup>101</sup>. Κλινικές μελέτες φάσεως II έδειξαν ότι η χορήγηση του trastuzumab κάθε 3 εβδομάδες (αρχική δόση εφόδου 8 mg/Kg και στη συνέχεια 6 mg/Kg) είχε ως αποτέλεσμα ανίχνευση παρόμοιων επιπέδων φαρμάκου στον ορό με την εβδομαδιαία χορήγηση<sup>102</sup>. Παρόλο που δεν υπάρχουν δεδομένα από κλινικές μελέτες φάσεως III που να τα συγκρίνουν, τα δύο δοσολογικά σχήματα χρησιμοποιούνται εξίσου σε κλινικές μελέτες και στην κλινική πράξη.

Η βασική κλινική μελέτη που καθιέρωσε το συνδυασμό trastuzumab και χημειοθεραπείας ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, δημοσιεύθηκε από τους Slamon et al<sup>103</sup>. 469 μη-προθεραπευμένες ασθενείς με IHC HER2-θετικό MKM τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν μόνο

πακλιταξέλη ή το συνδυασμό πακλιταξέλης και trastuzumab. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η προσθήκη του αντισώματος αύξησε το PFS (4.6 έναντι 7.4 μήνες,  $p < 0.001$ ) και τη διάμεση επιβίωση (20.3 έναντι 25.1 μήνες,  $p = 0.046$ ) των ασθενών<sup>103</sup>. Ακολούθησαν κλινικές μελέτες που αξιολόγησαν το συνδυασμό του trastuzumab με διάφορα άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στο MKM (καπεσιταμπίνη, βινορελμπίνη, γεμισιταμπίνη, πλατινούχα), με ποσοστά αντικειμενικών ανταποκρίσεων 24-81%<sup>104</sup>.

Η δραστηριότητα του συνδυασμού trastuzumab με πακλιταξέλη αξιολογήθηκε και ως προεγχειρητική θεραπεία σε 40 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και υπερέκφραση του HER-2, με πολύ καλά αποτελέσματα (ανταπόκριση 75% και παθολογοανατομική πλήρης ανταπόκριση της νόσου 18%)<sup>105</sup>.

Σ' ότι αφορά στον πρώιμο καρκίνο του μαστού, 4 μεγάλες τυχαίοποιημένες μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη trastuzumab για 1 έτος στην επικουρική θεραπεία προσφέρει όφελος τόσο στο DFS όσο και στο OS, στις γυναίκες με HER2-θετικούς όγκους<sup>106-109</sup>. Η χορήγηση του trastuzumab στις μελέτες έγινε είτε ως μονοθεραπεία<sup>108</sup> μετά την ολοκλήρωση της επικουρικής χημειοθεραπείας, είτε σε συνδυασμό με ταξάνη μετά από 4 κύκλους σχήματος ανθρακυκλίνης<sup>106,107</sup>, είτε σε συνδυασμό με δοσιταξέλη και καρβοπλατίνα σε σχήμα που δεν περιέχει ανθρακυκλίνη<sup>109</sup>. Ανεξαρτήτως ωστόσο του τρόπου χορήγησης, το όφελος της προσθήκης του trastuzumab στην επικουρική θεραπεία ήταν σημαντικό με μείωση του κινδύνου υποτροπής κατά περίπου 40%. Ο βέλτιστος τρόπος και διάρκεια χορήγησης του αντισώματος μένουν να αποδειχθούν.

Η σημαντικότερη ανεπιθύμητη ενέργεια του trastuzumab είναι η καρδιοτοξικότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από καρδιομυοπάθεια με μείωση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας (LVEF). Ο μηχανισμός της φαίνεται να είναι διαφορετικός από την αντίστοιχη καρδιοτοξικότητα των ανθρακυκλινών, ενώ θα πρέπει να τονιστεί ότι συνήθως είναι αναστρέψιμη<sup>110</sup>. Στη μελέτη των Slamon et al<sup>103</sup>, το ποσοστό καρδιοτοξικότητας ήταν 27% στις ασθενείς που έλαβαν trastuzumab με ανθρακυκλίνη, 15% σε αυτές που το έλαβαν με πακλιταξέλη και 5% σε ασθενείς που έλαβαν μόνο ανθρακυκλίνη<sup>103</sup>. Αν και δεν υπάρχει καθιερωμένος αλγόριθμος για την παρακολούθηση των ασθενών που λαμβάνουν trastuzumab, οι περισσότερες κλινικές μελέτες σε ασθενείς με MKM περιελάμβαναν μία αρχική μέτρηση του LVEF και στη συνέχεια τακτική αξιολόγηση του LVEF κάθε 8-16 εβδομάδες<sup>111,112</sup>.

Η χρήση του αντισώματος καθιερώθηκε τελευταία και σε άλλα κακοήθη νεοπλασμάτα, όπως ο μεταστατικός καρκίνος του στομάχου.

## **16. Στόχος της διατριβής**

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος που προσβάλλει τις γυναίκες και η δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει γίνει τις τελευταίες δεκαετίες στη διάγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου, ο αριθμός των θανάτων από τη νόσο παγκοσμίως ξεπερνά τις 200.000 κάθε χρόνο.

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί στην πραγματικότητα μια ομάδα ετερογενών νεοπλασιών με κύριο χαρακτηριστικό την τάση για πρώιμη αιματογενή διασπορά των καρκινικών κυττάρων. Η ανίχνευση μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων είναι δυνατή τόσο στο περιφερικό αίμα (κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα – *Circulating Tumor Cells, CTCs*) όσο και στο μυελό των οστών (δισεπάρμένα καρκινικά κύτταρα – *Disseminated Tumor Cells, DTCs*) ασθενών με πρώιμο ή και μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Το ποσοστό των ασθενών που, ενώ κλινικά είναι ελεύθερο μεταστάσεων, εντούτοις έχει μικρομεταστατική νόσο κατά τη στιγμή της διάγνωσης φτάνει το 30-40%.

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την εκτίμηση της επίπτωσης και της προγνωστικής αξίας των μικρομεταστατικών κυττάρων σε ασθενείς τόσο με πρώιμο όσο και με μεταστατικό καρκίνο του μαστού<sup>2,19-27</sup>. Το Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑ.Γ.Ν.Η σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών μελετά τα τελευταία 10 χρόνια τη μοριακή ανίχνευση CTCs στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, ως εργαλείο για τη βελτίωση της προγνωστικής πληροφορίας πέραν αυτής των κλασικών κλινικών και παθολογοανατομικών παραγόντων. Όπως έχει αποδειχθεί, η ανίχνευση DTCs/CTCs σχετίζεται με στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης απομακρυσμένων μεταστάσεων και αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για μειωμένη επιβίωση.

Τα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία σε ποσοστό ασθενών που φτάνει μέχρι και το 50%, πιθανώς λόγω της ελαττωμένης ικανότητάς τους για

πολλαπλασιασμό. Εντούτοις, κάποια από τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν περισσότερο επιθετική συμπεριφορά και οδηγούν στη δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Ως δείκτης της βιολογικής συμπεριφοράς και της «μεταστατικότητας» των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων έχει προταθεί η έκφραση του HER2 υποδοχέα. Η υπερέκφραση του HER2 φτάνει στο 60% των ασθενών με θετικά DTCs, ανεξαρτήτως της έκφρασης του υποδοχέα στον πρωτοπαθή όγκο όπου περιορίζεται στο 20-25% των περιπτώσεων. Η υπερέκφραση του HER2 στα DTCs αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μειωμένη επιβίωση.

**Δεδομένης της δραστηριότητας του αντι-HER2 μονοκλωνικού αντισώματος trastuzumab στον HER2-θετικό πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο του μαστού, διερευνήθηκε η επίδραση του αντισώματος στα DTCs και CTCs αυτών των ασθενών. Στόχος της παρούσης διατριβής ήταν να δείξει α) αν ένας βιολογικός παράγοντας, όπως το trastuzumab, μπορεί να συμβάλλει στην εξάλειψη των μικρομεταστατικών κυττάρων που επιβιώνουν παρά τη χορήγηση της κλασικής χημειοθεραπείας και β) αν η χορήγηση του trastuzumab σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού που έχουν ανιχνεύσιμα CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας επηρεάζει την κλινική έκβαση της νόσου.**

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **A. Μελέτη της επίδρασης του trastuzumab στα CK19mRNA-θετικά CTCs ή/και DTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού**

### **1. Ασθενείς / Κριτήρια ένταξης**

Στη μελέτη εντάχθηκαν 30 προθεραπευμένες ασθενείς με πρώιμο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού, με κύριο κριτήριο τη θετική ανίχνευση CK-19mRNA κυττάρων με τη μέθοδο της nested RT-PCR στο περιφερικό αίμα και/ή στο μυελό των οστών μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας ή/και της ορμονικής θεραπείας. Όλες οι ασθενείς θα έπρεπε προηγουμένως να έχουν λάβει τουλάχιστον μία γραμμή χημειοθεραπείας ή/και ορμονοθεραπείας, εφόσον ενδείκνυται, πριν την επιβεβαίωση της CK-19mRNA θετικότητας. Οι προηγηθείσες θεραπείες έπρεπε να έχουν ολοκληρωθεί τουλάχιστον 1 μήνα προ της ένταξης στη μελέτη ενώ δεν επιτρεπόταν να έχει προηγηθεί θεραπεία με trastuzumab (Herceptin). Μετά την ένταξη στη μελέτη δεν επιτρεπόταν η συγχορήγηση άλλης αντινεοπλασματικής θεραπείας, συνεπώς ασθενείς με κλινική επιδείνωση της νόσου που απαιτούσε άμεση έναρξη άλλης θεραπείας εξέρχονταν της μελέτης.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ένταξη στη μελέτη ήταν η απουσία ιστορικού σοβαρής καρδιοπάθειας και η ύπαρξη φυσιολογικού κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας (LVEF) σε υπερηχογράφημα καρδιάς ή ραδιοϊσοτοπική κοιλιογραφία (MUGA, Technetium-99 multiple gated acquisition-scan).

Στον Πίνακα 1, φαίνονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη. Η διάμεση ηλικία ήταν 53 έτη και 13 ασθενείς (43%) ήταν προεμμηνοπαυσιακές. Επίσης, 13 ασθενείς (43%) είχαν πρώιμη νόσο σταδίου I-III, ενώ 17 ασθενείς (57%)

είχαν μεταστατικό καρκίνο του μαστού. 11 ασθενείς (37%) είχαν αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς στον πρωτοπαθή όγκο.

Υπερέκφραση HER2 (2+ ή 3+) στον πρωτοπαθή όγκο βρέθηκε σε 10 (33%) ασθενείς, με ανοσοϊστοχημεία. Ωστόσο, η υπερέκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο δεν αποτέλεσε κριτήριο ένταξης στη μελέτη, δεδομένου ότι με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα η υπερέκφραση του HER2 στα διεσπαρμένα στο μυελό καρκινικά κύτταρα ανέρχεται σε ποσοστό περίπου 60% και είναι ανεξάρτητη αυτής του πρωτοπαθούς όγκου<sup>69,91</sup>. Ασθενείς με HER2-θετικό όγκο δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία με trastuzumab, αφού η ένταξή τους στη μελέτη έγινε πριν τη δημοσίευση των θετικών αποτελεσμάτων των μελετών χορήγησης trastuzumab σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού<sup>106-109</sup>. Η πλειοψηφία των ασθενών με μεταστατική νόσο είχε προηγουμένως λάβει πολλαπλές γραμμές χημειοθεραπείας, με διάμεσο αριθμό χημειοθεραπευτικών σχημάτων για το σύνολο των ασθενών 1 (εύρος, 1-4 σχήματα). Όλα τα διαθέσιμα δείγματα αναλύθηκαν και για το HER2mRNA με τη μέθοδο της nested RT-PCR.

Η επιλογή και η ένταξη των ασθενών στη μελέτη έγινε κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2001 έως και Νοέμβριος 2002. Προ της ένταξης στη μελέτη γινόταν ενημέρωση των ασθενών με έντυπο πληροφόρησης εγκεκριμένο από την Επιστημονική Επιτροπή του ΠΑ.Γ.Ν.Η και δινόταν έγγραφη συγκατάθεση συμμετοχής. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος και μυελού των οστών, η χορήγηση του αντισώματος και η παρακολούθηση των ασθενών έγινε στα εξωτερικά ιατρεία της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑ.Γ.Ν.Η.



## Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών

<b>Αριθμός ασθενών</b>	30	
<b>Ηλικία, διάμεση (εύρος)</b>	53	(31-75)
<b>Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση</b>		
Προεμμηνοπαυσιακές	13	(43%)
Μετεμμηνοπαυσιακές	17	(57%)
<b>Στάδιο νόσου</b>		
I	3	(10%)
II	6	(20%)
III	4	(13%)
IV	17	(57%)
<b>Έκφραση ορμονικών υποδοχέων</b>		
ER+PR+	6	(20%)
ER+PR-	7	(23%)
ER-PR+	4	(13%)
ER-PR-	11	(37%)
Άγνωστο	2	(7%)
<b>Έκφραση HER-2 πρωτοπαθούς όγκου</b>		
3+	6	(20%)
2+	4	(13%)
1+	5	(17%)
0	14	(47%)
Άγνωστο	1	(3%)
<b>Προηγηθείσα θεραπεία</b>		
Χειρουργείο	30	(100%)
Ακτινοθεραπεία	18	(60%)
Ορμονική θεραπεία	12	(40%)
Χημειοθεραπεία	30	(100%)
Επικουρική	22	(73%)
Προεγχειρητική	7	(23%)
1 <sup>η</sup> γραμμή	17	(57%)
≥2 <sup>η</sup> γραμμή	10	(33%)

## **2. Δείγματα / Θεραπεία**

### **2.1. Λήψη δειγμάτων**

Η ανίχνευση του CK-19mRNA στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών γινόταν στους παρακάτω χρόνους: α) ως πρώτος έλεγχος (screening) για την ανίχνευση της ύπαρξης ανθεκτικών στη χημειοθεραπεία ή/και ορμονοθεραπεία διάσπαρτων καρκινικών κυττάρων μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, β) πριν την έναρξη χορήγησης του Herceptin για επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων, γ) μετά τη χορήγηση του Herceptin για εκτίμηση του αποτελέσματος και δ) ανά 3 μήνες στη διάρκεια της παρακολούθησης μέχρι την επανεμφάνιση CK-19mRNA θετικών κυττάρων.

Δείγματα περιφερικού αίματος (20 mL σε EDTA) λαμβάνονταν στο μέσο της φλεβοκέντησης, αφού είχαν απορριφθεί τα πρώτα 5 mL αίματος. Η διαδικασία αυτή γινόταν προληπτικά για την αποφυγή επιμόλυνσης του δείγματος κατά τη λήψη του με επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας. Αναρρόφηση δειγμάτων μυελού των οστών (4 mL σε EDTA) γινόταν από την οπίσθια λαγόνια ακρολοφία, υπό τοπική αναισθησία.

### **2.2. Θεραπεία**

Μελετήθηκαν 2 διαφορετικά κλινικά δόκιμα σχήματα χορήγησης του trastuzumab (Herceptin, Roche, Basel, Switzerland). Οι πρώτες 20 ασθενείς έλαβαν trastuzumab (ενδοφλέβια) σε δόση εφόδου 4 mg/Kg βάρους σώματος ακολουθούμενου από δόση 2 mg/Kg ανά εβδομάδα για 4-8

διαδοχικές εβδομάδες. Η ανασύσταση του αντισώματος γινόταν σε 250 mL διαλύματος χλωριούχου νατρίου (NaCl) 0.9% και η έγχυσή του διαρκούσε 30 λεπτά. Μετά τις 4 πρώτες εβδομάδες χορήγησης του αντισώματος, γινόταν επανεκτίμηση των CK-19mRNA κυττάρων με nested RT-PCR. Αν αυτό ήταν αρνητικό τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο μυελό η χορήγηση του trastuzumab διακοπτόταν, ενώ αν εξακολουθούσε να είναι θετικό είτε στο περιφερικό αίμα είτε στο μυελό, το αντίσωμα δινόταν για 4 επιπλέον εβδομάδες και ακολουθούσε επανάληψη της RT-PCR για CK-19mRNA. Επί εμμονής του θετικού αποτελέσματος η χορήγηση σταματούσε. Οι τελευταίες 10 ασθενείς έλαβαν trastuzumab σε δόση εφόδου 8 mg/Kg βάρους σώματος ακολουθούμενου από δόση 6 mg/Kg χορηγούμενων κάθε 3 εβδομάδες για 2-3 φορές. Εάν μετά τις 2 πρώτες εγχύσεις το CK-19mRNA ήταν αρνητικό τόσο στο αίμα όσο και στο μυελό, η χορήγηση του trastuzumab διακοπτόταν ενώ αν παρέμενε θετικό είτε στο αίμα είτε στο μυελό γινόταν μία επιπλέον έγχυση trastuzumab στα 6 mg/Kg και ακολουθούσε επανάληψη της RT-PCR. Επί εμμονής του θετικού αποτελέσματος η χορήγηση σταματούσε.

Επιπλέον, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα μη ειδικής δράσης του αντισώματος, σε μια ομάδα ελέγχου 5 CK-19mRNA θετικών ασθενών που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης της μελέτης, χορηγήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG ενδοφλέβια (Sandoglobulin, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) στη δόση των 500 mg/Kg εφ' άπαξ. Η ανίχνευση του CK-19mRNA με RT-PCR επαναλήφθηκε 1 εβδομάδα μετά τη χορήγηση της ανοσοσφαιρίνης.

### **2.3. Παρακολούθηση**

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του Herceptin στην εξάλειψη των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων, έγινε ανίχνευση του CK-19mRNA με τη μέθοδο της RT-PCR σε δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών ανά 3 μήνες μετά την ολοκλήρωση της χορήγησης του αντισώματος. Η χρονική διάρκεια της αρνητικοποίησης υπολογίστηκε από τη στιγμή του πρώτου CK-19mRNA αρνητικού αποτελέσματος τόσο στο αίμα όσο και στο μυελό μέχρι την επανεμφάνιση CK-19mRNA θετικών κυττάρων στο αίμα ή/και στο μυελό ή μέχρι το θάνατο της ασθενούς. Όλες οι ασθενείς παρακολουθούνταν στενά για ανεπιθύμητες ενέργειες και ιδιαίτερα για καρδιοτοξικότητα με τακτικό προσδιορισμό του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας με MUGA scan ή υπερηχογράφημα καρδιάς.

### **3. Μέθοδοι**

#### **Μοριακή ανίχνευση CK19mRNA+ κυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών**

##### **3.1. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων**

Το δείγμα αίματος (20 mL) ή μυελού των οστών (4 mL) μετά τη λήψη του τοποθετείται σε σωληνάριο γενικής αίματος που περιέχει EDTA και ακολούθως μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρισης των 50 mL. Στη συνέχεια, το δείγμα αραιώνεται (1/1 όγκο PBS για το περιφερικό αίμα και 1/4-5 όγκους PBS για το

μυελό των οστών) με στείρο διάλυμα PBS (8.0 g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 1.15g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3). Το διάλυμα τοποθετείται σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου τύπου Falcon των 50 mL, όπου έχει ήδη προστεθεί Ficoll με πυκνότητα 1,077g/mL (Ficoll-Histopaque 1077, Sigma) όγκου ίσου με το ½ του όγκου του διαλύματος. Το αραιωμένο δείγμα τοποθετείται με προσοχή πάνω στην επιφάνεια της Ficoll, ώστε να μην αναμειχθούν τα δύο υγρά και τελικά να σχηματισθούν δύο στιβάδες με δείγμα και Ficoll.

Πραγματοποιείται διαβαθμισμένη φυγοκέντριση του δείγματος (στα 1.200g, για 30 min, στους 4 °C). Μετά τη φυγοκέντριση η στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων βρίσκεται μεταξύ της στιβάδας της Ficoll και της στιβάδας ορού και PBS. Η Ficoll έχοντας ειδική πυκνότητα μεταξύ των λεμφοκυττάρων/ μονοπύρηνων και ερυθροκυττάρων/ κοκκιοκυττάρων διαχωρίζει τις δύο στιβάδες και γίνεται δυνατή η λήψη των μονοπύρηνων.

Αφού συλλεχθεί ο δακτύλιος των μονοπύρηνων σε ξεχωριστό αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρου, με προσοχή ώστε να αναρροφηθεί η ελάχιστη δυνατή ποσότητα Ficoll η οποία είναι κυτταροτοξική, τα μονοπύρηνια κύτταρα πλένονται 2 φορές με PBS (50 mL, φυγοκέντριση στα 1.600g για 10 min, στους 18 °C). Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα των κυττάρων είτε χρησιμοποιείται αμέσως είτε φυλάσσεται στους -80 °C.

Μεταξύ των 2 εκπλύσεων με PBS γίνεται η καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων. Αναμειγνύονται 10μL από το διαλυμένο ίζημα με 90μL χρωστικής κυανού του τρυπανίου (Sigma) και γίνεται μικροσκόπηση σε πλάκα κυτταρομέτρησης. Τα αποπτωτικά κύτταρα προσλαμβάνουν χρωστική (μπλε) και εξαιρούνται από την καταμέτρηση, όπως επίσης και τα ερυθρά με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους.

### 3.2. Απομόνωση ολικού RNA

Η μέθοδος που ακολουθείται για την απομόνωση του RNA αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi<sup>113</sup>. 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 στην παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ενός αποδιατακτικού παράγοντα, ο οποίος βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκα τους με το RNA και επιπλέον αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά τη λύση των κυττάρων. Η αναστολή αυτή επιτρέπει την απομόνωση μη αποδομημένου RNA. Η όλη προετοιμασία και ολοκλήρωση της μεθόδου, εκτός των φυγοκεντρίσεων, γίνεται σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής για εξασφάλιση συνθηκών ελεύθερων από μολύνσεις.

Αρχικά  $1 \times 10^6$  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 °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 °C, φυγοκεντρείται για 10 min στα 12.000g, στους 4°C.

Το διάλυμα κατά τη φυγοκέντρωση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: α) στην κατώτερη ερυθρωπή, οργανική φάση στην οποία παραμένουν οι πρωτεΐνες και όλα τα κυτταρικά υπολείμματα, β)

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 °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 δισαπνεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) επεξεργασμένο με αναστολέα νουκλεασών DEPC (διεθυλπυροκαρβονικό άλας 97%, Sigma). Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και φυγοκέντρισή του για 5 min στα 7.500g, στους 4 °C. Αν το ίζημα είναι έντονα λευκό, επαναλαμβάνουμε την 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<sub>2</sub>O, σε σωληνάριο τύπου errendorf και τοποθετείται για 10 min στους 55-65 °C (είτε σε υδατόλουτρο, είτε σε κλίβανο), ώστε να ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση του RNA. Από το τελικό υδατικό διάλυμα χρησιμοποιείται 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.

### 3.3. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) προς συμπληρωματικό DNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου «ανάστροφη μεταγραφάση» και χρησιμοποιείται το σύστημα Thermoscript RT-PCR (Gibco, BRL). Το ένζυμο για να ξεκινήσει 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 erpendorf 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 στην περίπτωση απλού πολυαδενυλικού RNA χρησιμοποιείται 1 μL Oligo (dT)<sub>20</sub> (50μM) και
- γ) DEPC-H<sub>2</sub>O σε ποσότητα που να συμπληρώνεται συνολικός όγκος του μίγματος 10 μL.

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

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



- α) 4  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος για cDNA (5x)
- β) 1  $\mu\text{L}$  διθειοθρεϊτόλης (DTT, 0.1 M)
- γ) 1  $\mu\text{L}$  διαλύματος αναστολέα RNασών (RNaseOUT, 40U/ $\mu\text{L}$ )
- δ) 1  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$
- ε) 2  $\mu\text{L}$  μίγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTP mix, 10 mM) και
- στ) 1  $\mu\text{L}$  αντίστροφης μεταγραφάσης (ThermoScript RT, 5 U/ $\mu\text{L}$ ).

Το παραπάνω μίγμα προστίθεται στο αρχικό και στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση του δείγματος για 60 min στους 50 °C, όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής Oligo (dT)<sub>20</sub> και δρα η αντίστροφη μεταγραφάση, σε προθερμασμένο θερμικό κυκλοποιητή. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85 °C, όπου αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA-cDNA και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ τελικά στο διάλυμα προστίθεται 1  $\mu\text{L}$  RNase H για την αποδόμηση του συμπληρωματικού RNA και ακολουθεί επώαση για 20 min στους 37 °C. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), είτε φυλάσσεται στους -20 °C.

#### **3.4. Έλεγχος ποιότητας των RNA δειγμάτων της RT-PCR**

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

### 3.5. Ανίχνευση του CK19mRNA με RT-PCR

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Thermoscript RT-PCR system (Gibco, BRL). 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 την 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<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub>, 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<sup>2</sup>) και σε επωαστήρα κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO<sub>2</sub> σε αέρα και θερμοκρασία 37 °C. 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<sub>10</sub>) του αριθμού των βάσεων τους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την 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<sup>53</sup> 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 μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος από 54 υγιείς γυναίκες δότριες και βρέθηκε ότι μόνο 2 (3.7%) δείγματα ήταν θετικά, ενώ 52 (96.3%) δείγματα ήταν αρνητικά<sup>53</sup>.

Στους Πίνακες 2-6 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 (Stathoroulou A et al., Datta YH et al. 1994)<sup>53,12</sup>.

**Πίνακας 2.** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη για την CK-19 και τη β-ακτίνη

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

**Πίνακας 3.** Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης

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

**Πίνακας 4.** 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 <sub>2</sub> , 50 mM	1.5
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς MgCl <sub>2</sub> ), (10X)	5
cDNA	1
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2
DEPC-treated H <sub>2</sub> O	36.3
Συνολικός όγκος	50

**Πίνακας 5.** Συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της CK-19

Στάδιο PCR	1 <sup>η</sup> PCR	2 <sup>η</sup> PCR
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 °C-6min	94 °C-2min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94 °C-50sec	94 °C-50sec
Υβριδισμός εκκινητών στο DNA	72 °C	72 °C
Επέκταση εκκινητών	2:30min	2min
Τελική επέκταση των εκκινητών	72 °C-10min	72 °C-10min
Αριθμός κύκλων	35	35

**Πίνακας 6.** Συστατικά των αντιδράσεων PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της CK-19

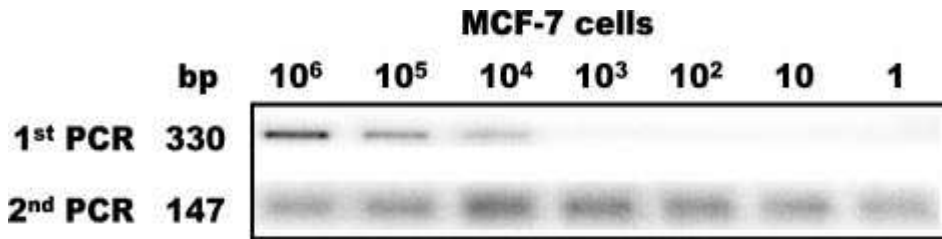
Διαλύματα	Προστιθέμενος όγκος (μL)	
	1 <sup>η</sup> PCR	2 <sup>η</sup> PCR
Πρόσθιος εκκινητής, (10 μM)	1	1
Ανάστροφος εκκινητής, (10 μM)	1	1
dNTPs, (5 μM)	2	2
MgCl <sub>2</sub> , 50 mM	1.5	1.5
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς MgCl <sub>2</sub> ), (10X)	5	5
cDNA	5	-
Προϊόν 1 <sup>ης</sup> PCR	-	3
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2	0.2
DEPC-treated H <sub>2</sub> O	34.3	36.3
Συνολικός όγκος, μL	50	50

### 3.6. Ανίχνευση του HER2mRNA με RT-PCR

Η ανίχνευση της έκφρασης του HER2mRNA στα CK19-θετικά δείγματα, προ της χορήγησης του trastuzumab, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της nested RT-PCR και το σύστημα ThermoScript RT-PCR.

Η διπλή RT-PCR για την ανίχνευση των HER2mRNA+ κυττάρων αναπτύχθηκε από τους Apostolaki et al<sup>72</sup> Για να μελετηθεί η ευαισθησία της μεθόδου, αναμίχθηκαν MCF-7 και SKBR3 κύτταρα με φυσιολογικά PBMCs σε αναλογία από 1:10 σε 1:10<sup>6</sup>, απομονώθηκε ολικό RNA από αυτές τις κυτταρικές αραιώσεις και ελέγχθηκε για HER2mRNA με διπλή RT-PCR. Σε 3 από τα 3 πειράματα, η μέθοδος μπορούσε να ανιχνεύσει 1 MCF-7 κύτταρο σε 10<sup>5</sup> και 1 SKBR3 κύτταρο σε 10<sup>6</sup> φυσιολογικά PBMCs. Στην εικόνα 2 φαίνεται ένα δοσοεξαρτώμενο 147bp σήμα που αντιστοιχεί στο HER2mRNA της σειράς SKBR3, ενώ το 154bp σήμα που αντιστοιχεί στο γονίδιο της β-ακτίνης, έχει την ίδια ένταση σε όλες τις αραιώσεις. HER2mRNA+ κύτταρα δεν ανιχνεύθηκαν σε καμιά από τις 31 υγιείς γυναίκες, τις 20 ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο και τις 12 γυναίκες με καλοήθεις παθήσεις του μαστού<sup>72,114</sup>.

Σχετικά με την ευαισθησία της μεθόδου στη συγκεκριμένη μελέτη, ελέγχθηκαν διαφορετικές αραιώσεις MCF-7 και T47D HER2-θετικών κυττάρων καρκίνου του μαστού. Στα πειράματα, η nested RT-PCR του ολικού RNA μπορούσε να ανιχνεύσει το HER2mRNA από την αραιώση των 10 και πάνω MCF-7 ή T47D κυττάρων, ωστόσο στο 1 από τα 5 πειράματα το HER2mRNA ανιχνεύθηκε στην αραιώση του 1 κυττάρου (εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Nested RT-PCR με διαδοχικές αραιώσεις MCF-7 κυττάρων καρκίνου μαστού. Ανίχνευση του HER2mRNA στη 2<sup>η</sup> PCR στην αραιώση του 1 κυττάρου (1 στα 5 πειράματα).

Στους πίνακες 7, 8 και 9 περιγράφονται οι αλληλουχίες των 4 εκκινητών, τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες της PCR για την ενίσχυση του HER2mRNA (Apostolaki S et al)<sup>72</sup>.

**Πίνακας 7.** Αλληλουχίες εκκινητών PCR για το HER-2.

Δείκτης	Μέθοδος	Εκκινητές	Αλληλουχία 5'-3'	Προϊόν (bp)
HER-2	Nested RT-PCR	Πρόσθιος (Her-2-A)	TCCTCCTCGCCCTCTTGC	1 <sup>η</sup> PCR 330
		Ανάστροφος (Her-2-B)	GCGGGTCTCCATTGTCTA	
		Πρόσθιος (Her-2-C)	AGCCGCGAGCACCCAAGT	2 <sup>η</sup> PCR 147
		Ανάστροφος (Her-2-D)	ACCTGCTGAACTGGTGTATGCA	



**Πίνακας 8.** Συνθήκες RT-PCR για την ενίσχυση του HER2mRNA<sup>72</sup>

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

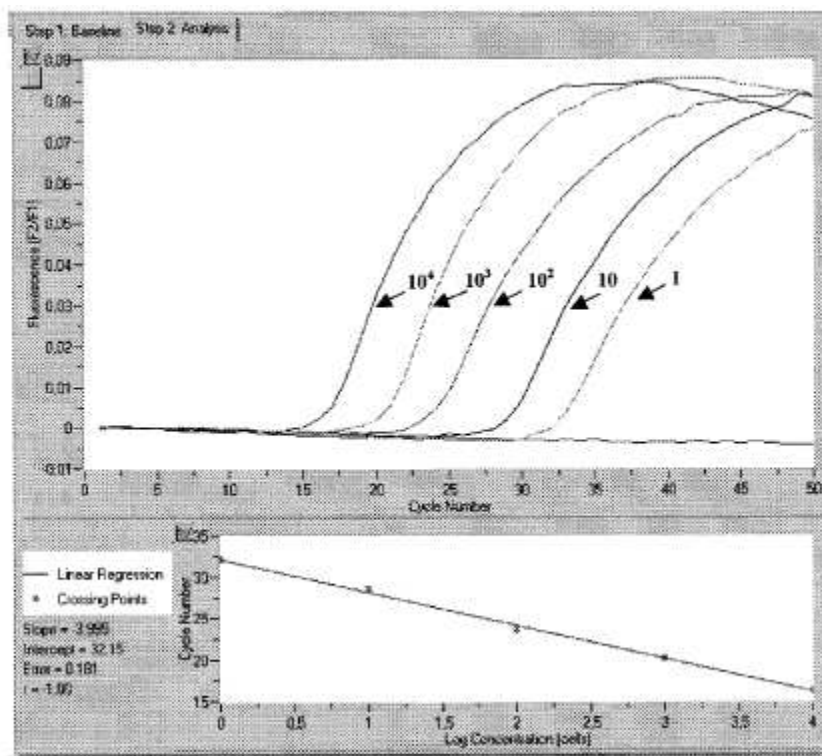
**Πίνακας 9.** Συστατικά των αντιδράσεων PCR για την ενίσχυση του HER2mRNA<sup>72</sup>

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

### 3.7. Ανίχνευση του CK19mRNA με real-time RT-PCR

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

Η real-time RT-PCR μέθοδος για την ανίχνευση CK19mRNA+ κυτάρων αναπτύχθηκε από τους Stathoroulou et al<sup>54</sup> Με βάση το αναλυτικό όριο ανίχνευσης της μεθόδου, η παρουσία  $\geq 0.6$  MCF-7 ισοδυνάμων κυττάρων/5μg ολικού RNA θεωρήθηκε θετικό αποτέλεσμα (εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Χαρακτηριστικές καμπύλες real-time RT-PCR για τη CK19 χρησιμοποιώντας cDNA από διαδοχικές αραιώσεις RNA που αντιστοιχεί σε 1, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> MCF-7 κύτταρα, αντίστοιχα (Stathoroulou A, et al. Clin Cancer Res 2003).

Χρησιμοποιώντας το ανωτέρω cut-off, μόνο 2 από τις 89 υγιείς γυναίκες ήταν θετικές (2.2%)<sup>54</sup>. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας την παραπάνω μέθοδο καμία από τις 9 γυναίκες με καλοήγη νόσο του μαστού δεν είχε θετικό δείγμα αίματος.

Για την 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 την GAPDH σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν από την εταιρία TIB MOLBIOL, ενώ για την PBGD χρησιμοποιήθηκε το PBGD LightCycler-h-PBGD housekeeping gene set (Roche, Switzerland).

Στους Πίνακες 10,11 και 12 περιγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια της real-time RT-PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA (Stathopoulou A, et al)<sup>54</sup>.

**Πίνακας 10.** 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 11.** Συνθήκες real-time PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA<sup>54</sup>

Στάδιο PCR	1 <sup>η</sup> 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 12.** Συστατικά των αντιδράσεων real-time PCR για την ενίσχυση του CK19mRNA<sup>54</sup>

<b>Διαλύματα</b>	<b>Όγκος (μL)</b>
	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 <sub>2</sub> , 50mM	1
PCR ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς MgCl <sub>2</sub> ), (10X)	2
cDNA	1
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0.2
DEPC-treated H <sub>2</sub> O	11.1
Συνολικός όγκος, μL	20.0

### **3.8. Ανοσοϊστοχημεία για την έκφραση του HER-2 στον πρωτοπαθή όγκο**

Η έκφραση του HER2 στον πρωτοπαθή όγκο μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία, τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος CB11 (NCL-CB11, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) και το OPTIMAX αυτοματοποιημένο σύστημα (BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA). Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων βασίσθηκε στα κριτήρια που προτείνει η DAKO A/S για το HercepTest (DAKO A/S, Glostrup, Denmark). Η μεμβρανική ένταση χρώσης βαθμολογήθηκε με κλίμακα από 0 έως 3+: το score 0 και 1+ θεωρήθηκε αρνητικό, το score 2+ θεωρήθηκε ασθενώς θετικό, και το score 3+ θεωρήθηκε (έντονα) θετικό.

### **3.9. Φθορίζων in situ υβριδισμός (FISH) για έκφραση του HER-2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα και Ανευσωμία**

Από το περιφερικό αίμα ή τον μυελό των οστών, τα μονοπύρρηνα κύτταρα διαχωρίζονται με διαβαθμιζόμενη φυγοκέντριση και με τη χρήση Ficoll/Hyraque.

Στη συνέχεια, στρώνονται πλακίδια ( $5 \times 10^5$  μονοπύρρηνα κύτταρα/πλακίδιο) με κυτταροφυγόκεντρο και φυλάσσονται στους  $-70^{\circ}\text{C}$ . Για να χρησιμοποιηθούν τα πλακίδια πρέπει να μείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Εμβαπτίζονται σε 70% οξικό οξύ για 30 sec, πλένονται και αφυδατώνονται σε αιθανόλη. Εμβαπτίζονται σε παγωμένη ακετόνη για 2 min και στεγνώνουν στον αέρα. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε 2X SSC διάλυμα (pH 5.3) για 2 min στους  $73^{\circ}\text{C}$ .

Ακολουθεί πρωτεϊνόλυση με pepsin για 5 min στους 37°C και στη συνέχεια τα πλακίδια τοποθετούνται σε διάλυμα 2X SSC για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί σταθεροποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα formalin για 5 min και σε 2X SSC για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και αφυδατώνεται με αιθανόλη.

Για την υβριδοποίηση χρησιμοποιούμε τους ανιχνευτές (probes) PathVysion HER-2 DNA και ένα σετ ανιχνευτών Ανευσωμίας του Μαστού (Vysis, Downers Grove, IL) οι οποίοι επωάζονται στους 85°C για 2 min και στη συνέχεια 24h στους 37°C. Την επομένη τα πλακίδια τοποθετούνται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα για 2 min στους 72°C. Προσθέτουμε 10μL από 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) και τοποθετούμε καλυπτρίδες. Τα πλακίδια μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.

Η αξιολόγηση γίνεται με το μικροσκόπιο AxioPlane 2 Nikon με φίλτρα Vysis και οι εικόνες επεξεργάζονται με το σύστημα Metasystems' ISIS fluorescence in situ hybridization (FISH) imaging system (Altlussheim, Germany). Για τον ανιχνευτή HER-2/neu χρησιμοποιούμε τα φίλτρα πορτοκαλί, πράσινο και DAPI. Για τον ανιχνευτή Ανευσωμίας του Μαστού χρησιμοποιούμε τα φίλτρα κόκκινο, χρυσό, πράσινο, μπλε και DAPI.

Θεωρούμε FISH HER-2/neu θετικά τα κύτταρα με >4 πορτοκαλί σήματα ή το κλάσμα HER-2/neu πορτοκαλί σήματα προς CEP17 (χρωμόσωμα 17) πράσινα σήματα  $\geq 2$  σε περίπτωση ανευπλοϊδίας. Σε ένα φυσιολογικό διπλοειδές κύτταρο, υπάρχουν 2 αντίγραφα για καθένα από τα ακόλουθα:

LSI 1 (2 χρυσά σήματα), CEP8 (χρωμόσωμα 8) [2 κόκκινα σήματα], CEP11 (χρωμόσωμα 11) [2 πράσινα σήματα] και CEP17 (χρωμόσωμα 17) [2 μπλε σήματα].

Ο αριθμός των αντιγράφων από περισσότερα ή λιγότερα από 2 σήματα για οποιονδήποτε ανιχνευτή υποδεικνύει ενίσχυση ή απώλεια χρωμοσώματος, αντίστοιχα.



## **B. Μελέτη της επίδρασης του trastuzumab στην κλινική έκβαση των ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά κύτταρα μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας**

### **1. ΣΚΕΠΤΙΚΟ**

Η ανίχνευση ανθεκτικών CK+/HER2+ DTCs και CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού<sup>57</sup>. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους της παρούσας μελέτης, το trastuzumab επιτυγχάνει την εξάλειψη των CK19mRNA-θετικών CTCs και DTCs ανεξάρτητα από το HER2 status του πρωτοπαθούς όγκου<sup>131</sup>.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, μελετήσαμε τη «συμπληρωματική χορήγηση» του trastuzumab σε ασθενείς με χημειοανθεκτικά CTCs με σκοπό τη μείωση της επίπτωσης των κλινικών υποτροπών.

### **2. Ασθενείς και μέθοδοι**

Η μελέτη συμπεριέλαβε γυναίκες με πρώιμο HER2-αρνητικό καρκίνο του μαστού και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής λόγω της παρουσίας CK19mRNA-θετικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, πριν και μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας ή/και ακτινοθεραπείας. Οι ασθενείς με HER2-θετικούς όγκους εξαιρέθηκαν από τη μελέτη, δεδομένου ότι η

χορήγηση του trastuzumab αποτελεί για αυτές καθιερωμένη συμπληρωματική θεραπεία.

Όλες οι ασθενείς είχαν προηγουμένως λάβει την καθιερωμένη συμπληρωματική συστηματική χημειοθεραπεία (σχήματα CMF, FEC ή διαδοχική χορήγηση του συνδυασμού epirubicin/cyclophosphamide ακολουθούμενου από docetaxel) και ακτινοθεραπεία, με βάση τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες. Επιπλέον, οι μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με ορμονοευαίσθητους όγκους ελάμβαναν ταμοξιφαίνη ή αναστολέα αρωματάσης ενώ οι προεμμηνοπαυσιακές ελάμβαναν LH/RH αγωνιστές και ταμοξιφαίνη.

### **3. Δείγματα και ανίχνευση CK19mRNA**

Όλες οι ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού υποβάλλονται σε έλεγχο ρουτίνας για την παρουσία CK19mRNA-θετικών CTCs, με τη μέθοδο της real-time PCR, κατά την αρχική σταδιοποίηση της νόσου και πριν την έναρξη οποιασδήποτε συστηματικής θεραπείας. Επιπλέον, η ανίχνευση των CK19mRNA-θετικών CTCs επαναλαμβάνεται συστηματικά αμέσως μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας και ακολούθως ανά 3 μήνες. Η χορηγούμενη θεραπεία είναι ανεξάρτητη της ύπαρξης ή όχι CK19mRNA-θετικών CTCs στο περιφερικό αίμα.

Δείγματα περιφερικού αίματος στη μελέτη ελήφθησαν: 1) πριν και μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας/ακτινοθεραπείας, 2) στις ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν στο σκέλος του trastuzumab, μετά την 6<sup>η</sup> χορήγηση του αντισώματος και 3) στις ασθενείς που

τυχαιοποιήθηκαν στο σκέλος της παρακολούθησης, 4 μήνες μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας/ακτινοθεραπείας (χρόνος που αντιστοιχεί στην ολοκλήρωση της 6<sup>ης</sup> χορήγησης του trastuzumab).

#### **4. Θεραπεία και παρακολούθηση**

Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν είτε στο σκέλος του trastuzumab (Herceptin, Roche, Basel, Switzerland; αρχική δόση εφόδου 8 mg/kg βάρους σώματος σε ενδοφλέβια έγχυση 30 λεπτών ακολουθούμενη από 5 επιπλέον χορηγήσεις στη δόση των 6 mg/kg, κάθε 3 βδομάδες) είτε στο σκέλος της παρακολούθησης μόνο. Δεν επιτρεπόταν συγχορήγηση άλλης θεραπείας, πλην της συμπληρωματικής ορμονοθεραπείας για τις ασθενείς με ορμονοευαίσθητους όγκους.

Όλες οι ασθενείς της μελέτης υποβάλλονταν σε τακτική παρακολούθηση ανά 3 μήνες για τα πρώτα 2 χρόνια, ανά 6 μήνες για τα επόμενα 3 χρόνια και ανά έτος στη συνέχεια για τον αποκλεισμό μεταστατικής νόσου, με τον συνήθη κλινικοεργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο. Επιπλέον, προ και μετά της χορήγησης του trastuzumab γινόταν εκτίμηση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας (LVEF) για τον έλεγχο της καρδιοτοξικότητας του αντισώματος.

#### **5. Στόχοι – στατιστική ανάλυση**

Πρωτεύον στόχος της μελέτης ήταν η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) στα 3 χρόνια, η οποία υπολογίστηκε ως το χρονικό διάστημα από την ημέρα τυχαιοποίησης έως την

υποτροπή της νόσου, το θάνατο από οποιαδήποτε αιτία, την εμφάνιση δεύτερου πρωτοπαθούς νεοπλασματος, ή την τελευταία ημέρα παρακολούθησης για ασθενείς χωρίς ένδειξη υποτροπής. Δευτερεύον στόχος της μελέτης ήταν το ποσοστό εξάλειψης των CK19mRNA-θετικών κυττάρων.

Με βάση δεδομένα προηγούμενων μελετών, η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) στα 3 χρόνια για ασθενείς με ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά κύτταρα τόσο πριν όσο και μετά την καθιερωμένη συμπληρωματική χημειοθεραπεία ήταν 60%. Εκτιμήθηκε ότι απαιτούνταν η ένταξη 32 ασθενών σε κάθε σκέλος προκειμένου να δείξουμε 50% αύξηση του DFS για το σκέλος του trastuzumab με ισχύ 80% και βαθμό στατιστικής σημαντικότητας 0.05.

Ως παράγοντες διαστρωμάτωσης για την τυχαιοποίηση των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν το εμμηνοπαυσιακό status και το status των μασχαλιαίων λεμφαδένων και των ορμονικών υποδοχέων.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **A. Μελέτη της επίδρασης του trastuzumab στα CK19mRNA-θετικά CTCs ή/και DTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού.**

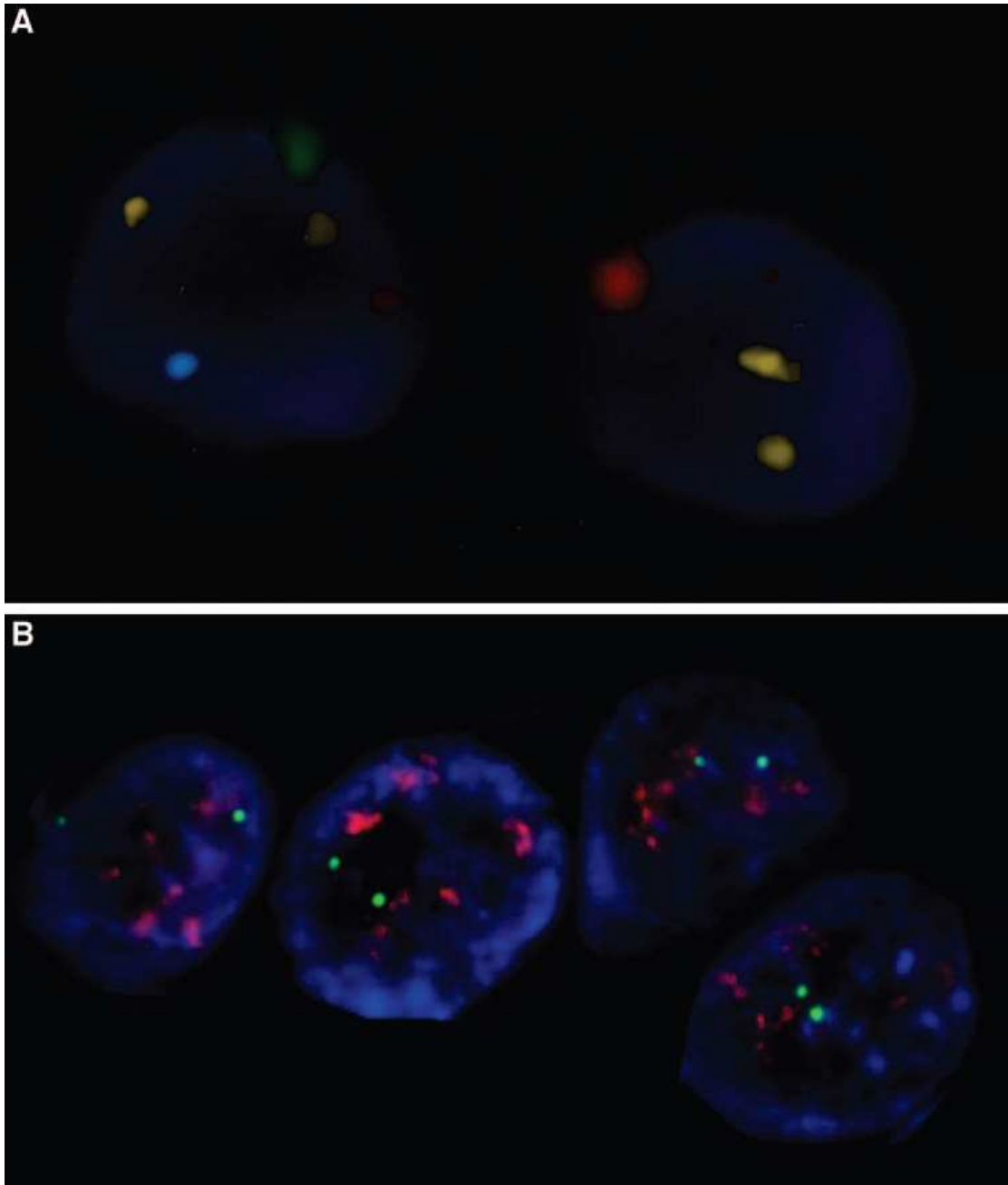
#### **A.1. Χαρακτηριστικά ασθενών προ της ένταξης στη μελέτη**

Στον Πίνακα 13 φαίνεται το στάδιο της νόσου κατά την ένταξη στη μελέτη και το χρονικό διάστημα αναφορικά με τις προηγηθείσες θεραπείες, για τις 30 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με trastuzumab και για τις 5 ασθενείς της «ομάδας ελέγχου» που έλαβαν την ανοσοσφαιρίνη IgG στο πρώτο αυτό στάδιο της μελέτης. Με βάση τα κριτήρια ένταξης όλες οι ασθενείς είχαν CK19mRNA-θετικά κύτταρα με τη μέθοδο της nested RT-PCR στο περιφερικό αίμα και/ή στο μυελό των οστών, μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας και/ή ορμονοθεραπείας και προ της ένταξής τους στη μελέτη.

Σε 25 από τις 30 ασθενείς (83%), ανιχνεύθηκε επιπλέον έκφραση HER2mRNA με nested RT-PCR στα CK19-θετικά δείγματα περιφερικού αίματος και/ή μυελού των οστών προ της χορήγησης του trastuzumab. Σε 5 από τις παραπάνω ασθενείς, μονοπύρηννα κύτταρα από τα προ της χορήγησης του trastuzumab CK19-θετικά δείγματα περιφερικού αίματος και/ή μυελού των οστών ελέγχθηκαν για ανίχνευση γονιδιακής ενίσχυσης του HER2 με την μέθοδο FISH. Κύτταρα με ενίσχυση του HER-2/neu γονιδίου με >10 σήματα και λόγο HER-2/neu προς CEP17 >4 διαπιστώθηκαν και στις 5 περιπτώσεις που εξετάστηκαν. Επίσης, σε 2 περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν κύτταρα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες με τη χρήση του Breast Aneusomy probe set (Vysis) στα γονίδια LSI1, CEP8, CEP11 και CEP17 (Εικόνα 3).

**Πίνακας 13.** Στάδιο νόσου και χρονικό διάστημα ένταξης στη μελέτη αναφορικά με τις προηγηθείσες θεραπείες, για τις 35 ασθενείς

Ασθενής	Στάδιο νόσου	Αριθμός προηγούμενων χημειοθεραπειών	Αριθμός προηγούμενων ορμονοθεραπειών	Χρονική φάση ένταξης αναφορικά με προηγούμενες θεραπείες
1	I	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
2	I	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
3	I	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
4	IIA	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
5	IIA	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
6	IIA	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
7	IIA	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
8	IIB	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
9	IIB	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
10	IIB	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
11	IIIA	1	1	Μετά τη συμπληρωματική ορμονοθεραπεία
12	IIIB	1	1	Μετά ορμονοθεραπεία
13	IIIB	1	1	Μετά ορμονοθεραπεία
14	IIIB	1	1	Μετά ορμονοθεραπεία
15	IV	3	2	Μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
16	IV	2	1	3 μήνες μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
17	IV	4	3	Μετά 4 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
18	IV	2	2	Μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
19	IV	2	2	Μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
20	IV	1	1	2 μήνες μετά 1 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
21	IV	2	2	2 μήνες μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
22	IV	1	1	Μετά 1 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
23	IV	3	2	Μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
24	IV	2	2	Μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
25	IV	3	2	Μετά 3 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
26	IV	2		Μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
27	IV	2		3 μήνες μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
28	IV	3	1	Μετά 1 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
29	IV	1	1	Μετά 1 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
30	IV	2		5 μήνες μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
31	IV	2		1 μήνα μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
32	IV	1		Μετά 1 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
33	IV	1	2	6 μήνες μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία
34	IV	2	1	3 μήνες μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής χημειοθεραπεία
35	IV	1	2	Μετά 2 <sup>ης</sup> γραμμής ορμονοθεραπεία



**Εικόνα 3.** **A.** 2 καρκινικά κύτταρα μαστού με ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 8 (κόκκινο σήμα), 11 (πράσινο σήμα) και 17 (γαλάζιο σήμα) με τη μέθοδο FISH και το Breast Aneusomy probe set from Vysis. **B.** 4 καρκινικά κύτταρα μαστού με ενίσχυση του HER-2/neu γονιδίου (>10 κόκκινα σήματα ανά κύτταρο) με τη μέθοδο FISH και το PathVysion HER-2 DNA probe.

## **A.2. Ανταπόκριση στο trastuzumab του CK-19mRNA με nested RT-PCR**

Οι πρώτες 20 ασθενείς έλαβαν trastuzumab 2 mg/Kg εβδομαδιαίως για 4-8 διαδοχικές εβδομάδες. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 11, προ της χορήγησης του trastuzumab, 12 ασθενείς (60%) είχαν CK-19mRNA θετικά κύτταρα ανιχνεύσιμα μόνο στο μυελό των οστών, 2 (10%) μόνο στο περιφερικό αίμα, και 5 (25%) τόσο στο περιφερικό αίμα όσο και στο μυελό. Σε μία ασθενή, είχε γίνει ανίχνευση CK-19mRNA μόνο στο περιφερικό αίμα, που ήταν θετικό. Μετά από 4 εβδομαδιαίες εγχύσεις trastuzumab, 15 ασθενείς (75%) αρνητικοποίησαν το CK-19mRNA και γι' αυτό διέκοψαν τη θεραπεία. Οι υπόλοιπες 5 ασθενείς που παρέμειναν CK-19mRNA θετικές έλαβαν 4 επιπλέον εβδομαδιαίες εγχύσεις trastuzumab (σύνολο 8 βδομάδες), μετά τις οποίες όλες οι ασθενείς εκτός από μία αρνητικοποίησαν το CK-19mRNA. Έτσι συνολικά, μετά από 4-8 εβδομαδιαίες εγχύσεις, 19 στις 20 (95%) ασθενείς αρνητικοποίησαν το CK-19mRNA, και μόνο μία (5%) ασθενής παρέμεινε θετική παρά τη χορήγηση του trastuzumab (ασθενής με τον αριθμό 4 στον Πίνακα 11).

Οι τελευταίες 10 ασθενείς έλαβαν trastuzumab 6 mg/Kg κάθε 3 βδομάδες για 6-9 διαδοχικές βδομάδες. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 11, προ της έναρξης της θεραπείας, 2 (20%) ασθενείς είχαν CK-19mRNA θετικά κύτταρα μόνο στο μυελό των οστών, 1 (10%) τόσο στο αίμα όσο και στο μυελό, ενώ στις υπόλοιπες 7 (70%) ασθενείς ελέγχθηκε μόνο το περιφερικό αίμα και ήταν θετικό. Μετά τις 6 πρώτες βδομάδες (2 εγχύσεις trastuzumab), 6 (60%) ασθενείς αρνητικοποίησαν το CK-19mRNA και διέκοψαν τη θεραπεία. Οι υπόλοιπες 4 ασθενείς που παρέμειναν CK-19mRNA

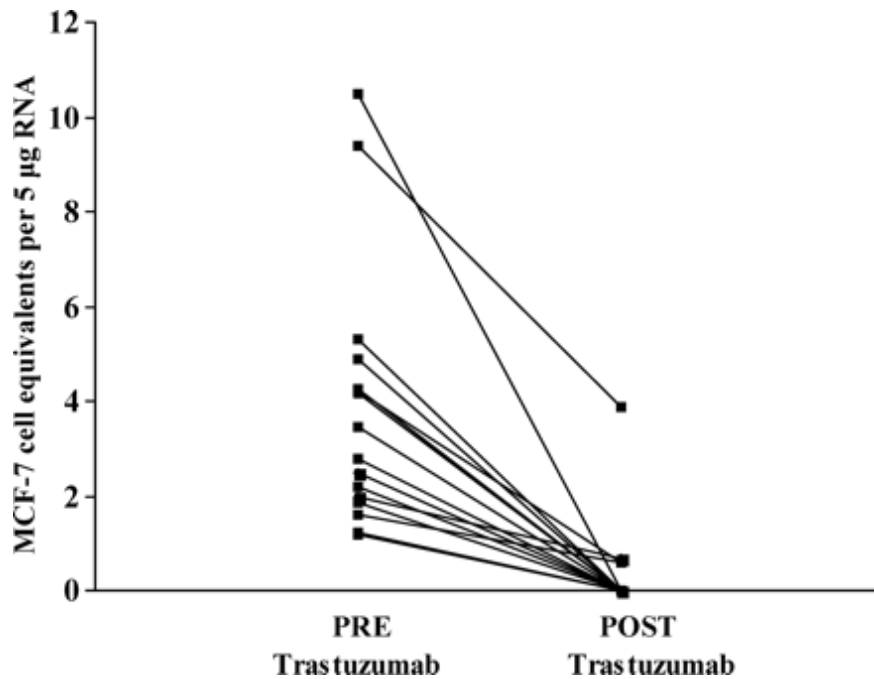


θετικές έλαβαν μία επιπλέον έγχυση trastuzumab (σύνολο 9 βδομάδες), μετά την οποία όλες εκτός από μία ασθενή αρνητικοποίησαν το CK-19mRNA. Έτσι συνολικά, 9 στις 10 (90%) ασθενείς αρνητικοποίησαν το CK-19mRNA μετά από 2-3 εγχύσεις trastuzumab κάθε 3 βδομάδες. Μόνο μία (10%) ασθενής παρέμεινε θετική (ασθενής με τον αριθμό 13 στον Πίνακα 13).

Μετά από διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 6 μηνών (εύρος, 2-22+), η διάμεση διάρκεια διατήρησης του αρνητικού για CK-19mRNA ελέγχου στο σύνολο των 30 ασθενών ήταν 6 μήνες (εύρος, 0-21+), ενώ 13 (43%) ασθενείς εμφάνισαν ξανά CK-19mRNA θετικά κύτταρα στο αίμα ή/και στο μυελό. Η διάμεση διάρκεια εξαφάνισης των CK-19mRNA θετικών κυττάρων σύμφωνα με το στάδιο της νόσου κατά την ένταξη στη μελέτη έχει ως εξής: 9 μήνες (εύρος, 9-18) για το στάδιο I, 9 μήνες (εύρος, 3-9+) για το στάδιο II, 12 μήνες (εύρος, 3-21+) για το στάδιο III, και 6 μήνες (εύρος, 3-15+) για το στάδιο IV [p=0.07 για τη σύγκριση σταδίου IV (μεταστατικό) έναντι σταδίων I-III (μη μεταστατικό) με το log-rank test]. Δύο ασθενείς έλαβαν εκ νέου trastuzumab όταν ξαναέγιναν CK-19mRNA θετικές, και αρνητικοποίησαν ξανά το σήμα και οι δύο μετά από 4 εβδομαδιαίες εγχύσεις των 2 mg/Kg. 18 στις 30 (60%) ασθενείς διέκοψαν την παρακολούθηση λόγω: μη ανταπόκρισης στο trastuzumab (n=2), επανεμφάνισης CK-19mRNA θετικών κυττάρων (n=13), και προόδου νόσου και θανάτου χωρίς επανεμφάνιση CK-19mRNA θετικών κυττάρων (n=3). Τέλος, 12 ασθενείς παρέμειναν CK-19mRNA αρνητικές.

### **A.3. Ανταπόκριση στο trastuzumab του CK-19mRNA με real-time RT-PCR**

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, όλα τα δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού που ήταν διαθέσιμα μετά τη χορήγηση του trastuzumab αναλύθηκαν και με real-time RT-PCR για CK-19mRNA. Βρέθηκε ότι 10 στις 30 (33%) ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα CK-19mRNA θετικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, για 20 ασθενείς, τόσο η nested όσο και η real-time RT-PCR ήταν αρνητικές, για 2 ασθενείς ήταν και οι δύο θετικές και για 8 ασθενείς η real-time RT-PCR ήταν θετική ενώ η nested RT-PCR ήταν αρνητική. Το ποσοστό συμφωνίας θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων ήταν 73.3% (22 στις 30 ασθενείς). Αντικρουόμενα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν σε 4 δείγματα μυελού, 2 περιφερικού αίματος ή και τα δύο (n=2). Όλες οι ασθενείς στις οποίες τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα ως προς τις δύο μεθόδους, είχαν μεταστατική νόσο κατά την ένταξη στη μελέτη. Τα θετικά δείγματα περιείχαν ένα μέσο αριθμό 3.15 (εύρος, 0.6-14.3) MCF-7 ισοδύναμων κυττάρων/5μg RNA. Για 16 ασθενείς, των οποίων δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού προ και μετά τη χορήγηση του trastuzumab αναλύθηκαν με real-time RT-PCR για CK-19mRNA, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των MCF-7 ισοδύναμων κυττάρων/5μg RNA από 3.84 (προ trastuzumab) σε 0.36 (μετά trastuzumab; Wilcoxon paired *t* test,  $P < 0.001$ ; Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Ανίχνευση CK-19mRNA με real-time RT-PCR πριν και μετά το trastuzumab στο αίμα και το μυελό 16 ασθενών με καρκίνο μαστού.

#### **A.4. Χορήγηση ανοσοσφαιρίνης**

Σ' ότι αφορά στις 5 ασθενείς ελέγχου που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη (όλες ήταν CK19mRNA-θετικές στο περιφερικό αίμα παρά την προηγούμενη χημειοθεραπεία) και έλαβαν ανοσοσφαιρίνη IgG (Sandoglobulin) 500 mg/Kg (ΕΦ), σε καμιά δεν παρατηρήθηκε αρνητικοποίηση της ανίχνευσης της CK-19mRNA μετά την χορήγησή της ανοσοσφαιρίνης. Η χορήγηση της ανοσοσφαιρίνης έγινε προκειμένου να αποκλεισθεί η πιθανότητα μη ειδικής δράσης του trastuzumab στην εξάλειψη των CK19mRNA-θετικών κυττάρων. Το στάδιο της νόσου και οι προηγούμενες θεραπείες των 5 ασθενών της «ομάδας ελέγχου» φαίνονται στον Πίνακα 14 (ασθενείς με αριθμούς 7 και 32-35).

**Πίνακας 14. Αποτελέσματα ανίχνευσης CK19mRNA με nested RT-PCR για τις 35 ασθενείς**

Αριθμός ασθενούς	HER-2 status όγκου	Έκφραση HER-2mRNA στα CK19-θετικά δείγματα προ θεραπείας	Είδος θεραπείας	CK19mRNA προ θεραπείας (ΜΟ/ΠΑ)	CK-19mRNA μετά θεραπεία (ΜΟ/ΠΑ)		Διάστημα παρακολούθησης μετά θεραπεία με trastuzumab (μήνες) (ΜΟ/ΠΑ)							Διάρκεια CK19mRNA αρνητικού (μήνες)	
					4-6 βδ.	8-9 βδ.	3 μ.	6 μ.	9 μ.	12 μ.	15 μ.	18 μ.	21μ.		
1	0	+	Weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nd/+		18
2	0	+	3-weekly	nd/+	nd/+	nd/-	nd/-	nd/-	nd/-						9+
3	0	-	3-weekly	nd/+	nd/-	+/-	nd/+								9
4	+1	+	Weekly	+/-	+/-										0
5	0	+	Weekly	nd/+	nd/-		nd/+								3
6	0	+	3-weekly	nd/+	nd/-		nd/-	nd/-	nd/-						9+
7	+2	nd	control	nd/+	nd/+										
8	+1	+	Weekly	+/+	+/-		nd/+								3
9	0	+	3-weekly	nd/+	nd/-		nd/-	nd/-	nd/-						9+
10	0	+	3-weekly	nd/+	nd/-		nd/-	-/-	-/-						9+
11	+3	+	Weekly	+/-	+/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	21+
12	+3	-	Weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-					12+
13	+1	-	3-weekly	+/-	+/+	+/+									0
14	0	+	3-weekly	nd/+	nd/+	nd/-	nd/-								3+
15	+3	+	Weekly	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+						9
16	+3	+	Weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+				15
17	0	+	Weekly	+/+	-/-	-/-	+/+								3
18	+2	+	Weekly	+/+	+/-		-/-	dead							3
19	+2	+	Weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+				15
20	+2	+	Weekly	+/+	-/-	-/-	+/+								3
21	0	+	Weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-			15+
22	+3	+	Weekly	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+				15
23	+2	+	Weekly	+/+	-/-	-/-	-/-	dead							3
24	0	-	Weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-				15+
25	0	+	Weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	dead						6
26	+1	+	Weekly	+/-	-/-	-/-	+/+								3
27	0	+	Weekly	-/+	-/-	-/-	nd/+								3
28	UK	+	Weekly	+/-	-/-	-/-	+/+								3
29	+1	+	3-weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-						9+
30	0	-	3-weekly	nd/+	nd/+	nd/-	nd/-	nd/-							6+
31	+3	+	3-weekly	+/+	-/-	-/-	-/-								3+
32	+3	nd	control	nd/+	nd/+										
33	0	nd	control	nd/+	nd/+										
34	+1	nd	control	nd/+	nd/+										
35	+1	nd	control	nd/+	nd/+										

**Συνομειώσεις:** ΜΟ: μυελός οστών, ΠΑ: περιφερικό αίμα, UK: άγνωστο, nd: δεν έγινε

## **A.5. Τοξικότητα του trastuzumab**

Η ανεπιθύμητες ενέργειες του trastuzumab περιορίστηκαν σε ήπια αλλεργική αντίδραση κατά τη διάρκεια της πρώτης έγχυσης, με δεκαδική πυρετική κίνηση και φρίκια σε 8 (27%) ασθενείς. Όλες οι ασθενείς ολοκλήρωσαν τις προβλεπόμενες χορηγήσεις του αντισώματος. Δεν παρατηρήθηκε αιματολογική ή βιοχημική τοξικότητα. Σε καμιά ασθενή δεν παρατηρήθηκε ελάττωση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας >10% της τιμής βάσης, μετά τη χορήγηση του trastuzumab. Επίσης, καμιά ασθενής δεν παρουσίασε συμπτωματική συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.

## **B. Τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη φάσης II της χορήγησης trastuzumab σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας**

### **B.1. Ασθενείς**

Από ένα σύνολο 378 ασθενών που θεραπεύθηκαν στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική κατά το χρονικό διάστημα από το Φεβρουάριο 2003 έως το Δεκέμβριο 2008, 75 ασθενείς (36 στο σκέλος του trastuzumab και 39 στο σκέλος της παρακολούθησης, αντίστοιχα) πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης και συμπεριελήφθησαν στην τελική ανάλυση της μελέτης. Όλες οι ασθενείς έλαβαν τις 6 προβλεπόμενες χορηγήσεις του trastuzumab χωρίς σοβαρή καρδιοτοξικότητα ή άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 15.

**Πίνακας 15. Χαρακτηριστικά ασθενών**

	TRASTUZUMAB		ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ		
Αριθμός ασθενών	36		39		
<b>ΗΛΙΚΙΑ</b>					
Διάμεση	53.0		51.0		
Εύρος	28 - 73		29 - 72		
	Αριθμός	%	Αριθμός	%	<i>p-value</i>
<b>ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΟ STATUS</b>					
Προεμμηνοπαυσιακές	18	50.0	19	48.7	0.619
Μετεμμηνοπαυσιακές	18	50.0	20	51.3	
<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ</b>					
<2.0 cm	14	38.9	17	43.6	0.529
2.0-5.0 cm	21	58.3	19	48.7	
> 5.0 cm	1	2.8	3	7.7	
<b>ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ</b>					
0	13	36.1	6	15.4	0.112
1 - 3	13	36.1	17	43.6	
≥ 4	10	27.8	16	41.0	
<b>ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟ GRADE</b>					
I/II	18	50.0	19	48.7	0.912
III	18	50.0	20	51.3	
<b>ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ</b>					
ER <sup>+</sup>	22	61.1	22	56.4	0.815
ER <sup>-</sup>	14	38.9	17	43.6	
<b>ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ</b>					
PR <sup>+</sup>	20	55.6	19	48.7	0.646
PR <sup>-</sup>	16	44.4	20	51.3	
<b>ΧΕΙΡΟΥΡΓΕΙΟ</b>					
Διατήρηση μαστού	19	52.8	23	59.0	0.646
Μαστεκτομή	17	47.2	16	41.0	
<b>ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>					
Ανθρακυκλίνες	17	47.2	18	46.2	0.664
Ταξάνες	1	2.8	0	0.0	
Και τα δύο	15	41.7	19	48.7	
Άλλη	3	8.3	2	5.1	
<b>ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>					
Ναι	26	72.2	34	87.2	0.106
Όχι	10	27.8	5	12.8	
<b>ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>					
Ναι	26	72.2	28	71.8	0.967
Όχι	10	27.8	11	28.2	

## B.2. Ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων

Μετά την ολοκλήρωση των 6 χορηγήσεων, 23 από τις 32 (72%, 4 ασθενείς δεν είχαν εκτίμηση CTCs) ασθενείς στο σκέλος του trastuzumab αρνητικοποίησαν το CK19mRNA. Αντίθετα, μόνο 7 (26%) από τις 27 ασθενείς στο σκέλος της παρακολούθησης που δεν είχαν ανιχνεύσιμα CK19mRNA CTCs 4 μήνες μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας (12 ασθενείς δεν είχαν εκτίμηση CTCs) ( $p=0.001$ ). Επιπλέον, ο διάμεσος αριθμός CK19mRNA-θετικών κυττάρων ήταν σημαντικά μειωμένος μετά τη χορήγηση του trastuzumab ( $p<0.001$ ), σε αντίθεση με την ομάδα παρακολούθησης όπου ο διάμεσος αριθμός CK19mRNA-θετικών κυττάρων στους 4 μήνες δεν είχε μεταβληθεί σημαντικά ( $p=0.085$ , πίνακας 16). Επιπρόσθετα, ο διάμεσος αριθμός CK19mRNA-θετικών κυττάρων μετά την χορήγηση του trastuzumab ήταν σημαντικά μικρότερος από των ασθενών στο σκέλος της παρακολούθησης ( $p<0.001$ , πίνακας 16).

**Πίνακας 16.** Ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων πριν και μετά τη θεραπεία στις 2 ομάδες ασθενών

CK19mRNA(+) κυτ. διάμεση (εύρος)	Trastuzumab (n=36)	Παρακολούθηση (n=39)	p-value
Έναρξη μελέτης	1.3 (0.6-13.0)	2.0 (0.6-25.0)	0.131 <sup>a</sup>
Τέλος trastuzumab/ 4 μήνες παρακολούθηση	0.0 (0.0-4.5)	1.0 (0.0-5.0)	<0.001 <sup>a</sup>
<b>p-value</b>	<0.001 <sup>b</sup>	0.085 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>Mann-Whitney test, <sup>b</sup>Wilcoxon Signed Ranks test

### **B.3. Έκφραση HER2 στα CK+ CTCs**

Σε 57 ασθενείς που υπήρχε διαθέσιμο υλικό έγινε ανίχνευση με ανοσοφθορισμό για την παρουσία CK+/HER2+ κυττάρων. CK+/HER2+ CTCs ανιχνεύθηκαν σε 51 από τις 57 (90%) ασθενείς που ελέχθησαν. Σε 9 από τις ασθενείς αυτές, όλα τα ανιχνευθέντα CTCs ήταν CK+/HER2+ ενώ στις υπόλοιπες 42 (82%) ασθενείς ανιχνεύθηκε και η παρουσία ενός υποπληθυσμού CK+/HER2- CTCs. Ο διάμεσος αριθμός CK+/HER2+ CTCs ήταν 2.0 (εύρος, 1-37) στο σκέλος του trastuzumab και 2.0 (εύρος, 1-47) στο σκέλος της παρακολούθησης.

### **B.4. Υποτροπή και επιβίωση**

Μετά από διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 67.2 μηνών (εύρος, 6.83-92.97), 19 (25%) ασθενείς εμφάνισαν απομακρυσμένη υποτροπή. Όλες οι υποτροπές, πλην τεσσάρων, συνέβησαν σε ασθενείς στο σκέλος της παρακολούθησης ( $p=0.008$ , πίνακας 17). Επιπλέον, η επίπτωση των υποτροπών ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στο σκέλος της παρακολούθησης συγκριτικά με το σκέλος του trastuzumab, για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ( $p=0.006$ ), για τους όγκους με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς ( $p=0.042$ ) και για τις ασθενείς με >3 διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες ( $p=0.004$ ) (πίνακας 17). Παρόλα αυτά, στο interaction test υπάρχει ετερογένεια μόνο μεταξύ των διαφόρων ομάδων με βάση το status των μασχαλιαίων λεμφαδένων (σχήμα 5). Όπως φαίνεται στο σχήμα 6, το διάμεσο DFS δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί, υπάρχει όμως σημαντική διαφορά υπέρ των ασθενών που έλαβαν trastuzumab ( $p=0.008$ ).

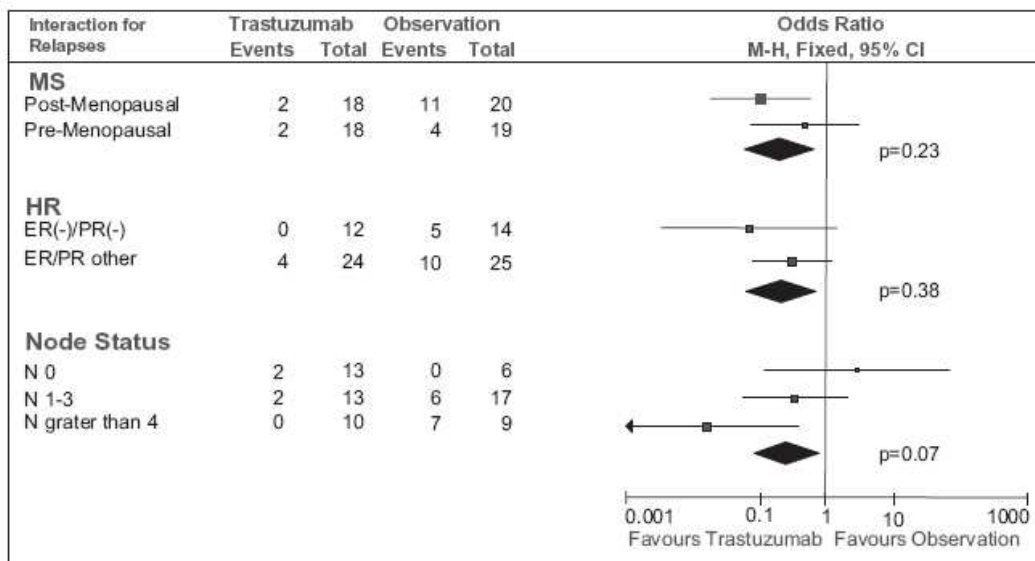


Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά σ' ότι αφορά στη συνολική επιβίωση μεταξύ των δύο σκελών της μελέτης ( $p=0.506$ , σχήμα 7). Επίσης, όπως φάνηκε στη μονοπαραγοντική ανάλυση, ο μόνος στατιστικά σημαντικός παράγοντας που σχετίστηκε με μείωση του DFS ήταν η τυχαιοποίηση στο σκέλος της παρακολούθησης ( $p=0.014$ , πίνακας 18). Για το λόγο αυτό δεν ακολούθησε πολυπαραγοντική ανάλυση.

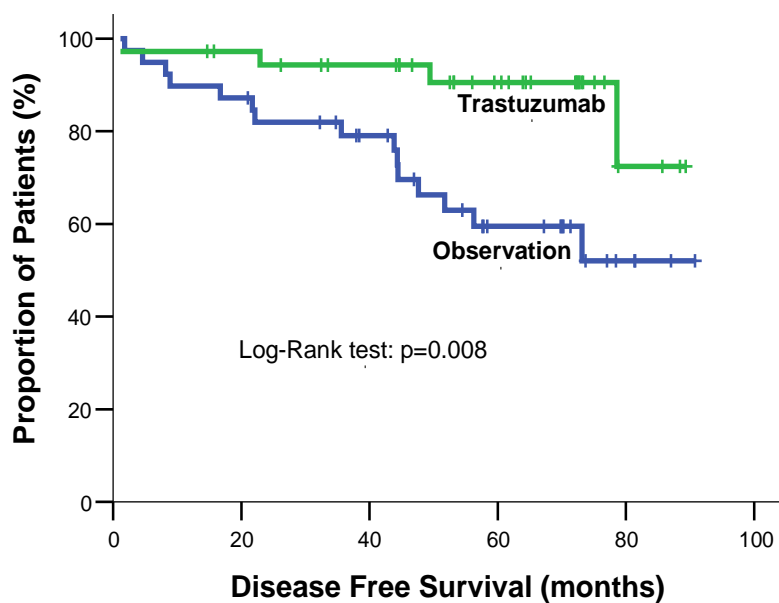
**Πίνακας 17.** Επίπτωση κλινικών υποτροπών σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού με βάση τη θεραπεία

Ομάδα ασθενών	Υποτροπές (n)		
	Παρακολούθηση	Trastuzumab	p-value
Σύνολο ασθενών	15 (38.5%)	4 (11.1%)	0.008
Προεμμηνοπαυσιακές	4 (21.0%)	2 (11.0%)	0.660
Μετεμμηνοπαυσιακές	11 (55.0%)	2 (11.0%)	0.006
Ορμονοευαίσθητες	10 (40%)	4 (17.0%)	0.114
Ορμονοανθεκτικές	5 (36.0%)	0 (0%)	0.042
Λεμφαδένες: N0	0 (0%)	2 (15.0%)	0.999
Λεμφαδένες: N1-3	6 (35.0%)	2 (15.0%)	0.407
Λεμφαδένες: N>3	9 (56.0%)	0 (0.0%)	0.004

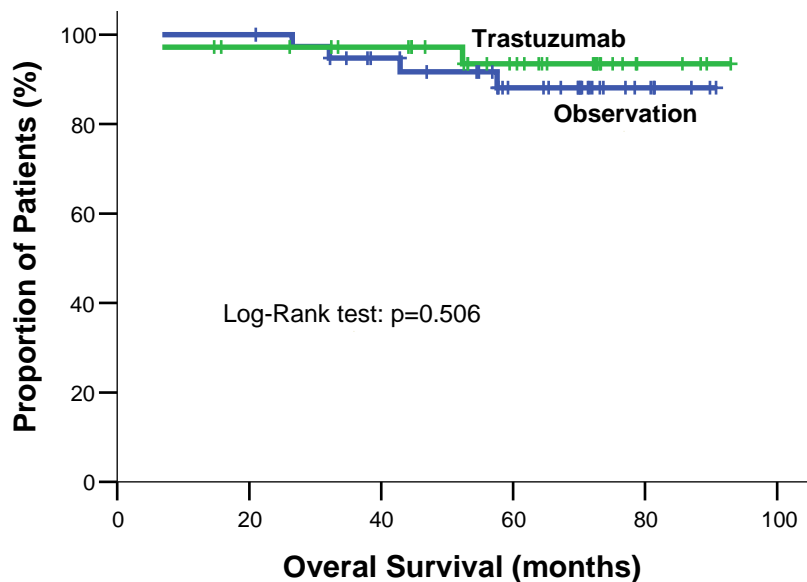
**Σχήμα 5:** Διάγραμμα Forest plot για την επίδραση του trastuzumab στις υποτροπές



**Σχήμα 6:** Καμπύλες Kaplan-Meier για ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS)



**Σχήμα 7:** Καμπύλες Kaplan-Meier για συνολική επιβίωση (OS)



**Πίνακας 18.** Μονοπαραγοντική ανάλυση για ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) και συνολική επιβίωση (OS)

	DFS			OS		
	RR	95%CI	p-value	RR	95%CI	p-value
Εμμηνοπαυσιακό status						
(μετα vs προ)	2.126	0.803-5.627	0.129	1.763	0.323-9.640	0.513
Μέγεθος όγκου (>2cm vs ≤2cm)	1.552	0.590-4.084	0.374	1.453	0.266-7.942	0.666
Λεμφαδένες (≥4 vs < 4)	1.677	0.681-4.129	0.261	1.678	0.338-8.325	0.527
Ιστολογικό grade (III vs I/II)	1.422	0.574-3.525	0.447	2.386	0.434-13.105	0.317
ER (αρνητικοί vs θετικοί)	0.568	0.204-1.581	0.279	0.829	0.151-4.555	0.829
PR (αρνητικοί vs θετικοί)	1.969	0.785-4.938	0.149	1.357	0.272-6.779	0.710
HR (αρνητικοί vs άλλο)	0.867	0.310-2.424	0.785	1.203	0.217-6.657	0.832
Trastuzumab (όχι vs ναι)	3.985	1.321-12.021	0.014	1.765	0.323-9.644	0.512

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης αφορά στην πιλοτική διερεύνηση της επίδρασης του μονοκλωνικού αντισώματος trastuzumab στα χημειοανθεκτικά και ορμονοανθεκτικά διεσπαρμένα/κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στο μυελό των οστών και το αίμα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα κύτταρα αυτά ανιχνεύθηκαν παρά την προηγηθείσα χορήγηση συστηματικής θεραπείας και μετά την ολοκλήρωσή της.

Ως δείκτης για την ανίχνευση των μικρομεταστατικών κυττάρων στο αίμα και το μυελό των οστών χρησιμοποιήθηκε η κυτταροκερατίνη-19 (CK-19), η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο από τη δική μας όσο και από άλλες ερευνητικές ομάδες<sup>17,18,30,115,116</sup>. Πιστεύεται ότι η CK-19 είναι, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, ο δείκτης με το συνδυασμό μεγαλύτερης ευαισθησίας και ειδικότητας στην ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στο αίμα και το μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού<sup>18,115</sup>. Ωστόσο, από ορισμένους ερευνητές έχουν αναφερθεί «ψευδώς θετικά» αποτελέσματα σε δείγματα αίματος ή μυελού των οστών από υγιείς γυναίκες δότριες ή από ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες ή μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο<sup>18</sup>. Πιθανές εξηγήσεις για τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να είναι η ύπαρξη των ψευδογονιδίων a και b<sup>17</sup> της CK-19, η επιμόλυνση των δειγμάτων από επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας κατά τη φλεβοκέντηση<sup>118</sup> ή η έκτοπη έκφραση του CK-19 γονιδίου στα φυσιολογικά ή αιμοποιητικά κύτταρα<sup>29,119</sup>, στα πλαίσια της εν δυνάμει έκφρασης οποιουδήποτε γονιδίου από οποιοδήποτε κύτταρο<sup>120</sup>.

Η έκτοπη εντόπιση επιθηλιακών κυττάρων στο αίμα ή το μυελό των οστών, δεν αρκεί από μόνη της για να επιβεβαιώσει την νεοπλασματική τους φύση. Τα απαραίτητα στοιχεία προέρχονται από αναλύσεις γενετικού υλικού και κυτταροκαλλιέργειες, όπου τεκμηριώνεται η ύπαρξη ανωμαλιών στα χρωμοσώματα 7, 8, 11, 17 και 18 σε κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού<sup>121</sup>. Επίσης, επιβεβαιώνεται η *in vitro* ικανότητα πολλαπλασιασμού των μικρομεταστατικών κυττάρων η οποία είναι ευθέως ανάλογη του σταδίου της νόσου και της κλινικής έκβασης του ασθενούς μετά το χειρουργείο<sup>63</sup>. Στην πραγματικότητα, τα μικρομεταστατικά κύτταρα αποτελούν ένα ετερογενή πληθυσμό κυττάρων με διαφορετική βιολογική συμπεριφορά<sup>68</sup>. Παράλληλα, η υπερέκφραση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων όπως ο HER-2/neu διαχωρίζει έναν υποπληθυσμό περισσότερο επιθετικών CK-θετικών κυττάρων<sup>122,91</sup>. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο FISH για την ανίχνευση τόσο της ενίσχυσης του HER-2/neu γονιδίου όσο και ανωμαλιών στα χρωμοσώματα 1, 8, 11 και 17, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την κακοήγη φύση των CK-θετικών κυττάρων σε ένα περιορισμένο αριθμό ασθενών. Παρόμοια μεθοδολογία έχει εφαρμοστεί προηγουμένως και από άλλους ερευνητές<sup>123-125</sup>.

Διάφοροι ερευνητές έχουν δείξει ότι η ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων στο μυελό των οστών<sup>40,46</sup> και το περιφερικό αίμα<sup>53</sup> ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, αποτελεί ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για μειωμένη ελεύθερη νόσου και συνολική επιβίωση, κατά τη διάγνωση και πριν τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας.

Η χημειοθεραπεία συχνά αποτυγχάνει να εξαλείψει τα διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα σε ποσοστό που φτάνει το 50% των ασθενών με καρκίνο του μαστού<sup>81,57</sup>, ενώ η ανίχνευση CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, ενδεικτικό της ύπαρξης χημειο-ανθεκτικής υπολειπόμενης νόσου<sup>57</sup>. Συνεπώς, είναι σημαντικό να μελετήσουμε αν ένας βιολογικός παράγοντας μπορεί να στοχεύσει αποτελεσματικά τα χημειοανθεκτικά αυτά κύτταρα και με τον τρόπο αυτό να μειώσει την πιθανότητα υποτροπής της νόσου (πρώιμο στάδιο) ή να επιβραδύνει την εξέλιξή της (προχωρημένο στάδιο).

Ο HER-2 αποτελεί μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα οι οποίοι, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους και με διάφορους προσδέτες, ενεργοποιούν τα ενδοκυττάρια μονοπάτια μετάδοσης σήματος που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτό πιθανότατα εξηγεί και το γεγονός ότι η υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα στον πρωτοπαθή όγκο αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του μαστού<sup>85</sup>. Παράλληλα, αποτελεί και προβλεπτικό παράγοντα ανταπόκρισης στη θεραπεία με trastuzumab<sup>101</sup>.

Ερευνητές έχουν προηγουμένως επισημάνει την υψηλή έκφραση του HER-2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα που φτάνει σε υπερδιπλάσιο ποσοστό αυτής του πρωτοπαθούς όγκου (>60% έναντι 20-25%)<sup>69,91</sup>. Με βάση το δεδομένο αυτό, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αντι-HER2 μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab για τη στόχευση των CK-19mRNA θετικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν, για πρώτη φορά, ότι ένα βραχύ σχήμα χορήγησης του trastuzumab μπορεί να ελαττώσει σημαντικά ή και

να εξαλείψει τα χημειοανθεκτικά διεσπαρμένα καρκινικά κύτταρα στο αίμα και το μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Η επιλογή των ασθενών της μελέτης έγινε με κριτήριο μόνο την ανίχνευση CK19mRNA-θετικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα και/ή στο μυελό των οστών μετά την ολοκλήρωση της συστηματικής θεραπείας. Η πλειοψηφία των ασθενών με μεταστατική νόσο είχε προηγουμένως λάβει διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα, ενώ ασθενείς με ορμονο-ευαίσθητη νόσο είχαν επίσης λάβει και ορμονική θεραπεία. Γυναίκες με πρώιμο καρκίνο του μαστού είχαν ολοκληρώσει τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία, καθώς και την ορμονοθεραπεία αν είχαν όγκους με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς. Συνεπώς, τα ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά κύτταρα προ της ένταξης στη μελέτη ήταν πραγματικά ανθεκτικά στις «καθιερωμένες» θεραπείες. Η έκφραση του HER-2 στον πρωτοπαθή όγκο δεν αποτέλεσε κριτήριο επιλογής των ασθενών, λόγω της συχνής (υπερδιπλάσιας) έκφρασής του στα μικρομεταστατικά κύτταρα<sup>69,91</sup>. Επιπλέον, η εξ' επαγωγής αντιστοίχιση του HER-2 status του πρωτοπαθούς όγκου στα μικρομεταστατικά κύτταρα, δεν είναι αξιόπιστη<sup>91</sup>. Ωστόσο, το γεγονός ότι 28 από τις 30 (93%) γυναίκες αρνητικοποίησαν το CK19mRNA με nested RT-PCR μετά από 4-8 εβδομαδιαίες ή 2-3 χορηγήσεις ανά τρεις εβδομάδες, υποδηλώνει ότι τα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι ευαίσθητα στο trastuzumab, πιθανότατα λόγω υπερέκφρασης του HER-2 υποδοχέα.

Οι Paik et al δημοσίευσαν πρόσφατα τα αποτελέσματα υποανάλυσης της μελέτης NSABP B-31 που συνέκρινε τον καθιερωμένο συνδυασμό 4 κύκλων doxorubicin και cyclophosphamide ακολουθούμενου από 4 κύκλους paclitaxel (ACT) έναντι του ίδιου συνδυασμού με την προσθήκη trastuzumab

(ACTH), ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού<sup>126</sup>. Μεταξύ 1787 ασθενών των οποίων τα δείγματα ιστού αναλύθηκαν σε κεντρικό εργαστήριο με τις μεθόδους FISH και ανοσοϊστοχημείας (IHC), οι 174 (ποσοστό 9.7%) βρέθηκαν να έχουν HER2-αρνητικούς όγκους (FISH αρνητικό και IHC <+3). Παρόλα αυτά, ακόμη και οι ασθενείς αυτές, με τους HER2-αρνητικούς πρωτοπαθείς όγκους, ωφελήθηκαν από τη χορήγηση του trastuzumab ( $p=0.014$ ). Τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικά ότι το όφελος από τη συμπληρωματική χορήγηση του trastuzumab στον πρώιμο καρκίνο του μαστού δεν περιορίζεται μόνο στους όγκους με υπερέκφραση του HER2 υποδοχέα<sup>126</sup>.

Αναδρομικά αναλύσαμε την έκφραση του HER-2mRNA στα προ-trastuzumab CK19-θετικά δείγματα αίματος και μυελού με nested RT-PCR και βρέθηκε θετική ανίχνευση σε ποσοστό 83% (25 από τις 30 ασθενείς). Επιπλέον, σε 5 ασθενείς για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα μονοπύρηνια κύτταρα από τα προ-trastuzumab δείγματα αίματος και μυελού (δεν υπήρχαν διαθέσιμα για τις υπόλοιπες 25 ασθενείς), επιβεβαιώθηκε με FISH η ύπαρξη κυττάρων με ενίσχυση του HER-2/neu γονιδίου. Επίσης, τα ίδια δείγματα ήταν HER2mRNA-θετικά με RT-PCR. Αξιοσημείωτο είναι ότι στη δική μας μελέτη, το ποσοστό έκφρασης του HER-2 στα μικρομεταστατικά κύτταρα είναι υψηλότερο από το αναφερόμενο 60-67% στη διεθνή βιβλιογραφία, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους<sup>69,91</sup>. Αν λάβουμε υπόψη ότι το ποσοστό των ασθενών που αρνητικοποίησαν το CK19mRNA με nested RT-PCR υπερβαίνει το ποσοστό της HER2mRNA έκφρασης στα προ-trastuzumab δείγματα, πιθανολογούμε ότι σε κάποιες ασθενείς με μικρό αριθμό CK19-θετικών κυττάρων η έκφραση του HER-2 ήταν



κάτω από το όριο ανίχνευσης της RT-PCR μεθόδου. Πράγματι, στις διαδοχικές αραιώσεις MCF-7 κυττάρων, η διακριτική ικανότητα της nested RT-PCR για το HER2mRNA περιοριζόταν στην αραιώση των 10 κυττάρων στο εκατομμύριο PBMCs.

Τα αποτελέσματα της nested RT-PCR, μετά τη χορήγηση του αντισώματος, επιβεβαιώθηκαν και με ποσοτικό προσδιορισμό του CK19mRNA με real-time RT-PCR, όπου 20 από τις 30 ασθενείς (67%) ήταν αρνητικές. Η ποσοτική RT-PCR με τη χρήση του συστήματος LightCycler είναι σε συμφωνία με τη nested RT-PCR ως προς τη θετικότητα και αρνητικότητα, σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων<sup>54</sup>. Αξιοσημείωτο είναι ότι, σε 16 ασθενείς με διαθέσιμα δείγματα αίματος ή μυελού για ανίχνευση του CK19mRNA με real-time RT-PCR πριν και μετά τη χορήγηση του trastuzumab, ο μέσος αριθμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων υποδεκαπλασιάστηκε (1log) (εικόνα 4). Παρόλα αυτά, θα πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων από τη χορήγηση του trastuzumab, αφού το CK19mRNA-αρνητικό σήμα στη real-time RT-PCR μετά τη χορήγηση του αντισώματος μπορεί να οφείλεται σε μείωση των κυκλοφορούντων κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και όχι απαραίτητα στην ολοσχερή εξάλειψή τους.

Προκειμένου να ελέγξουμε την πιθανότητα μη ειδικής κυτταροτοξικής δράσης του trastuzumab, χορηγήσαμε ανοσοσφαιρίνη IgG σε μια «ομάδα ελέγχου» 5 CK19mRNA-θετικών ασθενών που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης και είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά με τον πληθυσμό της μελέτης. Από τις ασθενείς αυτές καμιά δεν αρνητικοποίησε το CK19mRNA με τη χορήγηση της ανοσοσφαιρίνης. Επίσης, για να αποκλείσουμε την επίδραση του trastuzumab που υπήρχε στα δείγματα στην εξέλιξη

της RT-PCR, εκθέσαμε διαδοχικές αραιώσεις MCF-7 κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντισώματος (στα 2, 100 και 200 nmol/L) για 24-48 ώρες. Η ανίχνευση CK19mRNA με nested RT-PCR ήταν δυνατή έως την αραιώση του 1 MCF-7 κυττάρου ανά  $10^6$  φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα.

Κατά το χρονικό διάστημα παρακολούθησης των ασθενών, με συχνή λήψη δειγμάτων αίματος και μυελού των οστών, παρατηρήσαμε ότι η εξάλειψη των CK19mRNA-θετικών κυττάρων δεν ήταν βραχεία αλλά διαρκούσε αρκετούς μήνες ακόμη και στις ασθενείς με μεταστατική νόσο. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό αν σκεφτούμε ότι οι μεταστατικές εστίες «τροφοδοτούν» συνεχώς την κυκλοφορία του αίματος με νέα καρκινικά κύτταρα. Πιθανότατα το παρατεταμένο αποτέλεσμα οφείλεται στο μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής του trastuzumab στον οργανισμό, το οποίο παραμένει αρκετούς μήνες μετά από επαναλαμβανόμενες εγχύσεις<sup>127</sup>. Αξιοσημείωτο είναι ότι η επαναχορήγηση του trastuzumab σε 2 ασθενείς που έγιναν CK19mRNA-θετικές κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης, ήταν ακόμη αποτελεσματική. Θα μπορούσαμε επομένως, με επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις του αντισώματος, είτε ανά τακτά χρονικά διαστήματα είτε επί CK19mRNA-θετικού αποτελέσματος στην RT-PCR, να παρατείνουμε το χρονικό διάστημα μη ανιχνεύσιμων κυκλοφορούντων CK19mRNA-θετικών κυττάρων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Δεδομένης της δραστηριότητας του trastuzumab στο HER2-θετικό καρκίνο του μαστού<sup>101,103</sup>, καλά τεκμηριωμένη θεωρείται και η καρδιοτοξικότητα ως η σοβαρότερη ανεπιθύμητη ενέργεια του αντισώματος που φτάνει το 3-7% όταν αυτό χορηγείται ως μονοθεραπεία<sup>111</sup>. Στη δική μας μελέτη, με το βραχύ σχήμα χορήγησης του trastuzumab δεν παρατηρήθηκε σοβαρή καρδιακή

ή άλλη τοξικότητα, εκτός της γνωστής και καλά περιγεγραμμένης αντίδρασης υπερευαισθησίας κατά τη διάρκεια της πρώτης έγχυσης.

Τα αποτελέσματά μας ενισχύουν τη θέση του trastuzumab στη συμπληρωματική θεραπεία του καρκίνου του μαστού αλλά και στη θεραπεία της μεταστατικής νόσου. Ωστόσο, ασαφή παραμένουν ακόμα και σήμερα τα δεδομένα αναφορικά με τη βέλτιστη διάρκεια και τρόπο χορήγησής του<sup>128</sup>. Επίσης, μένει να αποδειχθεί σε μελλοντικές μελέτες, η θεραπευτική αξία της εξάλειψης των μικρομεταστατικών κυττάρων με το trastuzumab ανεξαρτήτως της έκφρασης του HER-2 στον πρωτοπαθή όγκο.

Άλλοι ερευνητές έχουν επίσης χρησιμοποιήσει μονοκλωνικά αντισώματα για τη στόχευση των μικρομεταστατικών κυττάρων, με ποικίλα αποτελέσματα. Οι Schlimok et al<sup>129</sup>, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό Lewis Y αντίσωμα, πέτυχαν τη σημαντική μείωση ή εξάλειψη των CK-θετικών/LewisY-θετικών κυττάρων σε 5 από τους 10 ασθενείς με μικρομεταστατικά κύτταρα από καρκίνο του μαστού στο μυελό των οστών. Οι Braun et al<sup>83</sup> χρησιμοποίησαν το μονοκλωνικό αντίσωμα 17-1A (Edrecolomab), ενάντια στο επιθηλιακό μόριο προσκολλησεως ErCAM, και πέτυχαν σημαντική μείωση και σε 4 περιπτώσεις πλήρη εξάλειψη των ErCAM+/CK+ κυττάρων από το μυελό των οστών 10 ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Πιο πρόσφατα, οι Kirchner et al<sup>130</sup> χρησιμοποίησαν το ίδιο μονοκλωνικό αντίσωμα (Edrecolomab) σε 9 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και μικρομεταστατική νόσο στο μυελό των οστών μετά τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Οι ερευνητές αναφέρουν πλήρη εξάλειψη των κυττάρων στους 7 και σημαντική μείωση στους υπόλοιπους 2 ασθενείς.

Η υπερέκφραση του HER-2 υποδοχέα τόσο στον πρωτοπαθή όγκο<sup>85</sup> όσο και στα μικρομεταστατικά κύτταρα<sup>91</sup>, όπως έχει αποδειχθεί, αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Συνεπώς, η χρήση του trastuzumab ενάντια στα HER2-θετικά κύτταρα στην παρούσα μελέτη έχει το πλεονέκτημα, σε σχέση με άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, ότι στοχεύει στην εξάλειψη ενός πληθυσμού καρκινικών κυττάρων με ιδιαίτερα επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Παρόλα αυτά, απαιτείται τεκμηρίωση του κλινικού οφέλους από την εξάλειψη των μικρομεταστατικών κυττάρων, προκειμένου αυτή η πειραματική προσέγγιση να αποκτήσει πρακτική εφαρμογή. Χρειάζονται προοπτικές μελέτες για τη διερεύνηση των φαινοτυπικών και γονοτυπικών χαρακτηριστικών των μικρομεταστατικών κυττάρων, καθώς και του οφέλους από την εξάλειψή τους στην πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Για το λόγο αυτό σχεδιάσαμε μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II, προκειμένου να εκτιμήσουμε το όφελος από την εξάλειψη των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με τη «συμπληρωματική χορήγηση» του trastuzumab στην κλινική έκβαση ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού. Πρόκειται για την πρώτη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη της δράσης μιας «συμπληρωματικής» θεραπείας που στοχεύει τα χημειο-ανθεκτικά κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού.

Τα αποτελέσματα της κλινικής αυτής μελέτης έδειξαν ότι η χορήγηση του αντισώματος πέτυχε εξάλειψη των κυττάρων και σημαντική μείωση των ασθενών με ανιχνεύσιμα CTCs στο περιφερικό αίμα. Επιπλέον, η στόχευση των ανθεκτικών CTCs με το trastuzumab επιτυγχάνει στατιστικά σημαντική μείωση του

κινδύνου υποτροπής και παράταση της ελεύθερης νόσου επιβίωσης (DFS).

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής δείξαμε ότι με τη χορήγηση 3-4 εγχύσεων trastuzumab σε ασθενείς με ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά CTCs ή/και DTCs επιτυγχάνουμε εξάλειψη των κυττάρων αυτών σε ποσοστό 67% των ασθενών<sup>131</sup>. Παρόλα αυτά, σε κάποιους ασθενείς επανεμφανίζονται τα CK19mRNA-θετικά κύτταρα 1-3 μήνες μετά τη διακοπή του αντισώματος. Με βάση την παρατήρηση αυτή, στην τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II επιλέξαμε τη χορήγηση 6 κύκλων trastuzumab. Φαίνεται πως ενώ η χορήγηση του trastuzumab επιτυγχάνει μείωση των CTCs σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, ο εναπομείνας κυτταρικός πληθυσμός οδηγεί σε πρώιμη επανεμφάνιση των CK19mRNA-θετικών CTCs.

Η υψηλή αποτελεσματικότητα του trastuzumab στην εξάλειψη των CK19mRNA-θετικών CTCs μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το 90% σχεδόν των ασθενών που εκτιμήθηκαν είχε υπερέκφραση του HER2 στα CTCs. Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η μειωμένη επίπτωση των κλινικών υποτροπών και η σημαντική παράταση της ελεύθερης νόσου επιβίωσης (DFS) στις ασθενείς που έλαβαν trastuzumab, αποδίδεται στην οφειλόμενη στο trastuzumab εξάλειψη των CTCs. Επιπρόσθετα, πρέπει να επισημάνουμε ότι η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα πληθυσμό ασθενών υψηλού κινδύνου με ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά CTCs μετά την ολοκλήρωση της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, γεγονός που σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση σ' ότι αφορά στον κίνδυνο υποτροπής και την επιβίωση<sup>57</sup>.

Είναι αποδεδειγμένο ότι η έκφραση του HER2 στα CTCs ή/και DTCs είναι ανεξάρτητη της έκφρασής του στον πρωτοπαθή

όγκο, ενώ στην παρούσα μελέτη το όφελος από το trastuzumab παρατηρήθηκε σε ασθενείς με HER2-αρνητικό πρωτοπαθή όγκο. Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με την υποομάδα γυναικών με πρώιμο καρκίνο του μαστού της μελέτης NSABP B-31 που ωφελήθηκαν από τη «συμπληρωματική» χορήγηση του trastuzumab παρόλο που είχαν HER2-αρνητικούς όγκους<sup>126</sup>. Με βάση την παρατήρηση αυτή, το όφελος του trastuzumab θα μπορούσε να οφείλεται στην εξάλειψη των CK+/HER2+ CTCs και να μην περιορίζεται στις ασθενείς με HER2-θετικούς πρωτοπαθείς όγκους. Επιπλέον, γεννιέται το ερώτημα αν επιμέρους μοριακά χαρακτηριστικά των CTCs/DTCs θα μπορούσαν να αποτελέσουν προβλεπτικούς δείκτες της δραστηριότητας στοχευμένων θεραπειών σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι ενδεικτικά της κλινικής σημασίας που μπορεί να έχει η στόχευση των χημειο-ανθεκτικών CTCs με τη «συμπληρωματική» χορήγηση του trastuzumab, δεδομένου ότι μείωσε τις κλινικές υποτροπές σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και ανιχνεύσιμα CK19mRNA-θετικά CTCs. Απαιτείται επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με μια μεγαλύτερη, πολυκεντρική, προοπτική τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. National Cancer Institute: SEER Cancer Statistics Review (1975-2000). Accessed September 2005.
2. 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: 1652-58.
3. Rosen PR, Groshen S, Saigo PE, et al: A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 355-66.
4. Leone BA, Romero A, Rabinovich MG, et al: Stage IV breast cancer: clinical course and survival of patients with osseous versus extra osseous metastases at initial diagnosis. The GOCS (Grupo Oncologico Cooperativo del Sur) experience. *Am J Clin Oncol* 1988; 11: 618-22.
5. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63(1): 181-187.
6. 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(33): 5287-5312.
7. Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(8): 4494-4499.

8. Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-86.
9. Clare SE, Sener SF, Wilkens W, et al: Prognostic significance of occult lymph node metastases in node-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 447-51.
10. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis M, et al: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-91.
11. Choesmel V, Pierga J-Y, Nos C, et al: Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: Clinical relevance. *Breast Cancer Research* 2004; 6: 556-70.
12. 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: 475-82.
13. 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: 854-61.
14. Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, et al: Quantitative Polymerase Chain Reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 870-79.
15. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O: Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1113-24.
16. 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(5): 906-912.
- 17.** 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(7): 1432-1439.
  - 18.** 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: 1883-90.
  - 19.** 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: 2510-13.
  - 20.** 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: 333-40.
  - 21.** 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: 1534-39.
  - 22.** 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: 133-45.
  - 23.** Kagan M, Howard D, Bendele T, et al. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *J Clin Ligand Assay* 2002; 25: 104-110.

24. Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, et al. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(29): 10501-10504.
25. 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(6): 617-627.
26. Pantel K, Otte M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin Cancer Biol* 2001; 11(5): 327-337.
27. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450(7173): 1235-1239.
28. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(4): 1033-1067.
29. 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(9): 1194-1198.
30. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5(2): 79-88.
31. 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(7): 2701-2708.
32. 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(16): 2671-2674.
- 33.** Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(7): 1654-1659.
  - 34.** 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(9): 1082-1087.
  - 35.** 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(7): 1420-1430.
  - 36.** 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(21): 6403-6409.
  - 37.** 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(14 Pt1): 4218-4224.
  - 38.** 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(6): 471-479.
  - 39.** Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the Cellsearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 920-928.
  - 40.** 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: 525-33.

41. 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.
42. Landys K, Persson S, Kovarik J, et al: Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 49: 27-33.
43. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, et al: Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: A long-term follow-up. *Lancet* 1999; 354: 197-202.
44. Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998; 16(2): 557-566.
45. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, et al. Micrometastases in axillary lymph nodes and bone marrow of lymph node-negative breast cancer patients – prognostic relevance after 10 years. *Anticancer Res* 2003; 23(5b): 4319-4324.
46. 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.
47. Mansour EG, Gray R, Shatila AH, et al: Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer. An intergroup study. *N Engl J Med* 1989; 320: 485-90.
48. Ludwig Breast Cancer Study Group. Prolonged disease-free survival after one course of perioperative adjuvant chemotherapy for node-negative breast cancer. The Ludwig Breast Cancer Study Group. *N Engl J Med* 1989; 320: 491-96.

- 49.** Fisher B, Redmond C, Dimitrov NV, et al: A randomised clinical trial evaluating sequential methotrexate and fluorouracil in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-negative tumors. *N Engl J Med* 1989; 320: 473-78.
- 50.** Fisher B, Costantino J, Redmond C, et al: A randomised clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med* 1989; 320: 479-84.
- 51.** 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(5): 884-891.
- 52.** Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavourable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10(15): 5342-5348.
- 53.** Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, et al. Molecular detection of CK19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3404-3412.
- 54.** Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, et al. Real-time quantification of CK-19mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14): 5145-5151.
- 55.** Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, et al. Different prognostic value of CK19mRNA-positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5194-5202.

56. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, et al. Peripheral blood circulating CK19mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 849-855.
57. Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, et al. Cytokeratin 19mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2177-2184.
58. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: 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.
59. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood CK19mRNA-positive cells detected by real-time PCR in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3756-3762.
60. Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, et al. Clinical relevance of circulating CK19mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 1623-1631.
61. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 790-800.
62. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
63. Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2246-2251.

64. Mehes G, Witt A, Kubista E, et al. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 2001; 159: 17-20.
65. Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells. *Mol Med* 2007; 13: 79-88.
66. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, et al. Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(9): 744-749.
67. Ignatiadis M, Desmedt C. Predicting risk of breast cancer recurrence using gene-expression profiling. *Pharmacogenomics* 2007; 8(1): 101-111.
68. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002; 360(9334): 683-689.
69. 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(17): 1419-1424.
70. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(6): 448-456.
71. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, et al. Detection of mammaglobin-A mRNA-positive circulating tumour cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem* 2006; 39: 879-887.
72. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, et al. Circulating HER2mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant

- chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007; 18: 851-858.
- 73.** Silva HA, Abraul E, Raimundo D, et al. Molecular detection of EGFRvIII-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2617-2622.
- 74.** Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumour 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.
- 75.** Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea – a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; 66: 1883-1890.
- 76.** Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-3988.
- 77.** Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1154-1159.
- 78.** Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5615-5621.
- 79.** Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-567.
- 80.** Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, et al. Circulating tumour cells with a putative stem cell phenotype I



peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett* 2009.

- 81.** Braun S, Kantenich C, Janni W, et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18(1): 80-86.
- 82.** 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(2): 239-43.
- 83.** Braun S, Hepp F, Kantenich CR, et al. Monoclonal antibody therapy with Edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3999-4004.
- 84.** Alroy I, Yarden Y. Biochemistry of HER2 oncogenesis in breast cancer. *Breast Dis* 2000; 11: 31-48.
- 85.** 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: 1859-1866.
- 86.** Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erb-B2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1049-1056.
- 87.** Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech* 2002; 59: 1-2-108.
- 88.** Kim R, Tanabe K, Uchida Y, et al. The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer. *Oncol Rep* 2002; 9: 3-9.

- 89.** Chung YL, Sheu ML, Yang SC, et al. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between HER-2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 97: 306-312.
- 90.** Lee S, Yang W, Lan KH, et al. Enhanced sensitization to taxol-induced apoptosis by herceptin pretreatment in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 5703-5710.
- 91.** 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(5): 1890-1895.
- 92.** 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(2): 179-184.
- 93.** Wülfing 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(6): 1715-1720.
- 94.** Ignatiadis M, Perraki M, Apostolaki S, et al. Molecular detection and prognostic value of circulating CK-19mRNA and HER2mRNA-positive cells in the peripheral blood of women with early breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2007; 7(11): 883-889.
- 95.** Baselga J, Albanell J. Mechanisms of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 2001; 12: S35-S42.
- 96.** Press MF, Slamon J, Flom KJ, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: Comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized

- cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3095-3105.
- 97.** Hortobagyi GN. The status of breast cancer management: challenges and opportunities. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75: S61-65, S57-59.
- 98.** Smith IE. New drugs for cancer therapy. *Lancet* 2002; 360: 790-792.
- 99.** Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 737-744.
- 100.** Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2639-2648.
- 101.** Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-726.
- 102.** Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2162-2171.
- 103.** Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-792.

- 104.** Hudis CA. Trastuzumab mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007; 357: 39-51.
- 105.** Burstein HJ, Harris LN, Gelman R, et al. Preoperative therapy with trastuzumab and paclitaxel followed by sequential adjuvant doxorubicin/cyclophosphamide for HER2 overexpressing stage II or III breast cancer: a pilot study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 46-53.
- 106.** Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, et al. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab, as adjuvant therapy in node-positive, HER2-overexpressing breast cancer. NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2005; 23(31): 7811-9.
- 107.** 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.
- 108.** Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-1672.
- 109.** Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC-T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC-TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients. Second Interim efficacy analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100(52a): S63.

- 110.** Force T, Krause DS, Van Etten RA. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 332-344.
- 111.** Seidman A, Hudis C, Pierri MK, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1215-1221.
- 112.** Burstein HJ, Harris LN, Marcom PK, et al. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2889-2895.
- 113.** Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.
- 114.** Mavroudis D, Perraki M, Kallergi G, et al. Molecular detection of HER2mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; Part I, Vol 23, No16S: abstr 668.
- 115.** Zhong XY, Kaul S, Diel I, et al. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 286-91.
- 116.** Ismail MS, Wynendaele W, Aerts JL, et al. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumor cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 196-201.

- 117.** Ruud P, Fodstad O, Hovig E, et al. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 80: 119-125.
- 118.** Ko Y, Grunewald E, Totzke G, et al. High percentage of false-positive results of cytokeratin 19 RT-PCR in blood: A model for the analysis of illegitimate gene expression. *Oncology* 2000; 59: 81-88.
- 119.** Novacs M, Bendit I, Garicochea B, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors. *Mol Pathol* 1997; 50: 209-211.
- 120.** Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, et al. Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2617-2621.
- 121.** Muller P, Weckermann D, Riethmuller G, et al. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 88: 8-16.
- 122.** Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, et al. Clinical significance of proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 539-45.
- 123.** Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, et al. Her-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 1398-403.

- 124.** Fehm T, Morrison L, Saboorian H, et al. Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75: 227-39.
- 125.** Yamamoto D, Senzaki H, Nakagawa H, et al. Detection of chromosomal aneusomy by fluorescence in situ hybridization for patients with nipple discharge. *Cancer (Phila)* 2003; 97: 690-4.
- 126.** Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1409-11.
- 127.** Pegram M, Slamon D. Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2000; 27(5Suppl 9): 13-9.
- 128.** Nabholz JM, Slamon D. New adjuvant strategies for breast cancer: meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 2001; 28(Suppl 3): 1-12.
- 129.** Schlimok G, Pantel K, Loibner H, et al. Reduction of metastatic carcinoma cells in bone marrow by intravenously administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumors. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1799-803.
- 130.** Kirchner EM, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 2002; 13: 1044-8.
- 131.** Bozionelou 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: 8185-94.

# **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**Μποζιονέλου Βασιλική  
Παθολόγος - Ογκολόγος**

**Οκτώβριος 2012**



**Όνοματεπώνυμο:** Βασιλική Μποζιονέλου  
**Ημερομηνία γέννησης:** 25/8/1972  
**Τόπος γέννησης:** Αθήνα Αττικής  
**Υπηκοότητα:** Ελληνική  
**Διεύθυνση κατοικίας:** Μελίνας Μερκούρη 55, Ηράκλειο Κρήτης, Τ.Κ. 71 305  
**Τηλέφωνο κατοικίας:** (2810) 260836  
**Διπλώματα-Τίτλοι:** 7/1997: Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης  
1/2007: Τίτλος Ειδικότητας Παθολογικής – Ογκολογίας  
**Ξένες γλώσσες:** Αγγλική

## **I. Εκπαίδευση – Θέσεις:**

- ◆ Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης, με Πανελλήνιες εξετάσεις, το 1991 και αποφοίτηση στις 30/7/1997 με γενικό βαθμό «Λίαν Καλώς» (Μ.Ο. 7.94 ).
- ◆ Υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου στο Περιφερικό Ιατρείο Αγίου Μύρωνα, Ηρακλείου Κρήτης από 1/9/1997 έως 1/3/1999.
- ◆ Ειδίκευση στην Παθολογία, στην Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου από 6/8/1999 έως 6/8/2001 (2 έτη) και από 18/9/2002 έως 18/9/2003 (1 έτος).
- ◆ Επιστημονικός συνεργάτης, υπεύθυνος ιατρός διεθνών κλινικών μελετών, στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου από 9/2001 μέχρι και 9/2002 (Δ/ντής: Καθηγητής Β. Γεωργούλιας).

- ◆ Ειδίκευση στην Παθολογική-Ογκολογία, στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου από 3/11/2003 έως 3/11/2006 (3 έτη) (Δ/ντής: Καθηγητής Β. Γεωργούλιας).
- ◆ Επιστημονικός συνεργάτης πλήρους απασχόλησης στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου από 1/1/2007 μέχρι και 5/3/2008 (Δ/ντής: Καθηγητής Β. Γεωργούλιας).
- ◆ Επικουρική ιατρός στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (Δ/ντής: Καθηγητής Β. Γεωργούλιας) από 6/3/2008 μέχρι και 6/3/2009 (1 έτος), από 6/4/2009 μέχρι και 6/4/2010 (1 έτος) και από 16/6/2010 μέχρι και 8/9/2010, οπότε παραιτήθηκα προκειμένου να διορισθώ σε θέση Επιμελητή Β΄.
- ◆ Επιμελήτρια Β΄ στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (Δ/ντής: Καθηγητής Β. Γεωργούλιας) από 9/9/2010 μέχρι και σήμερα.

## **II. Συμμετοχή σε επιστημονικές εταιρίες:**

1. Τακτικό μέλος της Εταιρίας Ογκολόγων-Παθολόγων Ελλάδος.
2. Τακτικό μέλος της Ελληνικής Εταιρίας Γηριατρικής Ογκολογίας.
3. Μέλος της American Society of Clinical Oncology.

## **III. Κλινικό έργο:**

Κατά τις χρονικές περιόδους 8/1999 – 8/2001 και 9/2002 – 9/2003 υπηρέτησα ως ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, για την απόκτηση της

προαπαιτούμενης για την ειδικότητα της Παθολογικής-Ογκολογίας 3ετούς εκπαίδευσης στη Γενική Παθολογία.

Κατά το 1 έτος της αναμονής μου για την έναρξη της κυρίως ειδικότητας της Παθολογικής-Ογκολογίας, 9/2001 - 9/2002, άρχισα να εργάζομαι στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η ως υπεύθυνος ιατρός των διεθνών κλινικών μελετών. Απέκτησα σημαντική εμπειρία τόσο στο σχεδιασμό και τη διεξαγωγή των κλινικών μελετών, όσο και στην αξιολόγηση και παρακολούθηση των ασθενών που μετείχαν σε αυτές.

Κατά τη χρονική περίοδο 3/11/2003 – 3/11/2006 υπηρέτησα σαν ειδικευόμενη ιατρός στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, για την απόκτηση του τίτλου ειδικότητας Παθολογίας – Ογκολογίας. Στα πλαίσια της τριετούς ειδίκευσής μου εκπαιδεύτηκα επί δίμηνο, 10/1/2005 – 10/3/2005, στο Ακτινοθεραπευτικό τμήμα του Αρεταιείου Νοσοκομείου του οποίου παρακολούθησα τόσο τις κλινικές όσο και τις επιστημονικές δραστηριότητες. Η εμπειρία αυτή συνέβαλε σημαντικά στην κατάρτισή μου σχετικά με το σχεδιασμό της ακτινοθεραπείας και την παρακολούθηση των ασθενών που υποβάλλονται σ' αυτή. Επίσης, επί εξάμηνο, 2/5/2006 – 26/10/2006, εκπαιδεύτηκα στο Beatson Oncology Center της Γλασκόβης/Σκωτίας υπό τον καθηγητή Jim Cassidy, διεθνώς αναγνωρισμένο Ογκολόγο-ερευνητή στις νεοπλασίες του γαστρεντερικού συστήματος. Κατά το διάστημα αυτό παρακολουθούσα το εκπαιδευτικό πρόγραμμα και ασκούσα τα κλινικά μου καθήκοντα καθημερινά στα τακτικά εξωτερικά ιατρεία του Νοσοκομείου, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις νεοπλασίες του γαστρεντερικού και του ουροποιητικού συστήματος. Η εκπαίδευση στο

εξειδικευμένο αυτό Ογκολογικό Κέντρο έδωσε σημαντική ώθηση στην κλινική μου εμπειρία στην Ογκολογία.

Μετά την απόκτηση του τίτλου ειδικότητας της Παθολογικής – Ογκολογίας τον 1/2007 και για περίπου 1 χρόνο, μέχρι τον 2/2008, εργάστηκα ως επιστημονικός συνεργάτης της Παθολογικής – Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑ.Γ.Ν.Η. Από τον 3/2008 και μέχρι τον 9/2010 κατείχα θέση επικουρικού ιατρού στην Παθολογική – Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η. Κατά το διάστημα αυτό, ασκώντας καθήκοντα Επιμελητή Β', ανέλαβα σταδιακά ολοένα και πιο υπεύθυνο ρόλο στην καθημερινή περίθαλψη των νοσηλευομένων ασθενών ( 42 κλίνες) και στη διεκπεραίωση της διακίνησης των ασθενών στη μονάδα ημερήσιας χημειοθεραπείας. Συμμετείχα πλήρως στο πρόγραμμα εφημεριών της κλινικής και στην άσκηση συμβουλευτικής Ογκολογίας στις διάφορες κλινικές του ΠΑ.Γ.Ν.Η. Από τον 9/2010 και μέχρι σήμερα κατέχω θέση Επιμελήτριας Β' στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η, συμμετέχοντας πλήρως στο κλινικό και εκπαιδευτικό έργο καθώς και στο πρόγραμμα εφημεριών της Κλινικής.

#### **IV. Εκπαιδευτικό έργο:**

##### **A. Ως εκπαιδευόμενος:**

Έχω παρακολουθήσει περί τα 30 ελληνικά και διεθνή ιατρικά συνέδρια, εκ των οποίων τα σημαντικότερα είναι τα ακόλουθα:

1. 25<sup>th</sup> ESMO Congress, 13-17 October 2000, Hamburg-Germany.
2. 11<sup>th</sup> ECCO Conference, 21-25 October 2001, Lisbon-Portugal.

3. ASCO (American Society of Clinical Oncology) Annual Meeting 2002, May 18-21, Orlando-FL.
4. 8<sup>th</sup> International Conference Primary Therapy of Early Breast Cancer, 12-15 March 2003, St. Gallen-Switzerland.
5. Πρόγραμμα Ενέργεια Συνεχιζόμενης Επαγγελματικής Κατάρτισης, «Αντινεοπλασματική Χημειοθεραπεία» με 80 ώρες θεωρητική κατάρτιση από 9/10/03 μέχρι 27/10/03, στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Υγεία – Πρόνοια» 2000-2006 του Γ΄ Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης.
6. 3<sup>rd</sup> Postgraduate Workshop of “THEAGENIO” Anticancer Institute, with the title “Breast Cancer: the global approach”. 26 June 2004, Thessaloniki.
7. 29<sup>th</sup> ESMO Congress, 29 October-2 November 2004, Vienna-Austria.
8. ESMO Scientific & Educational Conference (ESEC). 2-5 June 2005, Budapest.
9. 13<sup>th</sup> ECCO Congress, 30 October-3 November 2005, Paris-France.
10. 31<sup>st</sup> ESMO Congress, 29 September-3 October 2006, Istanbul-Turkey.
11. 5<sup>th</sup> Masterclass in Clinical Oncology by the European School of Oncology (ESO). 11-17 February 2006, St. Julians – Malta.
12. Workshop “Advanced Course on Breast Cancer” at the Jules Bordet Institute. 28-30 June 2006, Brussels – Belgium.
13. European perspectives in Urologic Oncology. A Case-Based Congress to Enhance Patient Management. 1-3 February 2007, Barcelona – Spain.
14. Παρακολούθηση μαθημάτων 1<sup>ου</sup> κύκλου σπουδών ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΘΩΡΑΚΟΣ – ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ: «Από τη βασική έρευνα στη θεραπεία» της Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας (συνολικής διάρκειας 20 διδακτικών ωρών). Αθήνα, 20 Μαΐου 2007.

15. 6<sup>th</sup> European Breast Cancer Conference (EBCC-6), 15-19 April 2008, Berlin-Germany.
16. 33<sup>rd</sup> ESMO Congress, 12-16 September 2008, Stockholm-Sweden.
17. Greek-Austrian Exchange experiences meeting on metastatic liver disease from colorectal cancer. 5-6 December 2008, Vienna-Austria.
18. 4<sup>th</sup> European International Kidney Cancer Symposium, 8-9 May 2009, Berlin-Germany.
19. 35<sup>th</sup> ESMO Congress, 8-12 October 2010, Milan-Italy.
20. "Advances and Perspectives in Thoracic and Upper Aerodigestive Malignancies" International Symposium, 10-13 March 2011, Athens-Greece.
21. 6<sup>th</sup> European International Kidney Cancer Symposium, 6-7 May 2011, Warsaw-Poland.
22. 16<sup>th</sup> ECCO Congress, 23-27 September 2011, Stockholm-Sweden.
23. "Changing the Roadmap for GIST Survival" International Meeting, 21-23 October 2011, Athens-Greece.
24. "Advances and Perspectives in Geriatric Oncology" International Symposium, 17-18 February 2012, Athens-Greece.
25. IGUCC 4 "Advances in prostate cancer" Educational Symposium, 31 March-1 April 2012, Prague-Czech Republic.

## **B. Ως εκπαιδευτής:**

**B1.** Συμμετοχή με εισηγήσεις στα παρακάτω εκπαιδευτικά σεμινάρια – ιατρικά συνέδρια:

**1. 2<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος 1996.**

Στρογγυλή Τράπεζα: Καρκίνος παχέος εντέρου.

Συντονιστής: Ο. Μανούσος. Εισηγητές: Ε. Ξυνός, Σ. Μυγιάκης, Α. Πάλλης, **B. Μποζιονέλου**, Ι. Σουγκλάκος, Μ. Τσαρδή.

**2. 1<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο για την γαστρεντερική κινητικότητα.**

**Ηράκλειο, Δεκέμβριος 1999.**

Εισήγηση με θέμα: Δωδεκαδακτυλο-γαστρο-οισοφαγική παλινδρόμηση.

**3. 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 6-9 Απριλίου**

**2006.** Στρογγυλή τράπεζα: Χημειοπροφύλαξη του καρκίνου.

Εισήγηση: Εμβόλια. Το παράδειγμα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

**4. 15<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 7-11**

**Νοεμβρίου 2007.** Στρογγυλή τράπεζα: Νέα μόρια στην Ογκολογία.

Εισήγηση: Αναστολείς της mTOR.

**5. Θερινά Μαθήματα Ογκολογίας - 2η Διαπανεπιστημιακή Συνάντηση (Summer school), 21-25 Ιουλίου 2008.**

Εισήγηση με θέμα: Εξελίξεις στη θεραπεία των ασθενών με κολοορθικό καρκίνο.

**6. 16<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 12-15**

**Νοεμβρίου 2008.** Στρογγυλή τράπεζα: Καρκίνος μαστού.

Εισήγηση: Συμπληρωματική χημειοθεραπεία στον καρκίνο μαστού:  
χρειάζονται οι ανθρακυκλίνες;

**7. 15<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 29-31 Οκτωβρίου 2010.** Στρογγυλή  
τράπεζα: Σύγχρονα θεραπευτικά προβλήματα σε συχνούς καρκίνους.

Εισήγηση: Βιολογικοί δείκτες καρκίνου του παχέος εντέρου και στοχευμένη  
θεραπεία.

**8. Θερινά Μαθήματα Ογκολογίας (5<sup>ο</sup> Summer School), Ηράκλειο  
Κρήτης 23-29 Ιουλίου 2012.**

Εισήγηση με θέμα: Καρκίνος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας.

**B2.** Εκπαίδευση ειδικευομένων Παθολογικής –Ογκολογίας στα πλαίσια του  
εκπαιδευτικού προγράμματος της Κλινικής.

**B3.** Εκπαίδευση φοιτητών 3<sup>ου</sup> έτους στην Κλινική Σημειολογία.

**B4.** Συμμετοχή στην εκπαίδευση νοσηλευτών του ΠΑ.Γ.Ν.Η στο πλαίσιο του  
προγράμματος απόκτησης νοσηλευτικής ειδικότητας στην Παθολογία.

**B5.** Εκπαίδευση ειδικευομένων Παθολογίας στα πλαίσια του κύκλου  
μαθημάτων «Ανασκόπηση Παθολογίας» Ιανουάριος-Φεβρουάριος 2011.

Εισήγηση με θέμα: «Αρχές Ογκολογίας».



## **V. Επιστημονικό- Ερευνητικό έργο:**

1. Εργασία, κατά την περίοδο 1998-1999, στο εργαστήριο μελέτης της κινητικότητας του πεπτικού της Γενικής Χειρουργικής Κλινικής του ΠΑ.Γ.Ν.Η.
2. Συμμετοχή στα ερευνητικά προγράμματα της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής, αποτέλεσμα των οποίων είναι οι παρακάτω αναφερόμενες δημοσιεύσεις σε ιατρικά περιοδικά και ανακοινώσεις σε συνέδρια.
3. **Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής** με θέμα: «Μελέτη της επίδρασης του HERCEPTIN (TRASTUZUMAB) σε κυκλοφορούντα CK-19 mRNA θετικά κύτταρα, στο αίμα και το μυελό των οστών, ασθενών με καρκίνο του μαστού».

## **VI. Επιστημονικές δημοσιεύσεις**

### **A. Ξενόγλωσσα περιοδικά**

#### **1. Assessment of vascular maturation in lung and breast carcinomas using a novel basement membrane component, LH39.**

S. Kakolyris, A. Giatromanolaki, M. Koukourakis, L. Kaklamanis, Ch. Kouroussis, **V. Bozionelou**, V. Georgoulas, K.C. Gatter, A.L. Harris. Anticancer Research 21: 4311-4316 (2001).

#### **2. A Dose-Escalation Study of Oxaliplatin and Vinorelbine in Patients with Advanced Solid Tumors.**

S. Kakolyris, C. Kouroussis, M. Koukourakis, D. Mavroudis, K. Malas, N. Vardakis, **V. Bozionelou**, K. Kalbakis, V. Georgoulas. Oncology 2002; 63(3):213-218.

**3. A Dose Escalation Study of Docetaxel and Oxaliplatin Combination in Patients with Metastatic Breast and Non-small Cell Lung Cancer.**

Ch. Kouroussis, S. Agelaki, D. Mavroudis, S. Kakolyris, N. Androulakis, K. Kalbakis, J. Souglakos, K. Malas, **V. Bozionelou**, A. Pallis, H. Adamtziki, V. Georgoulas. Anticancer Research 23: 785-792 (2003).

**4. ZD1839, a novel, oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, as salvage treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer. Experience from a single center participating in a compassionate use program.**

A. Pallis, D. Mavroudis, N. Androulakis, J. Souglakos, C. Kouroussis, **V. Bozionelou**, I. Vlachonikolis, V. Georgoulas. Lung Cancer 40 (2003) 301-307.

**5. Salvage Treatment of Metastatic Breast Cancer with Docetaxel and Carboplatin.**

D. Mavroudis, A. Alexopoulos, N. Malamos, A. Ardavanis, C. Kandyliis, E. Stavriniidis, Ch. Kouroussis, S. Agelaki, N. Androulakis, **V. Bozionelou**, V. Georgoulas. Oncology 2003 ; 64 :207-212.

**6. High incidence of pulmonary toxicity of weekly docetaxel and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer: Results of a dose-finding study.**

Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, S. Kakolyris, A. Voloudaki, K. Kalbakis, J. Souglakos, S. Agelaki, K. Malas **V. Bozionelou**, V. Georgoulas. Lung Cancer (2004) 44, 363-368.

**7. Detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes.**

E. N. Stathopoulos, E. Sanidas, M. Kafousi, D. Mavroudis, J. Askoxylakis, **V. Bozionelou**, M. Perraki, D. Tsiftsis & V. Georgoulas. Ann Oncol. 2005, Feb;16(2): 240-6.

**8. 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.**

**V. Bozionelou**, D. Mavroudis, M. Perraki, S. Papadopoulos, S. Apostolaki, E. Stathopoulos, A. Stathopoulou, E. Lianidou, V. Georgoulas. Clinical Cancer Research Vol. 10, 8185-8194, December 15, 2004.

**9. 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.**

Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, **Bozionelou V**, Agelaki S, Kanellou P, Kotsakis A, Politaki E, Kalbakis K, Kalykaki A, Vamvakas L, Georgoulas V, Mavroudis D. Ann Oncology 2007, May; 18(5):851-8.

**10. A dose escalation and pharmacokinetic study of biweekly pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel and gemcitabine in patients with advanced solid tumors.**

**Bozionelou V**, Vamvakas L, Pappas P, Agelaki S, Androulakis N, Kalykaki A, Nikolaidou M, Kentepozidis N, Giassas S, Marselos M, Georgoulas V, Mavroudis D. Br J Cancer. 2007, Jul 2; 97(1):43-9.

**11. Dose escalating clinical study of high dose infusional 5-fluorouracil and leukovorin (AIO regimen) plus alternate weekly administration of oxaliplatin and irinotecan in patients with advanced tumors of the gastrointestinal tract.**

Gkioulbasanis I, Souglakos J, Vardakis N, Kotsakis A, Saridaki Z, Kentepozidis N, Polyzos A, Giassas S, Ignatiadis M, **Bozionelou V**, Christophylakis C, Georgoulas V. J BUON. 2007, Apr-Jun; 12(2):197-202.

**12. A dose escalation study of the biweekly administration of paclitaxel, oxaliplatin and capecitabine in patients with advanced solid tumors.**

Z. Saridaki, **V. Bozionelou**, N. Kentepozidis, A. Kotsakis, N. Vardakis, A. Kalykaki, I. Gioulbasanis, A. karabeazis, L. Vamvakas, V. Georgoulas, D. Mavroudis.  
Oncology 2007; 72:45-50.

**13. A phase I trial of gemcitabine, docetaxel and carboplatin administered every 2 weeks as first line treatment in patients with advanced breast cancer.**

**Bozionelou V**, Kalbakis K, Vamvakas L, Agelaki S, Androulakis N, Kalykaki A, Georgoulas V, Mavroudis D.  
Cancer Chemother Pharmacol. 2009 Jan 22.

**14. Salvage chemotherapy with Gemcitabine and Pegylated Liposomal Doxorubicin in pretreated patients with ovarian cancer: A multicenter phase II study.**

A. kalykaki, P. Papakotoulas, I. Boukovinas, N. Vardakis, **V. Bozionelou**, I. Barthalitis, A. Athanasiadis, A. Polyzos, A. Potamianou, D. Mavroudis, V. Georgoulas.  
Forum of Clinical Oncology, June 2010.

**15. Second-line chemotherapy with Capecitabine (Xeloda) and Docetaxel (Taxotere) in previously treated, unresectable adenocarcinoma of pancreas: the final results of a phase II trial.**

Katopodis O, Polyzos A, Kentepozidis N, Giassas S, Rovithi M, **Bozionelou V**, Kalbakis K, Vamvakas L, Mavroudis D, Georgoulas V.

Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Apr 29. [Epub ahead of print]

**16. Salvage treatment in metastatic breast cancer with weekly paclitaxel and bevacizumab.**

Polyzos A, Kalbakis K, Kentepozidis N, Giassas S, Kalykaki A, Vardakis N, **Bozionelou V**, Saloustros E, Kontopodis E, Georgoulas V, Mavroudis D.

Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Oct 5. [Epub ahead of print]

**17. A retrospective analysis of non-platinum-based first- and second-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.**

Kotsakis A, Hatzidaki D, Vamvakas L, Vardakis N, Kalykaki A, **Bozionelou V**, Androulakis N, Kalbakis K, Saridaki Z, Georgoulas V, Agelaki S.

Anticancer Res. 2010 Oct; 30(10):4335-42.

**18. 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.**

Pallis AG, Karampeazis A, Vamvakas L, Vardakis N, Kotsakis A, **Bozionelou V**, Kalykaki A, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulas V.

Ann Oncol 2011 Nov; 22(11):2448-55. Epub 2011 Mar 10.

**19. Empirical therapy with ceftazidime combined with levofloxacin or once-daily amikacin for febrile neutropenia in patients with neoplasia: a prospective comparative study.**

Samonis G, Koutsounaki E, Karageorgopoulos DE, Mitsikostas P, Kalpadaki C, **Bozionelou V**, Bompolaki I, Sgouros J, Taktikou V, Falagas ME.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Oct 31. [Epub ahead of print]

**20. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant**

**CK19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study.**

Georgoulas V, **Bozionelou V**, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D.

Ann Oncol. 2012 Feb 29. [Epub ahead of print]

**21. Clinical relevance of circulating CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer.**

Androulakis N, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, **Bozionelou V**, Pallis A, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D, Georgoulas V.

Br J Cancer 2012 Jun 5; 106(12): 1917-25.

**22. Paclitaxel in combination with carboplatin as salvage treatment in patients with castration-resistant prostate cancer: a Hellenic oncology research group multicenter phase II study.**

Kentepozidis N, Soultati A, Giassas S, Vardakis N, Kalykaki A, Kotsakis A, Papadimitraki E, Pantazopoulos N, **Bozionelou V**, Georgoulas V.

Cancer Chemother Pharmacol 2012 Jul;70(1): 161-8.

**23. A multicenter phase II trial of docetaxel and capecitabine as salvage treatment in anthracycline and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer.**

Karachaliou N, Ziras N, Syrigos K, Tryfonidis K, Papadimitraki E, Kontopodis E, **Bozionelou V**, Kalykaki A, Georgoulas V, Mavroudis D.

Cancer Chemother Pharmacol 2012 Jul;70 (1): 169-76.

## **B. Ελληνικά περιοδικά**

**1. Χορήγηση ZD1839, ενός αναστολέα της τυροσινικής κινάσης του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, ως θεραπεία διάσωσης σε ασθενείς με εκτεταμένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Η εμπειρία της Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.**

A. Πάλλης, Δ. Μαυρουδής, **B. Μποζιονέλου**, Ν. Ξενίδης, Γ. Μηλάκη, Ν. Βαρδάκης, Β. Γεωργούλιας.

Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2002, 1(4): 208-219.

**2. Χορήγηση του συνδυασμού Γεμισιταμπίνης και Ιρινοτεκάνης σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που έχουν λάβει θεραπεία με ταξάνες και ανθρακυκλίνες: Μια πολυκεντρική μελέτη φάσης II.**

**B. Μποζιονέλου**, Σ. Αγγελάκη, Χ. Κουρούσης, Α. Αρδαβάνης, Κ. Καλμπάκης, Κ. Μαλάς, Ν. Μαλάμος, Α. Αλεξόπουλος, Ε. Τσελεπατιώτης, Β. Γεωργούλιας.

Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2003, 2 (3/4): 272-278.

## *VII. Ανακοινώσεις σε Επιστημονικά Συνέδρια*

### **A. Διεθνή Συνέδρια**

**1. Salvage chemotherapy with cyclophosphamide(C) and high dose leucovorin(LV) and a 48-hour continuous infusion (CI) 5-fluorouracil(5-FU) in anthracycline-taxane refractory metastatic breast cancer (MBC). A phase II study.**

K. Kalbakis, Ch. Kouroussis, J. Souglakos, S. Agelaki, D. Mavroudis, D. Reppa, **V. Bozionelou**, I. Kazakou, G. Samonis, V. Georgoulas.

25<sup>th</sup> ESMO Congress, Hamburg; October 2000.

**2. Phase I study of the topotecan and epirubicin combination as second-line treatment in small cell lung cancer (SCLC).**

S. Agelaki, D. Mavroudis, A. Rapti, Ch. Palamidas, J. Stavrakakis, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, N. Vardakis, L. Vamvakas, N. Klapsinos, **V. Bozionelou**, A. Pallis, V. Georgoulas.

11<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment; Paris, February 2001.

**3. A phase I study of weekly docetaxel (D) and gemcitabine (G) in advanced non-small cell lung cancer.**

Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, K. Kalbakis, J. Souglakos, L. Vamvakas, I. Mixaki, A. Pallis, N. Xenidis, **V. Bozionelou**, V. Georgoulas.

11<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment; Paris, February 2001.

**4. A phase I study of weekly docetaxel (D) and gemcitabine (G) in advanced non-small cell lung cancer.**

Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, K. Kalbakis, J. Souglakos, L. Vamvakas, K. Malas, **V. Bozionelou**, N. Androulakis, H. Adamtziki, N. Xenidis, V. Georgoulas.

American Society of Clinical Oncology (ASCO), San Francisco; 12-19 May 2001.

**5. Treatment of pancreatic cancer with a combination of irinotecan and gemcitabine.**

G. Stathopoulos, S. Agelaki, D. Mavroudis, N. Androulakis, A. Dimopoulos, G. Rigatos, Ch. Couroussis, J. Souglakos, **V. Bozionelou**, H. Adamtziki, V. Georgoulas.

American Society of Clinical Oncology (ASCO), San Francisco; 12-19 May 2001.

**6. A phase I study with oxaliplatin (LOHP) plus leukovorin (LV)/5-fluorouracil (5-FU) in a weekly schedule (AIO) in patients with advanced solid tumors. Preliminary results.**



J. Souglakos, S. Kakolyris, N. Androulakis, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, S. Agelaki, N. Vardakis, **V. Bozionelou**, A. Pallis, V. Georgoulas.

3<sup>rd</sup> World Congress on Gastrointestinal Cancer 2001, Barcelona-Spain.

**7. Phase I study of weekly paclitaxel and liposomal doxorubicin in patients with advanced solid tumors.**

N. Androulakis, Ch. Kouroussis, D. Mavroudis, S. Agelaki, J. Souglakos, N. Vardakis, A. Pallis, **V. Bozionelou**, V. Georgoulas.

11<sup>th</sup> ECCO Congress, Lisbon; 21-26 October 2001.

**8. A phase I study with oxaliplatin (LOHP) plus leukovorin (LV)/5-fluorouracil (5-FU) in a weekly schedule (AIO) in patients with advanced solid tumors. Preliminary results.**

J. Souglakos, S. Kakolyris, N. Androulakis, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, S. Agelaki, N. Vardakis, **V. Bozionelou**, A. Pallis, V. Georgoulas.

11<sup>th</sup> ECCO Congress, Lisbon; 21-26 October 2001.

**9. Phase I study of the oxaliplatin/capecitabine combination in patients with advanced solid tumors: A preliminary report.**

S. Kakolyris, J. Souglakos, Ch. Kouroussis, S. Agelaki, N. Vardakis, D. Mavroudis, **V. Bozionelou**, N. Androulakis, N. Xenidis, V. Georgoulas.

11<sup>th</sup> ECCO Congress, Lisbon; 21-26 October 2001.

**10. A phase I study of weekly docetaxel (D) and gemcitabine (G) in advanced non-small cell lung cancer.**

Ch. Kouroussis, S. Kakolyris, D. Mavroudis, K. Kalbakis, J. Souglakos, L. Vamvakas, K. Malas, **V. Bozionelou**, N. Androulakis, H. Adamtziki, N. Xenidis, V. Georgoulas.

4<sup>th</sup> International Congress of Lung Cancer, Halkidiki, April 2001.

**11. Salvage treatment with the combination of gemcitabine and irinotecan in breast cancer patients pretreated with taxanes and anthracyclines: A multicenter phase II study.**

S. Agelaki, A. Pallis, A. Alexopoulos, Ch. Couroussis, **V. Bozionelou**, N. Malamos, S. Kakolyris, N. Vardakis, N. Androulakis, V. Georgoulas.

San Antonio Breast Cancer Symposium; 10-13 December 2001, San Antonio.

**12. Dose escalation study of Docetaxel (D) and Oxaliplatin (L-OHP) as first line treatment in patients with advanced breast (ABC) and non-small cell lung cancer (NSCLC).**

Ch. Kouroussis, S. Agelaki, D. Mavroudis, S. Kakolyris, N. Androulakis, K. Kalbakis, K. Mallas, **V. Bozionelou**, A. Pallis, Ch. Balaska, V. Georgoulas. Dpt of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete-Greece.

12<sup>th</sup> International Congress of anti-cancer treatment; 4-7 February 2002, Paris-France.

**13. Phase I study of biweekly oxaliplatin (LOHP) in combination with weekly administration of leukovorin (LV) and continuous 5-fluoruracil (5-FU) infusion in patients with advanced solid malignancies.**

S. Agelaki, K. kalbakis, Ch. Kouroussis, N. Androulakis, S. kakolyris, J. Souglakos, N. Vardakis, **V. Bozionelou**, D. Mavroudis, V. Georgoulas; University General Hospital of Heraklion, Department of Medical Oncology, Heraklion, Greece. American Society of Clinical Oncology (ASCO), Orlando-FL, May 18-21, 2002.

**14. The combination of Gemcitabine (GEM) and Capecitabine (CAP) as first-line treatment, in patients with unresectable pancreatic cancer: Preliminary results of a multicenter phase II study.**

**Bozionelou V.**, Stathopoulos G., Syrigos K., Polyzos A., Kouroussis Ch., Androulakis N., Tsiakopoulos N., Potamianou A., Fountzilas G., Rigatos S., Athanasiadis A., Georgoulas V. for the Pancreatic Group of the Hellenic Oncology Research Group, Greece. The Fourth Annual Global Oncology Young investigators' Meeting, Indianapolis-IN, June 20-21, 2002.

**15. The combination of Gemcitabine (GEM) and Capecitabine (CAP) as first-line treatment, in patients with unresectable pancreatic cancer: Preliminary results of a multicenter phase II study.**

**Bozionelou V.**, Stathopoulos G., Syrigos K., Polyzos A., Kouroussis Ch., Souglakos J., Potamianou A., Fountzilas G., Athanasiadis A., Georgoulas V. for the Pancreatic Group of the Hellenic Oncology Research Group, Greece.

27<sup>th</sup> ESMO Congress, 18-22 October, 2002: Nice, France.

**16. ZD1839, a novel, oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, as salvage treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer. Experience from a single center participating in a compassionate use program.**

A. Pallis, D. Mavroudis, N. Androulakis, J. Souglakos, C. Kouroussis, **V. Bozionelou**, I. Vlachonikolis, V. Georgoulas.

13<sup>th</sup> International Congress on Anti-cancer Treatment; 1-4 February 2003, Paris-France.

**17. Monoclonal antibody therapy with trastuzumab (Herceptin) in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-19 positive tumour cells in peripheral blood and bone marrow.**

**V. Bozionelou**, D. Mavroudis, M. Perraki, S. Apostolaki, A. Stathopoulou, E. Lianidou, V. Georgoulas.

American Society of Clinical Oncology (ASCO), 31 May- 3 June 2003, Chicago.

**18. Gefitinib (ZD 1839) as salvage treatment in patients with advanced NSCLC, participating in a compassionate use program. Quality of life and disease related symptoms improvement.**

A.G.Pallis, N. Androulakis, D. Mavroudis, L. Vamvakas, K. Kalbakis, Ch. Kouroussis, **V. Bozionelou**, N. Vardakis, S. Giassas, V. Georgoulas.

15<sup>th</sup> International Congress on Anti-cancer Treatment; 9-12 February 2004, Paris-France.

**19. Combination of Irinotecan (CPT-11) plus 5-Fluorouracil and Leukovorin (FOLFIRI regimen) as first line treatment for elderly patients with metastatic colorectal cancer: A phase II trial.**

J. Souglakos, D. Mavroudis, N. Androulakis, Ch. Kouroussis, K. Kalbakis, **V. Bozionelou**, N. Vardakis, S. Spiridonakou, I. Makridis, V. Georgoulas.

BUON; 14-17 October 2004, Belgrade.

**20. Increase incidence of central nervous system (CNS) involvement for patients with breast cancer (BC) treated with Taxanes based chemotherapy.**

J. Souglakos, L. Vamvakas, Z. Saridaki, I. Kazakou, A. Pallis, K. Kalbakis, A. Kalikaki, **V. Bozionelou**, V. Georgoulas.

29<sup>th</sup> ESMO Congress, 29 October-2 November, 2004: Vienna, Austria.

**21. Detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes.**

E.N. Stathopoulos, E. Sanidas, M. Kafoussi, D. Mavroudis, J. Askoxylakis, **V. Bozionelou**, M. Perraki, G. Delidis, D. Tsiftsis, V. Georgoulas.

29<sup>th</sup> ESMO Congress, 29 October-2 November, 2004: Vienna, Austria.

**22. Sequential administration of Cisplatin+Gemcitabine and Docetaxel as first line treatment in patients with bladder cancer. A multicenter phase II trial.**

I. Boukovinas, N. Androulakis, A. Potamianou, N. Ziras, K. Kalbakis, P. Papakotoulas, A. Kalykaki, Ch. Couroussis, A. Kotsakis, **V. Bozionelou**, M. Ignatiadis, V. Georgoulas.

16<sup>th</sup> International Congress on Anti-cancer Treatment; 1-4 February 2005, Paris-France.

**23. Molecular detection of HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer.**

D. Mavroudis, M. Perraki, G. Kallergi, A. Pallis, P. Kanellou, L. Kalmanti, N. Xenidis, **V. Bozionelou**, E. Manousakis, V. Georgoulas.

International Society for Cellular Oncology Congress (ISCO); 5-8 April 2005, Belfast.

**24. Detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes.**

E.N. Stathopoulos, E. Sanidas, M. Kafoussi, D. Mavroudis, J. Askoxylakis, **V. Bozionelou**, M. Perraki, G. Delidis, D. Tsiftsis, V. Georgoulas.

International Society for Cellular Oncology Congress (ISCO); 5-8 April 2005, Belfast.

**25. Molecular detection of HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer.**

D. Mavroudis, M. Perraki, G. Kallergi, A. Pallis, P. Kanellou, L. Kalmanti, N. Xenidis, **V. Bozionelou**, E. Manousakis, V. Georgoulas.

American Society of Clinical Oncology (ASCO); 13-20 May 2005, Orlando FL.

**26. A phase II study with docetaxel and gemcitabine in previously untreated patients with advanced lung adenocarcinomas.**

I. Boukovinas, N. Androulakis, A. Kalykaki, J. Souglakos, **V. Bozionelou**, A. Pallis, N. Vardakis, A. Kotsakis, S. Giassas, V. Georgoulas.

World Conference on Lung Cancer (IASLC); 1-6 June 2005, Barcelona Spain.

**27. Gemcitabine (GEM) plus oxaliplatin (LOHP) as salvage treatment in anthracycline and taxane pretreated patients with advanced breast cancer (ABC).**

A. Kalykaki, A. Potamianou, N. Malamos, K. Syrigos, K. Kalbakis, N. Androulakis, L. Vamvakas, **V. Bozionelou**, A. Kotsakis, D. Mavroudis.

13<sup>th</sup> ECCO Congress, 30 October-3 November, 2005: Paris, France.

**28. First line chemotherapy with docetaxel plus gemcitabine in elderly or poor performance status patients with advanced non-small cell lung cancer: The experience of the Hellenic Oncology Research Group (HORG).**

M. Ignatiadis, K. Kalbakis, N. Vardakis, S. Giassas, G. Sfakiotaki, Z. Saridaki, **V. Bozionelou**, J. Gioulbasanis, A. Pallis, V. Georgoulas.

13<sup>th</sup> ECCO Congress, 30 October-3 November 2005, Paris, France.

**29. Sequential administration of Cisplatin (C), Gemcitabine (G) and Docetaxel (D), as first-line treatment in patients with advanced transitional cell carcinoma (TCC) of the urothelial tract: A multicenter phase II study (poster).**

N. Androulakis, I. Boukovinas, **V. Bozionelou**, A. Kalykaki, A. Potamianou, A. Pallis, L. Vamvakas, I. Gkioulbasanis, I. Souglakos, G. Sfakiotaki. Hellenic Oncology Cooperative Group, (HORG), Heraklion, Greece.

American Society of Clinical Oncology (ASCO); 2-6 June 2006, Atlanta.

**30. Sequential administration of Cisplatin (C), Gemcitabine (G) and Docetaxel (D), as first-line treatment in patients with advanced transitional cell carcinoma (TCC) of the urothelial tract: A multicenter phase II study (poster).**

N. Androulakis, I. Boukovinas, **V. Bozionelou**, A. Kalykaki, A. Potamianou, A. Pallis, L. Vamvakas, I. Gkioulbasanis, I. Souglakos, G. Sfakiotaki. Hellenic Oncology Cooperative Group, (HORG), Heraklion, Greece.

31<sup>st</sup> ESMO Congress, 29 September-3 October 2006, Istanbul, Turkey.

**31. HER2 mRNA-positive circulating tumor cells in patients with stage I and II breast cancer: evaluation of their prognostic significance (poster).**

A. Pallis, S. Apostolaki, M. Perraki, L. Kalmanti, N. Xenidis, **V. Bozionelou**, K. Kalbakis, A. Kotsakis, S. Agelaki, M. Ignatiadis, Z. Saridaki, E. Stathopoulos, E. Lianidou, V. Georgoulis, D. Mavroudis.

18<sup>th</sup> International Congress on Anti Cancer Treatment; 6-9 February 2007, Paris-France.

**32. A dose escalation and pharmacokinetic study of biweekly pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel and gemcitabine in patients with advanced solid tumors (oral presentation).**

**V. Bozionelou**, L. Vamvakas, P. Pappas, S. Agelaki, N. Androulakis, A. Karampeazis, M. Nikolaidou, N. Kentepozidis, S. Giassas, M. Marselos, V. Georgoulis, D. Mavroudis.

18<sup>th</sup> International Congress on Anti Cancer Treatment; 6-9 February 2007, Paris-France.

**33. Docetaxel compared with vinorelbine in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): A preliminary report of a randomized phase III trial.**

A. Karampeazis, L. Vamvakas, X. Tsiadaki, A. Kalykaki, Ch. Christophyllakis, **V. Bozionelou**, J. Gioulbasanis, V. Markos, Z. Giannousi, N. Androulakis.

8<sup>th</sup> International Society of Geriatric Oncology (SIOG); 8-11 November 2007, Madrid Spain.

**34. A multicenter phase I trial of Gemcitabine, Docetaxel and Carboplatin administered every 2 weeks, as first line treatment in patients with metastatic breast cancer (poster).**

V. Bozionelou, M. Ignatiadis, Z. Saridaki, A. Karampeazis, G. Sfakiotaki, A. Pallis, I. Gioulbasanis, V. Markos, V. Georgoulas, D. Mavroudis.

19<sup>th</sup> International Congress on Anti Cancer Treatment; 5-8 February 2008, Paris-France.

**35. Docetaxel compared with vinorelbine in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): A preliminary report of a randomized phase III trial (poster).**

A. Karampeazis, L. Vamvakas, X. Tsiadaki, A. Kalykaki, Ch. Christophyllakis, V. Bozionelou, J. Gioulbasanis, V. Markos, Z. Giannousi, N. Androulakis.

19<sup>th</sup> International Congress on Anti Cancer Treatment; 5-8 February 2008, Paris-France.

**36. Docetaxel compared with vinorelbine in elderly or poor performance status (PS) patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): A randomized phase II Hellenic Oncology Research Group trial.**

S. Agelaki, A. Karampeazis, L. Vamvakas, X. Tsiadaki, A. Kalykaki, Ch. Christophyllakis, V. Bozionelou, I. Gioulbasanis, V. Markos, Z. Giannousi, N. Androulakis.

World Conference on Lung Cancer (IASLC) 2008; April 24-29, Geneva.

**37. The Relationship between Measures of Nutritional Status and Comprehensive Geriatric Assessment.**

Z. Giannousi, L. Vamvakas, E. Saloustros, A. Karampeazis, I. Gioulbasanis, G. Sfakiotaki, E. Kontopodis, Z. Saridaki, V. Bozionelou, V. Georgoulas.



9<sup>th</sup> International Society of Geriatric Oncology (SIOG) 2008; October 16-22, Montreal.

**38. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected before and during front line chemotherapy in patients with metastatic breast cancer.**

N. Androulakis, **V. Bozionelou**, M. Perraki, S. Apostolaki, A. Kalykaki, K. Kalbakis, A. Kotsakis, D. Mavroudis, V. Georgoulas.

Breast Cancer Conference (IMPAKT); May 7-9 2009, Brussels-Belgium.

**39. A phase I study of oral metronomic vinorelbine plus capecitabine in patients with metastatic breast cancer (poster).**

A. Kalykaki, S. Agelaki, A. Kotsakis, L. Vamvakas, **V. Bozionelou**, K. Kalbakis, N. Androulakis, V. Georgoulas, D. Mavroudis.

45<sup>th</sup> ASCO Annual Meeting; May 29-June 2, 2009; Orlando FL.

**40. A randomized phase II trial of irinotecan plus oxaliplatin versus oxaliplatin, fluorouracil (5-FU), leukovorin (LV) as first-line treatment in advanced gastric cancer (poster).**

I. Boukovinas, N. Androulakis, A. Polyzos, N. Vardakis, K. Amarantidis, **V. Bozionelou**, C. Kouroussis, S. Giassas, C. Christophyllakis, D. Mavroudis.

45<sup>th</sup> ASCO Annual Meeting; May 29-June 2, 2009; Orlando FL.

**41. Cyclophosphamide and pegylated doxorubicin (myocet) in elderly women with HER-2 negative locally advanced or metastatic breast cancer: preliminary results of a multicenter phase II trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG).**

Karampeazis A, Ardavanis A, Kentepozidis N, **Bozionelou V**, Papakotoulas P, Tryfonidis K, Saloustros E, Mavroudis D, Georgoulas V, Vamvakas L.

International Symposium "Advances and Perspectives in Geriatric Oncology". 17-18 February 2012, Athens- Greece.

## B. Ελληνικά Συνέδρια

### **1. Ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων στο αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού με RT-PCR: Εκτίμηση των δεικτών Κυτταροκερατίνης-19, MASPIN και CEA.**

N. Βαρδάκης, N. Ξενίδης, M. Περράκη, Σ. Αποστολάκη, **B. Μποζιονέλου**, A.

Πάλλης, B. Γεωργούλιας.

6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, Αθήνα; Οκτώβριος 2000.

### **2. Τυχαίοποιημένη μελέτη του συνδυασμού docetaxel/ cisplatin και docetaxel/ gemcitabine σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος: Τελικά αποτελέσματα της Ελληνικής Συνεργατικής Ομάδας για τον καρκίνο του πνεύμονος.**

B. Γεωργούλιας, E. Παπαδάκης, A. Αλεξόπουλος, A. Ράπτη, M. Βεσλεμές, Λ.

Βαμβακάς, A. Πάλλης, **B. Μποζιονέλου**, E. Αδαμτζίκη, N. Βαρδάκης, I. Σουγκλάκος,

Σ. Αγγελάκη, K. Καλμπάκης, X. Κουρούσης.

6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, Αθήνα; Οκτώβριος 2000.

### **3. Μη ουδετεροπενικές λοιμώξεις σε ασθενείς που έλαβαν σχήματα με Docetaxel για την θεραπεία συμπαγών όγκων.**

I. Σουγκλάκος, A. Κωτσάκης, Λ. Βαμβακάς, **B. Μποζιονέλου**, X. Κουρούσης, Σ.

Κακολύρης, K. Καλμπάκης, N. Βαρδάκης, E. Αδαμτζίκη, Z. Σαρδελής, B.

Γεωργούλιας.

6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας, Αθήνα; Οκτώβριος 2000.

### **4. Θεραπεία διάσωσης με κυκλοφωσφαμίδη, υψηλές δόσεις λευκοβορίνης και συνεχή 48ωρη έγχυση 5-φθοριουρακίλης σε ασθενείς**

**με μεταστατικό καρκίνο μαστού ανθεκτικό σε θεραπεία με ανθρακυκλίνες-ταξάνες, μελέτη φάσης II.**

Ν. Ξενίδης, Χ. Κουρούσης, Α. Πάλλης, Ε. Αδαμτζίκη, Ζ. Σαρδελής, Δ. Ρέππα, **Β. Μποζιονέλου**, Ε. Καζάκου, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**5. Μη ουδετεροπενικές λοιμώξεις σε ασθενείς που έλαβαν σχήματα με Docetaxel για την θεραπεία συμπαγών όγκων.**

Ι. Σουγκλάκος, Λ. Βαμβακάς, **Β. Μποζιονέλου**, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Κ. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, Ε. Αδαμτζίκη, Ζ. Σαρδελής, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**6. Θεραπεία πρώτης γραμμής με gemcitabine και Irinotecan σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παγκρέατος: Προκαταρκτικά αποτελέσματα μιας πολυκεντρικής μελέτης.**

Λ. Βαμβακάς, Ε. Αδαμτζίκη, Ζ. Σαρδελής, Χ. Κουρούσης, **Β. Μποζιονέλου**, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**7. Εβδομαδιαία χορήγηση ιρινοτεκάνης και λευκοβορίνης 5-φλουορουρακίλης (σχήμα ΑΙΟ) σε προθεραπευμένους ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο παχέος εντέρου: προκαταρκτικά αποτελέσματα.**

**Β. Μποζιονέλου**, Ν. Βαρδάκης, Ι. Σουγκλάκος, Ν. Ξενίδης, Σ. Αγγελάκη, Δ. Μαυρουδής, Ε. Αδαμτζίκη, Λ. Βαμβακάς, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**8. Εβδομαδιαία χορήγηση δοσεταξέλης και γεμισιταβίνης ως χημειοθεραπεία πρώτης-γραμμής σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Μια εξελισσόμενη μελέτη φάσης I.**

Α. Πάλλης, Χ. Κουρούσης, Λ. Βαμβακάς, Δ. Μαυρουδής, Κ. Καλμπάκης, Β.

**Μποζιονέλου**, Ε. Αδαμτζίκη, Ν. Ξενίδης, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**9. Θεραπεία πρώτης γραμμής με 5-FU, LV και Oxaliplatin (L-OHP) σε προχωρημένο κολοορθικό καρκίνο (ΠΚΚ). Μια πολυκεντρική μελέτη φάσης II.**

Ε. Αδαμτζίκη, Λ. Βαμβακάς, Α. Πάλλης, Β. Μποζιονέλου, Ν. Ξενίδης, Χ. Κουρούσης, Δ. Μαυρουδής, Ν. Ανδρουλάκης, Ν. Βαρδάκης, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**10. Paclitaxel-Cisplatin-Etoposide (TEP) έναντι Cisplatin-Etoposide (EP) σαν θεραπεία πρώτης γραμμής σε μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC): Προκαταρκτική ανάλυση μιας πολυκεντρικής τυχαιοποιημένης μελέτης φάσης II.**

Δ. Μαυρουδής, Λ. Βαμβακάς, Β. Μποζιονέλου, Ε. Αδαμτζίκη, Ζ. Σαρδελής, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Σ. Αγγελάκη, Δ. Ρέππα, Ε. Κρέμος, Ε. Σάρρα, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**11. Τυχαιοποιημένη μελέτη του συνδυασμού docetaxel/ cisplatin και docetaxel/gemcitabine σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος: Τελικά αποτελέσματα της Ελληνικής Συνεργατικής Ομάδας για τον καρκίνο του πνεύμονος.**

Β. Γεωργούλιας, Λ. Βαμβακάς, Α. Πάλλης, Β. Μποζιονέλου, Ε. Αδαμτζίκη, Ν. Βαρδάκης, Ι. Σουγκλάκος, Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Χ. Κουρούσης.

10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000.

**12. Μελέτη φάσης I του συνδυασμού τοποτεκάνης και επιρουβικίνης σε προθεραπευμένους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.**

Σ. Αγγελάκη, Δ. Μαυρουδής, Α. Ράπτη, Χ. Παλαμίδας, Γ. Σταυρακάκης, Χ. Κουρούσης, Κ. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, Λ. Βαμβακάς, Ν. Κλαψινός, **Β. Μποζιονέλου**, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Μάρτιος 2001.

**13. Μη ουδετεροπενικές λοιμώξεις σε ασθενείς που έλαβαν σχήματα με Docetaxel για την θεραπεία συμπαγών όγκων.**

Γ. Σαμώνης, Ν. Ανδρουλάκης, Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Κ. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, **Β. Μποζιονέλου**, Ν. Κλαψινός, Χ. Χριστοδούλου, Γ. Σκανδαλάκης, Β.Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Μάρτιος 2001.

**14. Μελέτη φάσης I με τοποτεκάνη χορηγούμενη για 3 συνεχόμενες ημέρες ανά 2 εβδομάδες σε ασθενείς με ανθεκτικούς συμπαγείς όγκους.**

Σ. Κακολύρης, Χ. Κουρούσης, Κ. Μαλλάς, Ι. Σουγκλάκος, Δ. Μαυρουδής, Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Ν. Ανδρουλάκης, Ν. Βαρδάκης, **Β. Μποζιονέλου**, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Μάρτιος 2001.

**15. Μελέτη φάσης I εβδομαδιαίας χορήγησης του συνδυασμού gemcitabine και docetaxel σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα σαν θεραπεία πρώτης γραμμής.**

Χ. Κουρούσης, Σ. Κακολύρης, Δ. Μαυρουδής, Κ. Καλμπάκης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Αγγελάκη, Κ. Μαλλάς, **Β. Μποζιονέλου**, Ν. Βαρδάκης, Γ. Σαμώνης, Β. Γεωργούλιας.

10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Μάρτιος 2001.

**16. Μελέτη φάσης I της χορήγησης oxaliplatin (LOHP) σε συνδυασμό με εβδομαδιαία χορήγηση λευκοβορίνης (LV) και συνεχή έγχυση 5-φθοριουρακίλης σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους.**

Σ. Αγγελάκη, Κ. Καλμπάκης, Χ. Κουρούσης, Ν. Ανδρουλάκης, Σ. Κακολύρης, Ι. Σουγκλάκος, Ν. Βαρδάκης, **Β. Μποζιονέλου**, Δ. Μαυρουδής, Β. Γεωργούλιας.  
Πανεπιστημιακή Παθολογική Ογκολογική Κλινική, ΠΕΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, Κρήτη.

11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 4-6 Απριλίου 2002.

**17. Μελέτη της επίδρασης του Herceptin (trastuzumab) σε mRNA CK-19 θετικά κύτταρα, στο αίμα και το μυελό των οστών, ασθενών με καρκίνο του μαστού.**

**Β. Μποζιονέλου**, Δ. Μαυρουδής, Μ. Περράκη, Ν. Βαρδάκης, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας. Πανεπιστημιακή Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, ΠΕΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο, Κρήτη.

11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 4-6 Απριλίου 2002.

**18. Μελέτη της επίδρασης του Herceptin (trastuzumab) σε mRNA CK-19 θετικά κύτταρα, στο αίμα και το μυελό των οστών, ασθενών με καρκίνο του μαστού.**

**Β. Μποζιονέλου**, Δ. Μαυρουδής, Μ. Περράκη, Ν. Βαρδάκης, Ι. Σουγκλάκος, Ν. Ανδρουλάκης, Ν. Ξενίδης, Α. Πάλλης, Β. Γεωργούλιας.

11<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 1-3 Νοεμβρίου 2002.

**19. Προκαταρκτικά αποτελέσματα μιας πολυκεντρικής τυχαίοποιημένης κλινικής δοκιμής φάσης III του docetaxel/gemcitabine (DG) έναντι του συνδυασμού vinorelbine/cisplatin (VC) σε ασθενείς με προχωρημένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (ΜΜΚΚΠ).**

Ν. Ανδρουλάκης, Κ. Καλμπάκης, Σ. Αγγελάκη, Σ. Κακολύρης, Ι. Σουγκλάκος, Ν. Βαρδάκης, **Β. Μποζιονέλου**, Β. Γεωργούλιας.

11<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 1-3 Νοεμβρίου 2002.

**20. Μελέτη της αστάθειας μικροδορυφορικού DNA σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο που έχουν θεραπευθεί με το συνδυασμό Irinotecan (CPT-11), Oxaliplatin (LOHP) και 5-FU/LV (De Gramont regimen)-FOLFOXIRI. Συσχέτιση της αστάθειας αλληλουχίας με κλινικές παραμέτρους και θεραπευτική έκβαση.**

Ζ. Σαριδάκη, Μ. Τζαρδή, Μ. Περράκη, Δ. Μαυρουδής, Ν. Βαρδάκης, Α. Καλυκάκη, Γ. Μηλάκη, Α. Πάλλης, **Β. Μποζιονέλου**, Β. Γεωργούλιας.

Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 21-28 Απριλίου 2004, Αθήνα.

**21. Μοριακή ανίχνευση των HER2 mRNA θετικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού.**

Δ. Μαυρουδής, Μ. Περράκη, Γ. Καλλέργη, Α. Πάλλης, Π. Κανέλλου, Λ. Καλμαντή, Ν. Ξενίδης, **Β. Μποζιονέλου**, Ε. Μανουσάκης, Β. Γεωργούλιας.

2<sup>ο</sup> Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, 17-23 Μαρτίου 2005, Αθήνα.

**22. Μελέτη φάσης I του συνδυασμού Paclitaxel, Oxaliplatin και Capecitabine χορηγούμενα κάθε 2 εβδομάδες σε ασθενείς με εκτεταμένους συμπαγείς όγκους.**

Ζ. Σαριδάκη, **Β. Μποζιονέλου**, Κ. Καλμπάκης, Ν. Βαρδάκης, Α. Κωτσάκης, Λ. Βαμβακάς, Α. Καλυκάκη, Ν. Κεντεποζίδης, Σ. Γιασσάς, Δ. Μαυρουδής, Β. Γεωργούλιας.

3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, 26-29 Απριλίου 2007.

**23. Εφαρμογή του πρωτοκόλλου εκτίμησης της θρέψης MINI NUTRITIONAL ASSESSMENT (MNA) – SCORE σε ηλικιωμένους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Συσχέτιση με κλινικο-εργαστηριακές παραμέτρους.**

Ι. Γκιουλμπασάνης, Λ. Βαμβακάς, Α. Καραμπεάζης, Ε. Σαλούστρος, Ζ. Γιαννούση, **Β. Μποζιονέλου**, Κ. Καλμπάκης, Γ. Μηλάκη, Ι. Σουγκλάκος, Δ. Μαυρουδής.

3<sup>η</sup> Χειμερινή Διημερίδα Ελληνικής Εταιρίας Γηριατρικής Ογκολογίας: «ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗ ΓΗΡΙΑΤΡΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ». 7-8 Δεκεμβρίου 2007, Θεσσαλονίκη.

**24. Πολυδιάστατη γηριατρική αξιολόγηση ηλικιωμένων ασθενών με καρκίνο στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.**

Λ. Βαμβακάς, Α. Καραμπεάζης, Ε. Σαλούστρος, Ι. Γκιουλμπασάνης, Ζ. Γιαννούση, Ν. Βαρδάκης, Γ. Σφακιωτάκη, Γ. Μηλάκη, Κ. Καλμπάκης, **Β. Μποζιονέλου**.

14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 8-14 Μαΐου 2008, Αθήνα.

**25. Το trastuzumab μειώνει την επίπτωση των κλινικών υποτροπών σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού και χημειο-ανθεκτικά CK-19mRNA-θετικά κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα: αποτελέσματα από τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης II. Αναρτημένη ανακοίνωση.**

**Β Μποζιονέλου**, Σ. Αγγελάκη, Μ. Περράκη, Σ. Αποστολάκη, Γ. Καλλέργη, Κ. Καλμπάκης, Α. Ξυραφάς, Δ. Μαυρουδής, Β. Γεωργούλιας.

18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 26-28 Απριλίου 2012, Αθήνα.



## **VIII. Προϋπηρεσία**

Από τον Μάρτιο του 2008 μέχρι τον Σεπτέμβριο του 2010 υπηρέτησα ως Επικουρική ιατρός στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η, ενώ από τον Σεπτέμβριο του 2010 μέχρι και σήμερα υπηρετώ στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική σε θέση Επιμελητή Β΄, συμμετέχοντας πλήρως στις κλινικές και εκπαιδευτικές δραστηριότητες του τμήματος.

## **ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ**

# Clinical Cancer Research



## 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

Vassiliki Bozionellou, Dimitris Mavroudis, Maria Perraki, et al.

*Clin Cancer Res* 2004;10:8185-8194. Published online December 28, 2004.

**Updated Version** Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-03-0094](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0094)

**Cited Articles** This article cites 32 articles, 18 of which you can access for free at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/24/8185.full.html#ref-list-1>

**Citing Articles** This article has been cited by 19 HighWire-hosted articles. Access the articles at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/24/8185.full.html#related-urls>

**E-mail alerts** [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at [permissions@aacr.org](mailto:permissions@aacr.org).

*Featured Article*

# 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

Vassiliki Bozionellou,<sup>1</sup> Dimitris Mavroudis,<sup>1</sup> Maria Perraki,<sup>3</sup> Savvas Papadopoulos,<sup>4</sup> Stella Apostolaki,<sup>3</sup> Efstathios Stathopoulos,<sup>2</sup> Aliko Stathopoulou,<sup>5</sup> Evi Lianidou,<sup>5</sup> and Vassilis Georgoulis<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Medical Oncology, and <sup>2</sup>Pathology, University General Hospital of Heraklion, and <sup>3</sup>Laboratory of Tumor Cell Biology, School of Medicine, University of Crete, Crete; and <sup>4</sup>Department of Pathology, Hygeia Hospital of Athens, and <sup>5</sup>Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece

**ABSTRACT**

**Purpose:** The detection of disseminated occult breast cancer cells in peripheral blood and bone marrow is associated with poor prognosis. Since a high proportion of these cells express the HER-2 receptor, we evaluated the effectiveness of the anti-HER-2 antibody trastuzumab (Herceptin) administration to eliminate them.

**Experimental Design:** Thirty patients with prior chemotherapy exposure were recruited to the study on the basis of having detectable cytokeratin-19 (CK-19) mRNA transcripts by nested reverse transcription (RT)-PCR in the peripheral blood and/or bone marrow. There were 13 patients with stage I, II, or III breast cancer and 17 with stage IV disease. They were treated in two cohorts with either 4 to 8 weekly infusions of trastuzumab at 2 mg/kg (4 mg/kg loading dose; 20 patients) or 2 to 3 infusions every 3 weeks at 6 mg/kg (8 mg/kg loading dose; 10 patients). All of the patients' samples were also analyzed for HER-2 by nested RT-PCR, but detectable HER-2 messenger RNA (mRNA) was not required for inclusion in the study. After trastuzumab infusions, patients were closely monitored by nested

RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection of CK-19 mRNA-positive cells.

**Results:** Before trastuzumab infusions, CK-19 mRNA-positive cells were detected in the peripheral blood ( $n = 10$ ), bone marrow ( $n = 14$ ), or both ( $n = 6$ ). In 25 of 30 patients (83%), HER-2 mRNA expression was detected by nested RT-PCR in the pretrastuzumab CK-19-positive sample. After trastuzumab infusions, overall, 28 of 30 (93%) patients became CK-19 mRNA negative by nested RT-PCR and 20 of 30 (67%) by real-time RT-PCR. After a median follow-up of 6 months (range 2 to 22+), the median duration of CK-19 mRNA negativity by nested RT-PCR was 9, 12, and 6 months for stage I/II, III, and IV disease, respectively.

**Conclusions:** Therapy-resistant CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow can be effectively targeted by trastuzumab administration. Further studies are needed to evaluate the prognostic significance of the disappearance of these cells.

**INTRODUCTION**

The development of metastases is because of the migration of tumor cells from the original tumor to distant organs. This phenomenon probably occurs early during the evolution of the disease and, in some cases, even before the surgical excision of the primary tumor. Many investigators have shown that by using either monoclonal antibodies against molecules expressed on epithelial but not on mesenchymal cells, or molecular biology techniques, occult tumor cells can be detected in the bone marrow and/or the peripheral blood of patients with early and metastatic breast cancer (1–3). Moreover, prospective studies in patients with early stage breast cancer have shown that the detection of disseminated occult tumor cells in the bone marrow or the peripheral blood is an independent adverse prognostic factor associated with decreased disease-free interval and overall survival (4, 5).

In many patients, these disseminated occult tumor cells are not killed by the administration of chemotherapeutic agents, probably because only a minority of these cells are in the proliferation phase of the cell cycle (6). Indeed, most of the cells are dormant, resting in the G<sub>0</sub> phase of the cell cycle, as shown by the absence of Ki-67 positivity (7). However, under certain conditions, these cells can grow and give rise to overt metastases. Although disseminated tumor cells have heterogeneous proliferative potential, their *in vitro* growth characteristics correlate well with prognosis and to a large extent determine the final clinical outcome (8).

The malignant phenotype of these cells is suggested by

Received 8/26/03; revised 7/1/04; accepted 8/16/04.

**Grant support:** The Cretan Association for Biomedical Research. V. Bozionellou and A. Stathopoulou were recipients of a Cretan Association for Biomedical Research fellowship.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**Requests for reprints:** Dimitris Mavroudis, Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, P.O. Box 1352, 71110 Heraklion, Crete, Greece. Phone: 30-2810-392823; Fax: 30-2810-392802; E-mail: mavrudis@med.uoc.gr.

©2004 American Association for Cancer Research.

many lines of evidence. These cells usually harbor multiple chromosomal aberrations characteristic of neoplastic cells and were found to be clonogenic in cell cultures (8, 9). Furthermore, the detection of these cells after the administration of chemotherapy is associated with an increased risk of relapse and reduced survival (10).

Nonetheless, not all of the disseminated occult tumor cells have the same metastatic potential. Being a heterogeneous population, some of these cells exhibit a more aggressive behavior by generating early metastases. The HER-2 receptor, product of the human *erbB2* proto-oncogene, has been proposed as a prognostic marker for the fate of these cells. Although HER-2 is overexpressed in 25 to 30% of the primary breast carcinomas, it is detected in 67.6% of patients with disseminated occult tumor cells in the bone marrow (7). Moreover, Braun *et al.* (11) detected HER-2 expression in 60% of patients with bone marrow micrometastases and independently of HER-2 expression on the primary tumor. In multivariate analysis, the expression of HER-2 on the disseminated occult tumor cells was an independent prognostic factor associated with increased risk of relapse and reduced survival (11). Therefore, the expression of HER-2 receptor could represent a putative marker for the malignant potential of these cells, and at the same time, a suitable target for their elimination.

In this pilot study, we investigated the effectiveness of the recombinant human anti-HER-2 monoclonal antibody (rhuMAB-HER2, trastuzumab, Herceptin) to target the chemoresistant occult tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. For the detection and follow-up of these cells, we used a nested reverse transcription (RT)-PCR and a real-time RT-PCR assay specific for cytokeratin-19 (CK-19) messenger (mRNA). In our previous experience, the nested RT-PCR assay was capable of detecting one tumor cell among one million normal peripheral blood mononuclear cells, and in two large cohorts of patients, positive results obtained before or after chemotherapy had significant prognostic implications (5, 12). Therefore, it was very important to determine if trastuzumab could successfully be used against the CK-19 mRNA-positive cells that escape the cytotoxic effect of standard chemotherapy.

## PATIENTS AND METHODS

**Patient Population.** Eligible patients for this study were women with either locoregional or metastatic breast cancer who tested CK-19 mRNA positive by nested RT-PCR in the peripheral blood and/or the bone marrow after the administration of chemotherapy and/or hormone treatment. Demonstration of HER-2 overexpression or gene amplification in the primary tumor was not required for study entry. All of the patients should have received at least one type of standard chemotherapy, and if eligible, hormonal therapy, before positivity for CK-19 mRNA was determined. No prior trastuzumab therapy was allowed. All of the previous therapies should have been discontinued at least 1 month before study entry. No other concomitant anticancer therapy was allowed after entering the study. Patients with clinically progressive disease requiring prompt administration of other anticancer therapy were excluded from the study. Patients should also have no significant

cardiac history and a normal left ventricular ejection fraction on Technetium-99 multiple gated acquisition scan or echocardiogram. CK-19 mRNA investigations were done in the peripheral blood and bone marrow according to the following schedule: (a) as screening for the detection of resistant tumor cells after completion of standard chemotherapy and hormonal therapy; (b) positive results were confirmed by repeat testing before trastuzumab administration; (c) after trastuzumab infusions to assess the efficacy; and (d) every 3 months thereafter during the follow-up until CK-19 mRNA positivity reappeared. Blood samples (20 mL) in EDTA were obtained at the mid of vein puncture after the first 5 mL of blood were discarded. This precaution was undertaken to avoid contamination of blood with epidermal (epithelial) cells during sample collection. Bone marrow (4 mL) in EDTA was aspirated from the posterior iliac crest, under local anesthesia. All of the blood sample collections, bone marrow aspirations, and antibody infusions were done at the Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion (Crete, Greece). All of the patients including those who received immunoglobulin IgG gave their written informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics and Scientific Committees of our Institution.

**Treatment.** Two different and clinically relevant administration schedules of trastuzumab (Herceptin, Roche, Basel, Switzerland) were investigated. The first 20 eligible patients received trastuzumab *i.v.* at a loading dose of 4 mg/kg of body weight followed by 2 mg/kg once a week for 4 to 8 consecutive weeks. The antibody infusion was prepared in sterile glass bottles containing 250 mL of 0.9% NaCl and infused over a time period of 30 minutes. Patients were evaluated by nested RT-PCR after 4 weekly trastuzumab infusions. If no CK-19 mRNA signal was detectable in both peripheral blood and bone marrow, the trastuzumab administration was stopped. If the CK-19 mRNA signal was still present in either the peripheral blood or bone marrow, trastuzumab was given for an additional 4 weeks, and then repeat testing by RT-PCR was done. If still positive, no additional treatment was given. A second cohort of 10 eligible patients received trastuzumab *i.v.* at a loading dose of 8 mg/kg of body weight followed by 6 mg/kg administered every 3 weeks for 2 to 3 times. If after the first two infusions the patient tested negative for CK-19 mRNA in both peripheral blood and bone marrow, then trastuzumab administration was stopped. If either peripheral blood or bone marrow were still positive for CK-19 mRNA, one more trastuzumab infusion at 6 mg/kg was given, and then repeat testing by RT-PCR was done. If still positive, no additional treatment was administered. To assess the possibility of a nonspecific effect from the antibody administration, in a control group of 5 CK-19 mRNA-positive patients who fulfilled all of the predefined eligibility criteria of the study, treatment consisted of immunoglobulin IgG (Sandoglobulin, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) administered *i.v.* at the dose of 500 mg/kg given once at the recommended infusion rate. In those patients, repeat testing by RT-PCR for CK-19 mRNA was done 1 week after the immunoglobulin infusion.

**Follow-up.** To assess the efficacy of this approach, we monitored the detection of disseminated tumor cells by RT-PCR for CK-19 mRNA in the follow-up peripheral blood and bone marrow samples every 3 months after the completion of trastu-

Table 1 Oligonucleotide primers for HER-2 PCR

PCR	Primer	Sequence 5'–3'*	Product (bp)
1st	Sense (Her-2-A)	5'TCC TCC TCG CCCTCTGC 3'	330
	Antisense (Her-2-B)	5'GCGGGTCTCCATTGTCTA 3'	
2nd	Sense (Her-2-C)	5'AGCCGCGAGCACCCAAGT 3'	147
	Antisense (Her-2-D)	5'ACCTGCTGAACTGGTGTATGCA 3'	

\* GenBank accession no. M11730.

zumab administration. The duration of CK-19 negativity was measured from the time that the first CK-19 mRNA-negative results were obtained in both the peripheral blood and bone marrow, after the completion of trastuzumab therapy, until the first CK-19 mRNA-positive results were detected again in either the peripheral blood and/or bone marrow or until death. All of the patients were closely monitored for possible toxicities throughout the study. Especially cardiotoxicity was evaluated by repeating the assessment of left ventricular ejection fraction on MUGA scan or echocardiogram after the completion of trastuzumab infusions.

**Sample Preparation.** The procedure for the separation of peripheral blood mononuclear cells from peripheral blood and bone marrow samples as well as the RNA extraction was done exactly as described previously (5, 12). All of the preparations and handling steps of RNA took place in a laminar flow hood, under RNase-free conditions. The isolated RNA was dissolved in diethyl pyrocarbonate-treated water and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. RNA integrity was tested by PCR amplification of the  $\beta$ -actin housekeeping gene. Only samples with  $\beta$ -actin expression were additionally tested to avoid false negative results. As positive and negative controls for CK-19 mRNA expression, RNA samples were also prepared from the breast carcinoma cell line MCF-7 and the plasmacytoma cell line ARH-77, respectively.

**Reverse Transcription-PCR for Cytokeratin-19.** RT of RNA was carried out as described previously (5, 12). Two different PCR reactions, with the respective negative controls, were done with each sample to amplify fragments of CK-19 and  $\beta$ -actin. The sequences of primers used for CK-19 and  $\beta$ -actin as well as the PCR conditions were exactly the same as in our previous publications (5, 12). The corresponding sizes of PCR products were 745 bp for CK-19 and 154 bp for  $\beta$ -actin. The primers extend across at least an intron, thus an eventual DNA contamination would not pose a significant problem. All of the RT-PCR results were confirmed as positive or negative by repeating the assay three times for each individual sample. On repeat testing the results of the RT-PCR assay were highly reproducible. The sensitivity of CK-19 mRNA detection by nested RT-PCR was evaluated in a previous study and was found that this assay was capable of consistently detecting 1 MCF-7 cell among  $10^6$  normal hematopoietic cells (5). In the same study, the specificity of the detection was evaluated with peripheral blood mononuclear cells from 54 healthy female blood donors and was found that only 2 (3.7%) samples were positive, whereas 52 (96.3%) samples were negative (5).

**Reverse Transcription-PCR for HER-2.** The expression of HER-2 mRNA in the CK-19-positive samples before trastuzumab administration was investigated by doing nested

RT-PCR. The cDNA was synthesized from 5  $\mu\text{g}$  total RNA with the ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen Ltd., Paisley, United Kingdom). To amplify cDNA, 5  $\mu\text{L}$  were subjected to first PCR in 50  $\mu\text{L}$  of PCR buffer [10 mmol/L of HCL, buffer (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, and 2.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ] containing 1 mmol/L deoxynucleotide triphosphate, 0.5 mmol/L of primers (Her-2A and Her-2B), and 2.5 units platinum TaqDNA polymerase (Invitrogen). For the second round of amplification (nested PCR), a 2- $\mu\text{L}$  aliquot of the first PCR product was added to the same PCR buffer with 1 mmol/L deoxynucleotide triphosphate, 0.5 mmol/L of primers (Her-2C and Her-2D), and 2.5 units platinum TaqDNA polymerase. The primer sequences and the PCR protocols for the first and nested PCR are presented in Tables 1 and 2, respectively. The nested PCR was done with a modified touchdown program as described previously (13). All of the PCR products were resolved by agarose 2% gel stained with ethidium bromide and photographed under UV conditions. To determine the sensitivity of the assay, total RNA decreasing dilutions of MCF7 and T47D HER-2-positive breast carcinoma cell lines were tested. In these experiments, the nested RT-PCR assay was consistently capable of detecting the HER-2 mRNA signal of 10 or more MCF7 or T47D cells, although the dilution of one cell was detected in only 1 of 5 experiments (Fig. 1).

**Real-time Reverse Transcription-PCR for Cytokeratin-19 mRNA.** In addition to the nested RT-PCR, the CK-19 mRNA signal was investigated by quantitative real-time RT-PCR with the LightCycler system (Roche Diagnostics) as de-

Table 2 PCR protocols for HER-2

PCR step	HER-2 1st PCR	No of cycles	HER-2 2nd PCR	No of cycles
Denaturation	6 min/94°C	1	3 min/94°C	1
	50 s/94°C	1	30 s/94°C	5
Amplification		35	30 s/72°C	5
			30 s/94°C	
			30 s/70°C	
			30 s/72°C	
			30 s/94°C	
			30 s/68°C	
			30 s/72°C	
			30 s/94°C	
			30 s/66°C	
			30 s/72°C	
			30 s/94°C	
			30 s/64°C	
	30 s/72°C			
	30 s/94°C			
	30 s/62°C			
	30 s/72°C			
Final extension	10 min/72°C	1	7 min/72°C	1



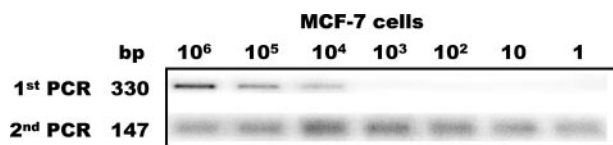


Fig. 1 Nested RT-PCR of total RNA decreasing dilutions of the MCF-7 breast carcinoma cell line showing amplification of the HER-2 mRNA signal in the second PCR down to the dilution of one tumor cell (1 of 5 experiments).

scribed previously (14). The primers and the hybridization probes used for CK-19 were designed and synthesized by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany; ref. 14). To ensure that amplifiable material was present in all of the specimens, and to avoid false negative results, real-time amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and porphobilinogen deaminase housekeeping genes was done for all of the samples (14). Real-time PCR was done in a total volume of 20  $\mu$ L in the LightCycler glass capillaries. For the PCR, 2  $\mu$ L of cDNA were placed into a 18- $\mu$ L reaction volume containing 1  $\mu$ L of the sense primer CK19-for (3  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L of the antisense primer CK19-do (3  $\mu$ mol/L), 2.4  $\mu$ L of the LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes reagent (10 $\times$  concentration), 1  $\mu$ L of the probe CK19-FL (3  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L of the probe CK19-LC (3  $\mu$ mol/L), and diethyl pyrocarbonate-H<sub>2</sub>O was added to the final volume. PCR reaction was initiated with a 10-minute denaturation at 95°C and terminated with a 30-second cooling step at 40°C. The cycling protocol consisted of denaturation step at 95°C for 10 seconds, annealing at 60°C for 10 seconds, and extension at 72°C for 20 seconds and repeated for 50 times. Fluorescence detection was done at the end of each annealing step for 0 seconds.

For quantification, an external calibration curve was obtained by using external standard cDNAs. Total RNA was prepared from 1  $\times$  10<sup>6</sup> MCF-7 cells (as verified by a hemocytometer). Serial dilutions of this RNA preparation in diethyl pyrocarbonate-treated water, corresponding to 1 to 10,000 MCF-7 cells, were used for cDNA synthesis. These cDNAs were kept in aliquots at -20°C and used throughout the study as external standards. This calibration curve was created by plotting the number of MCF-7 cells corresponding to each external standard cDNA *versus* the value of its crossing point. The number of circulating CK-19 mRNA-positive cells for all of the tested samples was expressed as MCF-7 cell equivalents/5  $\mu$ g of total-RNA, as determined by LightCycler software 3.1, according to the external standard calibration curve.

**Fluorescence *In situ* Hybridization for HER-2 and Aneusomy.** Mononuclear cells were separated by density centrifugation of peripheral blood and bone marrow samples through Ficoll-Hypaque, and cytopspins were prepared (5  $\times$  10<sup>5</sup> mononuclear cells/slide) and stored at -70°C until used. Then frozen slides were left at room temperature for 15 minutes, immersed in 70% acetic acid for 30 seconds, washed and dehydrated in ETOH, immersed in cold acetone for 2 minutes, and air dried. Thereafter, they were placed in 2 $\times$  SSC solution (pH 5.3) for 2 minutes at 73°C. Proteolysis with pepsin was done for 5 minutes at 37°C, and then slides were placed in 2 $\times$  SSC solution for 1 minute at room temperature with post fixation in

formalin buffer solution for 5 minutes and in 2 $\times$  SSC for 1 minute at room temperature and dehydrated in ETOH. For hybridization, the PathVysion HER-2 DNA probe and Breast Aneusomy probe set (Vysis, Downers Grove, IL) were used at 85°C for 2 minutes and overnight at 37°C. The next morning slides were placed in the posthybridization wash buffer for 2 minutes at 72°C, 10  $\mu$ L of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were added, and the covered slides were stored at -20°C.

The microscopic examination was done with an Axioplane 2 Nikon microscope with Vysis filters, and the images were processed with the Metasystems' ISIS fluorescence *in situ* hybridization (FISH) imaging system (Altlusheim, Germany). For HER-2/neu probe, we used single-band filters for orange, green, and DAPI and for Breast Aneusomy probe set single band filters for red, gold, green, aqua, and DAPI. We considered FISH HER-2/neu positive the cells with >4 orange signals or a ratio of HER-2/neu orange signals to CEP17 green signals  $\geq$ 2 in cases of aneuploidy. In a normal diploid cell, there are two copies of each of the following: LSI 1 (two gold signals), CEP 8 (two red signals), CEP 11 (two green signals), and CEP 17 (two aqua signals). Copy numbers of more or less than two signals of any probe indicates chromosome gain or loss, respectively.

**Immunohistochemistry for HER-2 Overexpression in the Primary Tumor.** Immunohistochemistry with the monoclonal antibody CB11 (NCL-CB11, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), at a dilution of 1 of 50 with incubation period of 60 minutes, was done with the OPTIMAX automated system (with the Super Sensitive Link-Label Detection System RTU Multilink AP/Fast Red, QA2000XE purchased from BioGenex Laboratories, San Ramon, CA), after antigen retrieval by microwave pretreatment at 500 watts for 3  $\times$  5 minutes in citrate buffer (0.01 mol/L, pH 6). Scoring was based on the criteria recommended by DAKO A/S for the HercepTest (DAKO A/S, Glostrup, Denmark). Only membrane staining intensity and pattern was scored with the 0 to 3+ scale: scores of 0 to 1+ were considered negative, score 2+ was considered weak positive, and score 3+ was considered (strongly) positive.

## RESULTS

**Patient Characteristics.** Between March 2001 and November 2002 we screened 115 breast cancer patients (42 with stage I/II, 18 with stage III, and 55 with stage IV disease) to enroll 30 patients and five controls in this study. Table 3 shows the pretreatment patient characteristics. The median age was 53 years, and 13 (43%) patients were premenopausal. Seventeen (57%) patients had metastatic disease, 4 (13%) patients had stage III, and 9 patients had (30%) stage I to II. Eleven (37%) patients had primary tumors lacking estrogen and progesterone receptor expression, although HER-2 overexpression (2+ or 3+) on the primary tumor was present in 10 (33%) patients. Prior treatment included neoadjuvant and/or adjuvant chemotherapy and hormonal therapy for the 13 patients with nonmetastatic disease; most patients with metastases had already received multiple chemotherapy regimens. The median number of prior chemotherapy regimens for the entire group was 1 (range

Table 3 Patient characteristics

Number of patients	30
Age, median (range)	53 (31–75)
Menopausal status	
Premenopausal	13 (43%)
Postmenopausal	17 (57%)
Disease stage	
I	3 (10%)
II	6 (20%)
III	4 (13%)
IV	17 (57%)
Hormone receptor expression of primary tumor	
ER+PR+	6 (20%)
ER+PR–	7 (23%)
ER–PR+	4 (13%)
ER–PR–	11 (37%)
Unknown	2 (7%)
HER-2 expression of primary tumor	
3+	6 (20%)
2+	4 (13%)
1+	5 (17%)
0	14 (47%)
Unknown	1 (3%)
Prior treatment	
Surgery	30 (100%)
Radiation	18 (60%)
Hormonal therapy	12 (40%)
Chemotherapy	30 (100%)
adjuvant	22 (73%)
neoadjuvant	7 (23%)
1st line metastatic	17 (57%)
≥2nd line metastatic	10 (33%)

1 to 4). No patient had previously received trastuzumab treatment. Table 4 shows the disease stage at study enrollment and time elapsed from prior systemic therapies for 30 patients treated with trastuzumab infusions and 5 “control” patients treated with immunoglobulin IgG. All of the patients had CK-19 mRNA-positive cells detected by nested RT-PCR in the peripheral blood and/or bone marrow after the completion of chemotherapy and/or hormonal therapy and before study entry. In 25 of 30 patients (83%), HER-2 mRNA expression was detected by nested RT-PCR in the pretrastuzumab treatment CK-19–positive peripheral blood and/or bone marrow sample. In 5 of those patients for whom mononuclear cells cytopins on slides had been prepared from the pretrastuzumab treatment CK-19–positive peripheral blood and/or bone marrow sample, we found cells presenting FISH amplification of the HER-2/neu gene with >10 signals and a HER-2/neu to CEP17 ratio >4 in all of the five cases and aneusomy cells as detected by LSI 1, CEP 8, CEP 11, and CEP 17 with chromosomal gain or loss in two of the cases (Fig. 2).

**Response to Trastuzumab Administration by Nested Reverse Transcription-PCR for Cytokeratin-19 mRNA.** The first 20 patients received trastuzumab 2 mg/kg weekly for 4 to 8 consecutive weeks. As shown in Table 5, before trastuzumab treatment, 12 (60%) patients had CK-19 mRNA detected only in the bone marrow, 2 (10%) only in the peripheral blood, and 5 (25%) both in peripheral blood and bone marrow. In 1 patient (number 19), only peripheral blood CK-19 mRNA was done, which was positive. After 4 weekly trastuzumab infusions, 15 (75%) patients had become negative for the CK-19 mRNA

transcripts and discontinued additional treatment. The other 5 patients who remained CK-19 mRNA positive received 4 additional weekly trastuzumab infusions (total of 8 weeks), after which all but 1 patient became negative for CK-19 mRNA. So overall, after 4 or 8 weekly infusions, 19 of 20 (95%) patients had turned CK-19 mRNA negative, and only 1 (5%) patient remained positive despite trastuzumab administration (patient number 4 on Table 5).

The next 10 patients received trastuzumab 6 mg/kg every 3 weeks for 6 to 9 consecutive weeks. As shown in Table 5, before treatment, 2 (20%) patients had CK-19 mRNA detected only in the bone marrow, 1 (10%) in both peripheral blood and bone marrow, and for the remaining 7 (70%) patients, only the peripheral blood was tested, and it was positive. After 6 weeks (2 trastuzumab infusions), 6 (60%) patients had become negative for CK-19 mRNA transcripts, and additional treatment was discontinued. The other 4 patients who remained CK-19 mRNA positive received one additional trastuzumab infusion (total of 9 weeks), after which all but 1 patient became negative for CK-19 mRNA. So overall, 9 of 10 (90%) patients had turned CK-19 mRNA negative with 2 to 3 trastuzumab infusions given every 3 weeks. Only 1 (10%) patient remained positive (patient number 13 on Table 5).

After a median follow-up of 6 (range 2 to 22+) months, the median duration of CK-19 mRNA negativity for the whole group of 30 patients was 6 months (range 0 to 21+), and 13 (43%) patients had become CK-19 mRNA positive. The median duration of CK-19 mRNA negativity according to the stage of disease at study entry was as follows: 9 months (range 9 to 18) for stage I, 9 months (range 3 to 9+) for stage II, 12 months (range 3 to 21+) for stage III, and 6 months (range 3 to 15+) for stage IV [ $P = 0.07$  for the comparison of stage IV (metastatic) versus stage I to III (nonmetastatic) by the log-rank test]. Two patients were retreated with trastuzumab when they became CK-19 mRNA positive, and both turned negative again after 4 weekly infusions of 2 mg/kg. At this time, 18 of 30 (60%) patients have discontinued follow-up because of the following reasons: no response to trastuzumab ( $n = 2$ ); reappearance of CK-19 mRNA-positive cells ( $n = 13$ ); and disease progression and death without detectable CK-19 mRNA ( $n = 3$ ). Twelve patients are still CK-19 mRNA negative on follow-up.

**Response to Trastuzumab Administration by Real-Time Reverse Transcription-PCR for Cytokeratin-19 mRNA.** To verify the absence of CK-19 mRNA transcripts, all of the post-trastuzumab treatment peripheral blood and bone marrow samples were also analyzed by real-time RT-PCR, and 10 of 30 (33%) patients had detectable CK-19 mRNA. More specifically, for 20 patients, both the nested and the real-time RT-PCR of the post-trastuzumab samples were negative, for 2 patients both were positive, and for 8 patients the real-time RT-PCR was positive, whereas the nested RT-PCR was negative; the concordance rate for positivity and negativity was 73.3% (22 of 30 patients). The discordant results were obtained in bone marrow samples ( $n = 4$ ), peripheral blood samples ( $n = 2$ ), or both ( $n = 2$ ). All of these patients in whom discordant results were obtained with the two methods had metastatic disease at study entry. The positive samples contained a mean of 3.15 (range 0.6 to 14.3) MCF-7 cell equivalents/5  $\mu$ g of total-



Table 4 Disease stage at study enrollment and prior treatment of 30 patients treated with trastuzumab infusions and 5 control patients treated with immunoglobulin IgG

Patient number	Disease stage at study enrollment	Number of prior chemotherapy regimens	Number of prior hormonal therapies	Patient enrollment on the study and time elapsed from previous systemic therapy
1	I	1	1	After adjuvant hormonal therapy
2	I	1	1	After adjuvant hormonal therapy
3	I	1	1	After adjuvant hormonal therapy
4	IIA	1	1	After adjuvant hormonal therapy
5	IIA	1	1	After adjuvant hormonal therapy
6	IIA	1	1	After adjuvant hormonal therapy
7	IIA	1	1	After adjuvant hormonal therapy
8	IIB	1	1	After adjuvant hormonal therapy
9	IIB	1	1	After adjuvant hormonal therapy
10	IIB	1	1	After adjuvant hormonal therapy
11	IIIA	1	1	After adjuvant hormonal therapy
12	IIIB	1	1	After hormonal therapy
13	IIIB	1	1	After hormonal therapy
14	IIIB	1	1	After hormonal therapy
15	IV	3	2	After 2nd line hormonal therapy
16	IV	2	1	3 mo from 2nd line chemotherapy
17	IV	4	3	After 4th line chemotherapy
18	IV	2	2	After 2nd line hormonal therapy
19	IV	2	2	After 2nd line hormonal therapy
20	IV	1	1	2 mo from 1st line hormonal therapy
21	IV	2	2	2 mo from 2nd line chemotherapy
22	IV	1	1	After 1st line hormonal therapy
23	IV	3	2	After 2nd line hormonal therapy
24	IV	2	2	After 2nd line hormonal therapy
25	IV	3	2	After 3rd line chemotherapy
26	IV	2		After 2nd line chemotherapy
27	IV	2		3 mo from 2nd line chemotherapy
28	IV	3	1	After 1st line hormonal therapy
29	IV	1	1	After 1st line hormonal therapy
30	IV	2		5 mo from 2nd line chemotherapy
31	IV	2		1 mo from 2nd line chemotherapy
32	IV	1		After 1st line chemotherapy
33	IV	1	2	6 mo from 2nd line hormonal therapy
34	IV	2	1	3 mo from 2nd line chemotherapy
35	IV	1	2	After 2nd line hormonal therapy

RNA. For 16 patients who had both pre- and post-trastuzumab treatment peripheral blood or bone marrow samples analyzed by real-time RT-PCR for CK-19 mRNA, there was a reduction in the mean number of MCF-7 cell equivalents/5  $\mu$ g of total-RNA from 3.84 (pretrastuzumab) to 0.36 (post-trastuzumab; Wilcoxon paired *t* test,  $P < 0.001$ ; Fig. 3).

**Trastuzumab Toxicity.** Trastuzumab-related toxicity consisted primarily of a mild allergic reaction during the infusion with low grade fever and chills in 8 (27%) patients. All of the patients were able to complete the scheduled treatments. No hematologic or biochemical toxicity was observed. In no patient was the post-treatment left ventricular ejection fraction decreased by >10% of baseline value, and no one developed symptomatic congestive heart failure.

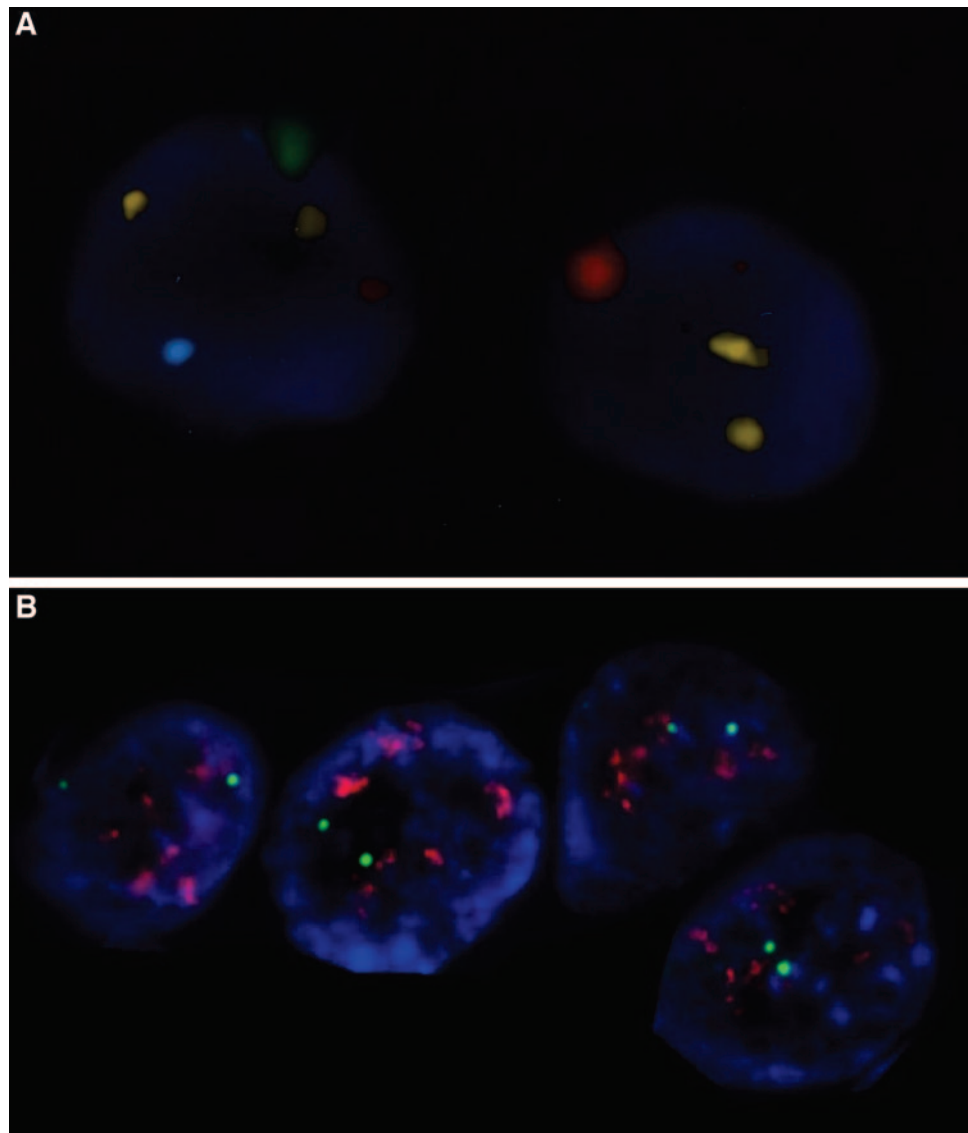
**Immunoglobulin Administration.** To investigate the possibility of a nonspecific effect of trastuzumab infusions on the elimination of CK-19 mRNA-positive cells, we administered immunoglobulin IgG (Sandoglobulin) 500 mg/kg i.v. to 5 patients who fulfilled all of the eligibility criteria for this study (all of the patients were CK-19 mRNA positive in the peripheral blood despite prior chemotherapy). The disease stage at study enrollment and prior treatments received for these 5 patients are

shown in Table 4 (patient numbers 7, 32 to 35). None of these patients became CK-19 mRNA negative after the immunoglobulin administration.

## DISCUSSION

In this pilot study, we used the anti-HER-2 monoclonal antibody trastuzumab to target the chemotherapy-resistant CK-19 mRNA-positive breast cancer cells in the peripheral blood and bone marrow. Our group, as well as other investigators, has previously used the detection of CK-19 mRNA as a marker for the presence of breast cancer cells in the peripheral blood and bone marrow (15–17, reviewed in 18). Although the CK-19 mRNA is not an ideal marker for breast cancer cell detection, mainly because of a low rate of false positives in normal females and patients with hematologic malignancies (5), it is the most sensitive assay with good specificity under optimized conditions (19). The malignant nature of cytokeratin-positive cells has been shown with genomic analysis and specialized cell culture assays (8, 9, 20, 21). In this study, we were able to cross-validate in a limited number of patients the malignant nature of these cytokeratin-positive cells by doing FISH

**Fig. 2** *A.* Four breast cancer cells with HER-2/neu amplification ( $>10$  orange signals per cell) in a FISH preparation with PathVysion HER-2 DNA probe. *B.* Two breast cancer cells with aneusomy in chromosomes 8 (red signal), 11 (green signal), and 17 (aqua signal) in a FISH preparation with Breast Aneusomy probe set from Vysis.



analysis for HER-2/neu gene amplification and aneusomy detection for chromosomes 1, 8, 11, and 17. Other investigators have also used FISH analysis for these markers to detect breast cancer cells in cytological specimens (22–24). Furthermore, in a previous study we have shown that in patients with early breast cancer, the detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood before the administration of adjuvant chemotherapy was an independent prognostic marker of reduced disease-free interval ( $P = 0.0007$ ) and overall survival ( $P = 0.01$ ; ref. 5). We as well as other investigators have reported that chemotherapy might fail to eliminate occult tumor cells in up to 50% of breast cancer patients, and that the persistence of these chemotherapy-resistant cells could have adverse prognostic implications (12, 25, 26). Therefore, it is important to determine if novel biological agents can be used effectively to target these chemoresistant cells.

HER-2 is a member of a family of receptors that interact

with each other and various ligands to stimulate mitogenic signal transduction pathways leading to increased cell proliferation (27). This perhaps explains why HER-2 overexpression is an indicator of poor prognosis in breast tumors (28). On the contrary, HER-2 overexpression is predictive of response to trastuzumab therapy (29). Taking advantage of the reported high expression of HER-2 on micrometastatic breast cancer cells (7, 11), we used the humanized anti-HER-2 monoclonal antibody trastuzumab to target the disseminated CK-19 mRNA-positive cells. This is the first study to show that a short course of trastuzumab infusions can very effectively reduce to undetectable levels the chemotherapy-resistant disseminated tumor cells in the blood and bone marrow of breast cancer patients.

For this study, we selected the patients only on the basis of having detectable CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and/or bone marrow after the administration of chemotherapy. Most patients with metastatic disease had previously

Table 5 Results of CK-19 mRNA detection by nested RT-PCR for the 30 patients treated with trastuzumab and the 5 control patients

Patient number	Tumor HER-2 status	HER-2 mRNA expression on pretreatment		Type of treatment	CK-19 mRNA Before treatment (BM/PB)	CK-19 mRNA after treatment (BM/PB)		Follow-up post-trastuzumab treatment (BM/PB)							Duration of CK-19 mRNA negativity (mo)
		CK-19-positive sample	sample			4-6 wks	8-9 wks	3 mo	6 mo	9 mo	12 mo	15 mo	18 mo	21 mo	
1	0	+	+	weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nd/+	18	
2	0	+	+	3-weekly	nd/+	nd/+	nd/-	nd/-	nd/-	nd/-				9 <sup>+</sup>	
3	0	-	-	3-weekly	nd/+	nd/-	+/-	nd/+						9	
4	+1	+	+	weekly	+/-	+/-								0	
5	0	+	+	weekly	nd/+	nd/-		nd/+						3	
6	0	+	+	3-weekly	nd/+	nd/-		nd/-	nd/-	nd/-				9 <sup>+</sup>	
7	+2	nd	nd	control	nd/+	nd/+									
8	+1	+	+	weekly	+/+	+/-		nd/+						3	
9	0	+	+	3-weekly	nd/+	nd/-		nd/-	nd/-	nd/-				9 <sup>+</sup>	
10	0	+	+	3-weekly	nd/+	nd/-		nd/-	-/-	-/-				9 <sup>+</sup>	
11	+3	+	+	weekly	+/-	+/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	21 <sup>+</sup>	
12	+3	-	-	weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-			12 <sup>+</sup>	
13	+1	-	-	3-weekly	+/-	+/+	+/+							0	
14	0	+	+	3-weekly	nd/+	nd/+	nd/-	nd/-						3 <sup>+</sup>	
15	+3	+	+	weekly	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+				9	
16	+3	+	+	weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	+/+		15	
17	0	+	+	weekly	+/+	-/-	-/-	+/-						3	
18	+2	+	+	weekly	+/+	+/-		-/-	dead					3	
19	+2	+	+	weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	+/+		15	
20	+2	+	+	weekly	+/+	-/-		+/+						3	
21	0	+	+	weekly	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		15 <sup>+</sup>	
22	+3	+	+	weekly	-/+	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	+/+		15	
23	+2	+	+	weekly	+/+	-/-		-/-	dead					3	
24	0	-	-	weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		15 <sup>+</sup>	
25	0	+	+	weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	dead				6	
26	+1	+	+	weekly	+/-	-/-		+/-						3	
27	0	+	+	weekly	-/+	-/-		nd/+						3	
28	UK	+	+	weekly	+/-	-/-		+/+						3	
29	+1	+	+	3-weekly	+/-	-/-		-/-	-/-	-/-				9 <sup>+</sup>	
30	0	-	-	3-weekly	nd/+	nd/+	nd/-	nd/-	nd/-					6 <sup>+</sup>	
31	+3	+	+	3-weekly	+/+	-/-		-/-						3 <sup>+</sup>	
32	+3	nd	nd	Control	nd/+	nd/+									
33	0	nd	nd	Control	nd/+	nd/+									
34	+1	nd	nd	Control	nd/+	nd/+									
35	+1	nd	nd	Control	nd/+	nd/+									

Abbreviations: BM, bone marrow; PB, peripheral blood; nd, not done; UK, unknown.

failed multiple different chemotherapy regimens, although patients with hormone-receptor positive tumors had also received hormonal treatment. Patients with operable breast cancer had completed the administration of adjuvant chemotherapy and those with hormone-receptor positive tumors had also received adjuvant hormonal therapy. So the detected CK-19 mRNA-positive cells were truly resistant to "standard" therapies. We did not select our patients based on HER-2 overexpression in the primary tumor, because HER-2 overexpression in the micrometastatic cells is much more common and has been reported at two-fold the frequency of detection than in the primary tumors (7, 11). Furthermore, extrapolation for HER-2 positivity of the micrometastatic cells from the detection on the primary tumor has been shown to be unreliable (11). Nevertheless, in 28 of 30 (93%) patients, the CK-19 mRNA signal as measured by nested RT-PCR disappeared after 4 to 8 weekly or 2 to 3 3-weekly infusions of trastuzumab, indicating that CK-19 mRNA-positive cells were susceptible to trastuzumab therapy most likely because of HER-2 receptor expression. We retrospectively analyzed HER-2 mRNA expression in the pretrastuzumab CK-19-

positive peripheral blood and bone marrow samples by RT-PCR, and we found them positive in 25 of 30 patients (83%). Furthermore, in 5 patients for whom pretreatment peripheral blood or bone marrow mononuclear cells cytopspins were available (cytopspins not available for the remaining 25 patients), we found cells with FISH amplification of the HER-2/neu gene in all of the cases. These samples confirmed by FISH to have cells with HER-2/neu gene amplification also tested positive for HER-2 mRNA expression. This frequency of HER-2 expression in the micrometastatic cells is higher than the 60 to 67% reported in the literature with an immunohistochemical method (7, 11). As the elimination rate of the CK-19 mRNA signal by nested RT-PCR exceeds that of HER-2 mRNA expression in the pretrastuzumab samples, it is possible that HER-2 expression was below the detection limit of the RT-PCR assay in some patients with a low number of CK-19-positive cells. Indeed, in the decreasing dilution experiments with MCF-7 cells, the nested RT-PCR for HER-2 mRNA reliably detected the signal of 10 or more tumor cells.

Furthermore, the results of the quantitative real-time RT-

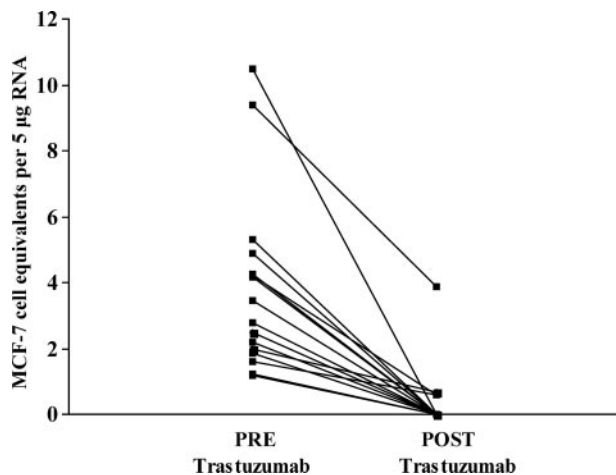


Fig. 3 Pre- and post-trastuzumab CK-19 mRNA detection by real-time RT-PCR in peripheral blood or bone marrow of 16 patients with breast cancer (Wilcoxon paired *t* test,  $P < 0.001$ ). Quantitative results are expressed as MCF-7 cell equivalents/5  $\mu$ g RNA.

PCR assay confirmed those of nested RT-PCR, because no CK-19 mRNA transcripts were detectable in 20 of 30 patients (67%) after the trastuzumab infusions. This quantitative RT-PCR assay for CK-19 mRNA detection with the LightCycler system has been developed and compared with nested RT-PCR in a many samples with a good concordance in respect to positivity and negativity (14). Interestingly, in 16 patients who had both pre- and post-trastuzumab treatment peripheral blood or bone marrow samples available for analysis by real-time RT-PCR for CK-19 mRNA, there was a 10-fold (1 log) reduction in the mean number of circulating tumor cells. Therefore, our results on the efficacy of trastuzumab should be interpreted with caution, because the lack of detection of the CK-19 mRNA signal after the infusions might represent a reduction of circulating tumor cells below the detection limit of the assay and not necessarily the elimination of all of the tumor cells.

To investigate the possibility of a nonspecific cytotoxic effect of trastuzumab, we administered immunoglobulin IgG to a control group of 5 CK-19 mRNA-positive patients who fulfilled all of the eligibility criteria of the study and according to their characteristics were no different from the study population, and none of them turned negative with the immunoglobulin infusions. Moreover, to exclude an interference in the RT-PCR assay by the presence of trastuzumab in the samples we exposed dilutions of MCF-7 cells to increasing concentrations of trastuzumab (at 2, 100, and 200 nmol/L) for 24 to 48 hours. CK-19 mRNA transcripts were still detectable by the nested RT-PCR assay down to the dilution of 1 MCF-7 cell among  $10^6$  normal hematopoietic cells (data not shown).

With close monitoring by RT-PCR of the peripheral blood and bone marrow during the follow-up, we observed that the disappearance of CK-19 mRNA signal was not short-lived as it lasted for several months even in patients with metastatic disease. This is especially important because overt metastases could easily "seed" the circulating blood with new tumor cells. Perhaps this lasting effect is because of the long half-life of

trastuzumab in the body, which is estimated to be several months after multiple infusions (30). Interestingly, trastuzumab was still effective in 2 patients who were retreated when the CK-19 mRNA signal reappeared during the follow-up. Therefore, it might be possible with repeated trastuzumab administrations, given either periodically or on demand when the RT-PCR assay becomes positive, to prolong the time that circulating CK-19 mRNA-positive cells are not detectable.

Whereas the efficacy of trastuzumab in HER-2 overexpressing breast tumors is proven (29, 31), so is the risk of cardiac toxicity estimated to be 3 to 7% when trastuzumab monotherapy is used (32). In our study, we observed no cardiac or other significant toxicity with the short courses of trastuzumab except of the well-described hypersensitivity reaction, which occurs during the infusion. Considering the observed high efficacy of trastuzumab in reducing to undetectable levels the chemoresistant occult tumor cells in peripheral blood and bone marrow, our results additionally strengthen the rationale for using trastuzumab in the adjuvant treatment of breast cancer. However, the efficacy and safety of administering trastuzumab in the adjuvant setting is still under clinical investigation (33). Moreover, the prognostic significance of the disappearance of these occult tumor cells in terms of reduction in the risk of relapse and death remains to be proven.

Other investigators have also used monoclonal antibody-based treatments to target the disseminated occult tumor cells with variable success. Schlimok *et al.* (34) used a monoclonal Lewis Y antibody, and observed eradication or significant reduction of CK-positive/Lewis Y-positive cells, in 5 of 10 breast cancer patients presenting with micrometastatic tumor cells in the bone marrow. Braun *et al.* (35) used the murine monoclonal antibody 17-1A (Edrecolomab) directed against the epithelial adhesion molecule EpCAM and showed a marked reduction, and in 4 cases complete elimination, of EpCAM<sup>+</sup>/CK<sup>+</sup> cells from the bone marrow of 10 patients with advanced breast cancer. More recently, Kirchner *et al.* (36) used the same monoclonal antibody (Edrecolomab) in nine patients with early breast cancer, who had bone marrow micrometastases after adjuvant chemotherapy, and observed complete elimination in seven and significant reduction in the remaining 2 patients.

Considering that HER-2 overexpression in the primary tumor (28) or the micrometastatic tumor cells (11) is a poor prognostic marker, our approach of targeting HER-2-positive tumor cells has the comparative advantage, over other antibody-based treatments, of aiming at the elimination of malignant cells with an aggressive biological phenotype. However, until a meaningful clinical benefit from the disappearance of these cells is clearly shown, this experimental approach cannot be recommended. Future studies will need to evaluate the immunophenotypic and genomic characteristics of disseminated occult tumor cells as well as the potential clinical benefit from their elimination.

## REFERENCES

- Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991;9:1749-56.
- 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;33:854-61.
3. Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:870-9.
  4. 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;342:525-33.
  5. 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;20:3404-12.
  6. Braun S, Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:75-90.
  7. Pantel K, Schlimok G, Braun S, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 1993;85:1419-24.
  8. Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2246-51.
  9. Muller P, Weckermann D, Riethmuller G, Schlimok G. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;88:8-16.
  10. Janni W, Hepp F, Pantel K, et al. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer (Phila)* 2001;92:46-53.
  11. 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;61:1890-5.
  12. 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;14:849-55.
  13. Thomas D, Giordano T, Sanders D, Biermann JS, Baker L. Absence of HER2/neu gene expression in osteosarcoma and skeletal Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:788-93.
  14. 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;9:5145-51.
  15. 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;18:1432-9.
  16. Zhong XY, Kaul S, Diel I, Eichler A, Bastert G. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:286-91.
  17. Ismail MS, Wynendaele W, Aerts JL, et al. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumor cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 2004;10:196-201.
  18. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumor cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004;5:79-88.
  19. 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;23:1883-90.
  20. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002;360:683-9.
  21. Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, et al. Clinical significance of proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003;89:539-45.
  22. Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, et al. HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Ann Oncol* 2002;13:1398-403.
  23. Fehm T, Morrison L, Saboorian H, et al. Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75:227-39.
  24. Yamamoto D, Senzaki H, Nakagawa H, et al. Detection of chromosomal aneusomy by fluorescence in situ hybridization for patients with nipple discharge. *Cancer (Phila)* 2003;97:690-4.
  25. Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, et al. Prognostic significance of circulating CK-19 mRNA positive cells in the blood of women with operable breast cancer before and after adjuvant chemotherapy [abstract 1736]. *J Clin Oncol* 2002;21:435a.
  26. Braun S, Kantenich C, Janni W, et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000;18:80-6.
  27. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 2001;12(Suppl 1):S3-8.
  28. 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 (Wash DC)* 1987;235:177-82.
  29. Vogel C, Cobleigh M, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-26.
  30. Pegram M, Slamon D. Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2000;27(5 Suppl 9):13-9.
  31. 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;344:783-92.
  32. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002;20:1215-21.
  33. Nabholz JM, Slamon D. New adjuvant strategies for breast cancer: meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 2001;28(Suppl 3):1-12.
  34. Schlimok G, Pantel K, Loibner H, Fackler-Schwalbe I, Riethmuller G. Reduction of metastatic carcinoma cells in bone marrow by intravenously administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumours. *Eur J Cancer* 1995;31A:1799-803.
  35. Braun S, Hepp F, Kantenich CR, et al. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999;5:3999-4004.
  36. Kirchner EM, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells. *Ann Oncol* 2002;13:1044-8.

# 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

V. Georgoulas<sup>\*</sup>,<sup>1,2</sup>, V. Bozionelou<sup>1</sup>, S. Agelaki<sup>1,2</sup>, M. Perraki<sup>2</sup>, S. Apostolaki<sup>2</sup>, G. Kallergi<sup>2</sup>, K. Kalbakis<sup>1</sup>, A. Xyrafas<sup>1</sup> & D. Mavroudis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, University Hospital of Heraklion; <sup>2</sup>Laboratory of Tumor Cell Biology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Received 27 September 2011; revised 13 January 2012; accepted 24 January 2012

**Background:** Since the detection of circulating tumor cells (CTCs) which express HER2 is an adverse prognostic factor in early breast cancer patients, we investigated the effect of trastuzumab on patients' clinical outcome.

**Patients and methods:** Seventy five women with HER2 (-) breast cancer and detectable CK19 mRNA-positive CTCs before and after adjuvant chemotherapy, were randomized to receive either trastuzumab ( $n = 36$ ) or observation ( $n = 39$ ). CK19 mRNA-positive CTCs were detected by RT-PCR and double stained CK(+)/HER2(+) cells by immunofluorescence. The primary endpoint was the 3-year disease-free survival rate.

**Results:** Fifty-one (89%) of the 57 analyzed patients had HER2-expressing CTCs. After trastuzumab administration, 27 of 36 (75%) women became CK19 mRNA-negative compared to seven of 39 (17.9%) in the observation arm ( $p = 0.001$ ). After a median follow up time of 67.2 months, four (11%) and 15 (38%) relapses were observed in the trastuzumab and observation arm, respectively ( $p = 0.008$ ); subgroup analysis indicated that this effect was mainly confined to women with >3 involved axillary lymph nodes ( $p = 0.004$ ). The median DFS was also significantly higher for the trastuzumab-treated patients ( $p = 0.008$ ).

**Conclusion:** Administration of trastuzumab can eliminate chemotherapy-resistant CK19 mRNA-positive CTCs, reduce the risk of disease recurrence and prolong the DFS.

**Key words:** trastuzumab, breast cancer, circulating tumor cells, micrometastasis, CK-19, HER2

## introduction

The detection of disseminated (DTCs) and circulating (CTCs) tumor cells in patients with early stage breast cancer [1-3] is a well recognized independent prognostic factor associated with increased risk of disease recurrence and disease-related death [3-7]. Recent studies have demonstrated that adjuvant chemotherapy [8-10] or tamoxifen [11] cannot eliminate DTCs/CTCs probably because of their non-proliferating and/or dormant state [12]. Moreover, the proliferative potential and the *in vitro* growth characteristics of DTCs [13] as well as their persistence after adjuvant chemotherapy and/or tamoxifen are associated with unfavorable prognosis [8-11].

DTCs and CTCs may express the HER2 oncoprotein in 60-70% early stage patients with breast cancer [14-17], and often present HER2 gene amplification and aneusomy [18,19]. Interestingly, HER2 expression on DTCs/CTCs is independent of its expression on primary tumor cells [16-22]. A shift of breast cancer patients' CTCs from HER2(-) to HER2(+) status [23] has been attributed to acquired HER2 gene amplification during cancer progression [24]. The detection of HER2 oncoprotein on DTCs and CTCs has been associated with an increased risk of death [16-22] and decreased disease-free interval [22]; moreover, HER2 mRNA-positive CTCs have independent prognostic value for worse disease-free and overall survival [25,26].

The humanized monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin), which is directed against the extracellular domain of the HER2 protein, has been shown to inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of malignant cells and enhance the anti-tumor efficacy of some chemotherapeutic agents [27]. In

\*Correspondence should be addressed: Prof. V. Georgoulas, Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Voutes 71110 Heraklion, PO Box 1352, Crete, Greece. Tel: +30 2810 392750, Fax: +30 2810 392802, E-mail: georgsec@med.uoc.gr

addition, trastuzumab is part of the standard care of patients with HER2-positive tumors in the adjuvant and metastatic settings.

We have reported that trastuzumab can effectively eliminate CK19 mRNA-positive CTCs and DTCs in women with breast cancer irrespectively of the HER2 status of primary tumor cells [19]. Based on this observation and the fact that the detection of CK + /HER2+ DTCs/CTCs is an adverse prognostic factor for patients' outcome, we investigated whether "secondary adjuvant" administration of trastuzumab could decrease the incidence of relapses in patients with chemotherapy-resistant CTCs; the study was conducted in women with early stage HER2-negative breast cancer who were at high risk of relapse because they had detectable CK19 mRNA-positive CTCs before and after the completion of adjuvant chemotherapy [5,10]. Our results demonstrate that treatment with "secondary adjuvant" trastuzumab resulted in a significantly reduced probability of disease relapse and increased disease-free interval compared to patients receiving only standard treatment.

## patients and methods

### patients

Women with histologically confirmed operable (stage I-III) breast adenocarcinoma with detectable CK19 mRNA-positive CTCs both before and after the administration of adjuvant chemotherapy and radiotherapy (when indicated), treated in our Department were eligible [10]. Additional inclusion criteria were: age >18 years, surgery (lumpectomy or mastectomy) for the primary tumor, performance status 0-2 (WHO), adequate bone marrow, renal and liver function, normal left ventricular ejection fraction (LVEF), absence of a second primary tumor (except of *in situ* cervical cancer or a squamous skin cancer) and, absence of any clinical or radiological evidence of distant metastasis. Since the study was initiated in 2003 and before the approval of trastuzumab administration in the adjuvant setting (2005), initially no limitation concerning the HER2 status of the primary tumor was applied; from 2005, an amendment excluded patients with HER2-positive tumors from the study since trastuzumab was for them standard adjuvant treatment. HER2 status was determined by immunohistochemistry (IHC; 3+) or/and FISH (for 1-2+ by IHC). Patients received standard adjuvant systemic treatment (CMF or FEC regimens or sequential combination of epirubicin/cyclophosphamide followed by docetaxel) as well as radiation therapy according to the international guidelines. Furthermore, postmenopausal patients with hormone receptor-positive tumors received either tamoxifen or aromatase inhibitors whereas pre-menopausal patients were treated with LH/RH analogues and tamoxifen.

### CK19 mRNA testing

All patients were routinely assessed for the presence of CK19 mRNA-positive CTCs at the time of initial staging of their disease and before any systemic treatment; in addition, patients were sequentially assessed for the presence of CK19 mRNA-positive CTCs after the completion of adjuvant chemotherapy and radiotherapy as well as every 3 months thereafter. Patients' treatment was independent of their CK19 mRNA status. Peripheral blood in EDTA was obtained: i) before and after the completion of adjuvant chemotherapy/radiotherapy; ii) in patients randomized to the trastuzumab arm after the 6<sup>th</sup> administration of trastuzumab and iii) in those enrolled in the observation arm, 4 months after the completion of

adjuvant chemotherapy/radiotherapy (a period corresponding to that of "secondary adjuvant" trastuzumab administration). All blood samples were obtained in the middle of vein puncture, RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) within 6 hours and CK19 mRNA-positive cells were detected by real-time PCR as described [28]. According to the analytical detection limit of our assay, values  $\geq 0.6$  MCF-7 equivalents/ 5  $\mu$ g of total RNA were considered as a positive result. Using the above cut-off, only two (2.2%) out of 89 female healthy donors were positive whereas none of 11 women with benign breast disease had positive blood samples.

### Detection of CK + /HER2+ cells

Cytospins (250.000 PBMCs/slide) were prepared by cyto-centrifugation, air dried and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . CK-positive cells in PBMCs' cytopins were assessed by immunofluorescence using the mouse A45-B/B3 (detecting CK8, CK18 and CK19) (Micromet Munich, Germany) antibody as previously reported [29,30]. The Meng's et al [13] cyto-morphological criteria (i.e. high nuclear/cytoplasmic ratio, larger cells than white blood cells etc) were used in order to characterize a CK-positive cell as a CTC. Cytopins were also double stained with anti-CD45 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) and A45-B/B3 antibodies in order to exclude possible ectopic expression of cytokeratins on hematopoietic cells [28,29]. For HER2 detection on CTCs, slides were stained for cytokeratin along with the corresponding secondary (FITC) Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then, the anti-HER2 anti-rabbit (Cell Signalling Technology, Boston, MA, USA) and the corresponding Alexa Fluor 555 anti-rabbit secondary antibodies (Invitrogen) were added. SKBR3 tumor cells were used as positive control; negative controls were the same cells stained with the secondary IgG isotype antibody (Invitrogen) without adding the primary antibody. Finally, Dapi-antifade reagent (Invitrogen) was added to each sample. Slides were evaluated using a confocal laser scanning microscope (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) and images were analyzed with the respective software. Specific staining was easy to distinguish because of the differential intracellular distribution [31].

### treatment

Patients received either trastuzumab (Herceptin, Roche, Basel, Switzerland; a loading dose of 8mg/kg as a 30-minutes IV infusion followed by 5 administrations of 6mg/kg IV, every 3 weeks) or only observation. No other treatment was allowed except of the adjuvant hormone treatment for patients with hormone receptor-positive tumors. All patients were followed every 3 months for the first 2 years, every 6 months for the subsequent 3 years and every year thereafter with clinical, biochemical, tumor markers (CEA and CA 15.3) and imaging studies (chest x-rays, abdominal ultrasound or additional tests if clinically indicated) in order to exclude distant metastases. Trastuzumab-related cardiac toxicity was monitored by assessment of the LVEF before and after the administration of trastuzumab. Patients gave their informed consent to participate in the study which was approved by the Ethics and Scientific Committees of our Institution.

### statistical analysis

In this pilot, randomized phase II trial, patients were centrally randomized, using a computer-derived random allocation sequence; stratification factors were the menopausal, axillary lymph node and hormone receptor status. The primary end-point of the study was disease-free survival (DFS) rate at 3 years. Secondary endpoint was the elimination rate of CK19 mRNA-positive cells. DFS was measured from the date of randomization to the date of relapse or second malignancy or the date of death from any cause or last follow-up in the case of living patients without evidence of disease.

Based on previous data from our laboratory it was assumed that the DFS rate at 3 years of patients with CK-19 mRNA-positive cells both before and after adjuvant chemotherapy receiving standard treatment would be 60%; it was estimated that 32 evaluable patients should be enrolled on each arm to show a 50% increase of DFS rate for the trastuzumab arm with a power of 80% at a statistical significant level of 0.05.

Cox proportional hazards model for time to event data was used for the univariate analysis along with Log-Rank test for the Kaplan-Meier curves. The Wilcoxon test was used to investigate differences in related samples. Analysis also included contingency tables, t or Mann-Whitney tests and Chi-square tests. Significant interaction between effectiveness of trastuzumab administration and other clinicopathological variables was assessed by using heterogeneity tests and forest plots were made. The statistical significant level was set at 0.05 (2-sided).

## results

### patients and treatment

From February 2003-December 2008, 378 patients (310 and 68 with HER2-negative and -positive early breast cancer, respectively) were treated. 148 (39%) patients with detectable CK19 mRNA-positive CTCs before any adjuvant systemic treatment represent the cohort of patients screened for this trial. Of those, 100 (26%) patients also had detectable CK19 mRNA-positive CTCs after the completion of adjuvant chemotherapy and radiotherapy and were eligible for study enrollment; three patients were excluded since they did not meet the inclusion criteria (two had a second primary tumor and one severe heart failure) whereas two other patients refused to participate in the trial. Ninety-five patients were randomized to the trastuzumab ( $n = 46$ ) or observation ( $n = 49$ ) arm. Among them, nine (20%) and 10 (20%) patients, randomized in the trastuzumab and the observation arm, respectively before 2005, had a HER2-positive primary tumor and were excluded from the final analysis. One additional patient, randomized to receive trastuzumab, withdrew her consent before treatment administration and, therefore, 36 and 39 patients were evaluable in the trastuzumab and the observation arm, respectively, and were included in the final analysis (CONSORT diagram; Figure 1). The clinico-

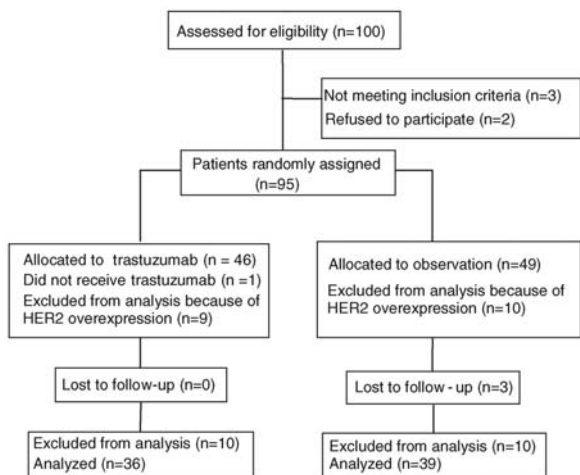
pathological characteristics of the enrolled patients as well as the administered treatment [adjuvant chemotherapy, radiotherapy and hormone treatment] were well balanced (Table 1). All patients received the six scheduled trastuzumab cycles uneventfully without significant cardiac or other toxicities.

### detection of CK19 mRNA-positive cells

At the end of trastuzumab therapy, 23 of 32 (72%; 4 patients had no CTCs' enumeration) women turned CK19 mRNA-negative whereas only seven of 27 (26%; 12 patients had no CTCs' enumeration) women of the observation arm had undetectable CK19 mRNA-positive CTCs 4 months (corresponding to the period of trastuzumab administration)

**Table 1.** Patients' characteristics

	Trastuzumab		Observation		
	Number	%	Number	%	<i>p-value</i>
Patients enrolled	36		39		
AGE					
Median	53.0		51.0		
Range	28-73		29 - 72		
Menopausal Status					
Premenopausal	18	50.0	19	48.7	0.619
Postmenopausal	18	50.0	20	51.3	
Tumor Size cm					
<2.0	14	38.9	17	43.6	0.529
2.0-5.0 cm	21	58.3	19	48.7	
> 5.0 cm	1	2.8	3	7.7	
Lymph Nodes					
0	13	36.1	6	15.4	0.112
1 - 3	13	36.1	17	43.6	
≥ 4	10	27.8	16	41.0	
Histologic Grade					
I/II	18	50.0	19	48.7	0.912
III	18	50.0	20	51.3	
Estrogen Receptors					
ER <sup>+</sup>	22	61.1	22	56.4	0.815
ER <sup>-</sup>	14	38.9	17	43.6	
Progesterone Receptors					
PR <sup>+</sup>	20	55.6	19	48.7	0.646
PR <sup>-</sup>	16	44.4	20	51.3	
Surgery					
Breast conserving	19	52.8	23	59.0	0.646
Mastectomy	17	47.2	16	41.0	
Adjuvant Chemotherapy					
Anthracycline	17	47.2	18	46.2	0.664
Taxanes	1	2.8	0	0.0	
Both	15	41.7	19	48.7	
Other	3	8.3	2	5.1	
Radiotherapy					
Yes	26	72.2	34	87.2	0.106
No	10	27.8	5	12.8	
Hormonotherapy					
Yes	26	72.2	28	71.8	0.967
No	10	27.8	11	28.2	



**Figure 1.** CONSORT diagram of the study

ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.



after the completion of adjuvant chemotherapy ( $p = 0.001$ ). The median number of CK19 mRNA-positive cells was significantly decreased at the end of trastuzumab administration ( $p < 0.001$ ); conversely, the median number of CK19 mRNA-positive cells of patients enrolled in the observation arm was not statistically different during the corresponding period (Table 2;  $p = 0.085$ ). In addition, the median number of CK19 mRNA-positive CTCs at the end of trastuzumab administration was significantly lower than that of patients enrolled in the observation arm (Table 2;  $p < 0.001$ ).

### HER2 expression on CK+ CTCs

Double staining experiments for the detection of CK + /HER2+ CTCs were performed in 57 patients for whom adequate material was available (in 18 patients, cytopspins were inappropriate for analysis due to the intense background in the negative controls). CK + /HER2+ CTCs could be detected in 51 (90%) of the evaluable patients. In nine patients all the recognized CTCs were CK + /HER2+ whereas in 42 (82%) patients the existence of a subpopulation of CK + /HER2- CTCs could also be detected. The median number of CK + /HER2+ CTCs was 2.0 (range, 1-37) in the trastuzumab arm and 2.0 (range, 1-47) in the observation arm.

### disease recurrence and survival

After a median follow up period of 67.2 months (range, 6.83-92.97), 19 (25%) patients presented a distant relapse. All but four of these relapses occurred in patients enrolled in the observation arm ( $p = 0.008$ ; Table 3). There was no difference in terms of clinical relapses between the two arms according to menopausal ( $p = 0.66$ ), hormone receptor ( $p = 0.114$ ) status or patients with N0 ( $p = 0.456$ ) or  $<3$  involved axillary lymph nodes ( $p = 0.212$ ) (Table 3). Conversely, the incidence of relapses was significantly higher in the observation than in the trastuzumab arm in post-menopausal patients ( $p = 0.006$ ), those with hormone receptor-negative tumors ( $p = 0.042$ ) and patients with  $>3$  involved axillary lymph nodes ( $p = 0.004$ ) (Table 3). However, the interaction test could demonstrate heterogeneity only between the axillary lymph nodes' groups (Figure 2). Although the median DFS has not yet been reached, it was significantly longer in patients treated with trastuzumab ( $p = 0.008$ ; Figure 3).

Six (8.0%) patients died because of disease progression during the follow up period; all but two deaths occurred in the

group of patients randomized to the observation arm ( $p = 0.676$ ). There was no significant difference in terms of overall survival between the two arms (Supplementary Figure 1;  $p = 0.506$ ); there was no significant interaction between the different groups for trastuzumab effect on overall survival or Disease Free Survival.

### univariate and multivariate analysis

Univariate analysis including menopausal status, tumor size, number of infiltrated axillary lymph nodes, histopathological grade, ER, PR status and trastuzumab administration revealed that only randomization to the observation arm was significantly ( $p = 0.014$ ) associated with a decreased DFS (Table 4). Since only one parameter emerged as significant in the univariate analysis no further multivariate analysis was performed. Moreover, none of the examined parameters showed any significant association with overall survival (Table 4).

### discussion

To the best of our knowledge this is the first randomized clinical study investigating the effect of a "secondary" adjuvant therapy targeting chemotherapy-resistant CTCs in patients with early breast cancer. The results demonstrate that targeting chemo-resistant CTCs with trastuzumab significantly reduced the risk of relapse and prolonged the DFS. Moreover, the administration of trastuzumab resulted in a significantly decreased number of patients with detectable CTCs by eliminating these cells.

The development of clinical recurrences in patients with operable breast cancer is due to the migration of tumor cells from the primary tumor to distant organs even before the surgical excision of the primary tumor. Using immunocytochemical or molecular techniques [1-3], epithelial cells, with genetic heterogeneity [32], loss of heterozygosity [33] or/and chromosomal aberrations [34], can be detected in the bone marrow and the peripheral blood of patients with early breast cancer. The detection of these cells is associated with an unfavorable outcome [4,7]. Moreover, the detection of CTCs after adjuvant treatment (chemotherapy or tamoxifen), is an independent adverse prognostic factor [8,10-12]; since these cells are resistant to chemotherapy and tamoxifen, it is important to define whether biological treatments could effectively target them.

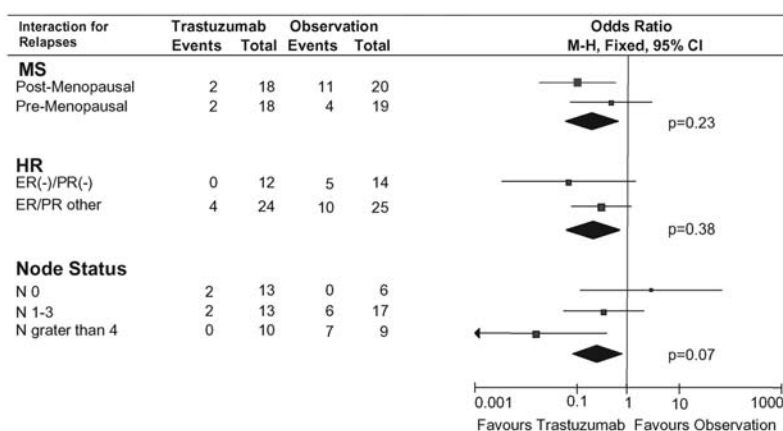
HER2/neu expression is involved in cell proliferation [35] and is associated with poor clinical outcome [36]. Since HER2 is expressed on DTCs or/and CTCs in breast cancer patients [12,14-17] it was considered as a suitable target for the development of a "secondary adjuvant" biologic therapy. We have demonstrated that the administration of 3-4 trastuzumab infusions in patients with detectable CK19 mRNA-positive CTCs or/and DTCs could specifically eliminate these cells in 67% of patients [19]. In the current study, we chose to administer 6 cycles of trastuzumab based on the observation from our "proof-of-principle" study (19) that in some patients CK19 mRNA-positive cells reappeared 1-3 months after the discontinuation of trastuzumab. This finding suggests that despite the decrease of CTCs' number in trastuzumab-treated

**Table 2.** Detection of CK19 mRNA-positive cells before and after treatment in the two patients' groups

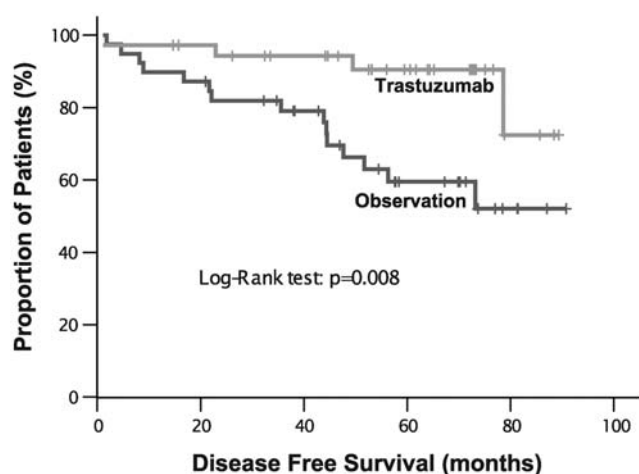
CK19mRNA(+) cells (median (range))	Trastuzumab (n = 36)	Observation (n = 39)	p-value
Study entry	1.3 (0.6-13.0)	2.0 (0.6-25.0)	0.131 <sup>a</sup>
End of trastuzumab/ 4 months observation	0.0 (0.0-4.5)	1.0 (0.0-5.0)	$<0.001^a$
p-value	$<0.001^b$	0.085 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>Mann-Whitney test.

<sup>b</sup>Wilcoxon Signed Ranks test. mRNA, messenger RNA.



**Figure 2.** Forest plot diagram for trastuzumab efficacy on relapse rate according to various clinico-pathologic parameters.



**Figure 3.** Kaplan-Meier curve of Disease-Free Survival.

patients under the detection limit of the assay, residual populations of CTCs lead to early relapse of CK19 mRNA-positive CTCs [18]. Similarly, Barok et al [37] using a xenograft model, demonstrated that trastuzumab significantly decreased the number of DTCs and CTCs even in cases with trastuzumab-resistant primary tumor. The high efficacy of trastuzumab on the elimination of CK19 mRNA-positive CTCs should be attributed to the fact that almost 90% of the evaluated patients had HER2-expressing CTCs. Therefore, we can hypothesize that the trastuzumab-induced elimination of CTCs might have resulted in the decreased incidence of disease recurrences in patients treated with trastuzumab; in addition, the administration of trastuzumab was associated with a significantly prolonged DFS.

These results were obtained in a rather high risk group of patients since all of them had detectable CK19 mRNA-positive CTCs after adjuvant chemotherapy, which has been shown to confer the worst prognosis in terms of clinical relapses and disease-related deaths [10]. In addition, although subgroup analysis indicated that the trastuzumab effect was mainly observed in post-menopausal patients with hormone receptor-negative tumors and with >3 involved lymph nodes, the

interaction test demonstrated heterogeneity only with lymph nodes; therefore, larger studies are required to elucidate these observations.

The described beneficial effect of trastuzumab was observed in patients with HER2-negative primary tumors. It is well known that HER2 expression on DTCs or/and CTCs is not correlated with the HER2 status of the primary tumor [15,17-19,21,22] and occult tumor cells can acquire HER2 gene amplification over time [24,25]. Our findings may explain the intriguing results from a subset analysis of the NSABP B-31 trial in women with early breast cancer who derived benefit from adjuvant trastuzumab although they had HER2-negative tumors by central testing [38]. This observation suggests that the benefit of trastuzumab might not be confined exclusively to patients with HER2-positive primary tumors. Moreover, the reported data raise the question whether the molecular characteristics of CTCs/DTCs in patients with solid tumors could be more predictive of the efficacy of targeted treatments.

Undoubtedly, the current study has some important limitations: i) Since the control group did not receive placebo we cannot totally exclude a “non-specific” treatment effect of trastuzumab although we have previously shown that non-specific immunoglobulin failed to eliminate CTCs [19]. ii) The small number of enrolled patients limits the statistical power of our study and therefore, our results should be considered as “proof of principle”. iii) Nineteen HER2-positive patients enrolled before 2005 were excluded from the final analysis in order to avoid a bias due to HER2 status heterogeneity. iv) Finally, the study did not include monitoring of the CK (+)/HER2(+) CTCs, during trastuzumab treatment.

In conclusion, our results provide preliminary evidence that targeting chemotherapy-resistant CTCs may be clinically meaningful since “secondary” adjuvant trastuzumab, in patients with early breast cancer and detectable CK19 mRNA-positive cells, reduced the probability of disease recurrence. A larger, multicenter, prospective randomized clinical trial is required to confirm these findings. Moreover, the molecular characterization of CTCs during treatment and at the time of relapse could improve our understanding on the role of CTCs in the metastatic process.

## acknowledgement

This work was partially supported by grants from the Cretan Association for Biomedical Research (CABR) and the Hellenic Society of Medical Oncology (HeSMO).

Preliminary results of this study have been presented at the 2010 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting.

## disclosures

The authors have declared no conflicts of interest

## references

- Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML et al. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749–56.
- 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: 854–61.
- 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: 525–33.
- Braun S, Vogl FD, Naume B et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *hN Engl J Med* 2005; 353: 793–802.
- 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: 3404–12.
- 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: 3756–62.
- 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: 5194–202.
- Braun S, Kantenich C, Janni W et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 80–6.
- 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: 3678–85.
- 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: 2177–84.
- 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: 849–55.
- 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: 1623–31.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8152–62.
- Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2246–51.
- 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: 1419–24.
- Brandt B, Roetger A, Heidl S et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998; 76: 824–8.
- 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: 1890–5.
- 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.
- 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: 8185–94.
- Vincent-Salomon A, Pierga JY, Couturier J et al. HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases: a possible tool for anti-HER2 therapy management? *Br J Cancer* 2007; 96: 654–9.
- Xu Y, Yao L, Li H et al. Presence of erbB2 mRNA in the plasma of breast cancer patients is associated with circulating tumor cells and negative estrogen and progesterone receptor status. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 97: 49–55.
- 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: 179–84.
- Wulffing 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: 1715–20.
- Hayes DF, Walker TM, Singh B et al. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol* 2002; 21: 1111–7.
- 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: 9393–8.
- Apostolaki S, Perraki M, Pallis A et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007; 18: 851–8.
- 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: 525–34.
- 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: 5145–51.
- 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.
- Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukarakis 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.
- Fehm T, Solomayer EF, Meng S et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005; 7: 171–85.
- Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002; 360: 683–9.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA et al. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4494–9.
- Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH et al. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* 2005; 8: 227–39.

35. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 1: pS3-S8.
  36. 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: 177–82.
  37. Barok M, Balazs M, Nagy P et al. Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor. *Cancer Lett* 2008; 260: 198–208.
  38. Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1409–11.
-