



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ :

**«ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΜΑΣΤΟΥ»**

ΕΛΕΝΗ ΠΟΛΙΤΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2022

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Μαυρουδής Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μαυρουδής Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεωργούλιας Βασίλειος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα
Ιατρικής Πανεπιστήμιο Κρήτης

Λιανίδου Εύη, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΛΟΙΠΑ ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Αγγελάκη Σοφία, Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Θεοδωρόπουλος Παναγιώτης, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τζαρδή Μαρία, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο
Κρήτης

Στειακάκη Ευτυχία, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα
Ιατρικής Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας αυτή την διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου καθηγητή σε αυτή την εργασία Κο Μαυρουδή Δημήτριο που μου έδωσε την ευκαιρία, με παρακίνησε και με εμπιστεύθηκε σε αυτό τον δύσκολο δρόμο, δείχνοντας υπομονή και επιμονή. Επίσης ιδιαιτέρως, τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Κο Γεωργούλια Βασίλειο και Κα Λιανίδου Εύη που με ενθάρρυναν να συνεχίσω και με βοήθησαν με τις πολύτιμες συμβουλές τους σε αυτή την διαδρομή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στην Κα Σοφία Αγγελάκη η οποία καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής με καθοδηγούσε και με βοήθησε στην συγγραφή της ξενόγλωσσης δημοσίευσης. Σε όλη αυτή την προσπάθεια δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τους εκλεκτούς συναδέλφους και φίλους οι οποίοι εκτός από την ψυχολογική στήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα και με ενθάρρυναν συνεχώς να προχωρήσω, με βοήθησαν και εμπράκτως στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας αυτής. Τελευταίο, αλλά διόλου ασήμαντο το κεφάλαιο της οικογένειας μου το οποίο στάθηκε δίπλα μου βράχος όλο αυτό το διάστημα δείχνοντας αμέριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνση.

**“ΦΘΑΣΕ ΟΠΟΥ ΔΕΝ ΜΠΟΡΕΙΣ ΠΑΙΔΙ ΜΟΥ!
ΜΗΝ ΝΤΡΑΠΕΙΣ ΕΑΝ ΕΠΑΙΞΕΣ ΚΑΛΑ ΚΑΙ ΕΧΑΣΕΣ...
ΝΑ ΝΤΡΑΠΕΙΣ ΕΑΝ ΕΠΑΙΞΕΣ ΚΑΚΑ ΚΑΙ ΚΕΡΔΙΣΕΣ!”
Ν. ΚΑΖΑΝΤΖΑΚΗΣ**

ΣΤΟΝ ΕΚΤΟΡΑ, ΣΤΗ ΝΙΟΒΗ

*Creative***Commons Αναφορά Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC):***Η άδεια αυτή επιτρέπει στον χρήστη να χρησιμοποιεί, μοιράζεται και δημιουργεί παράγωγα έργα επί του αδειοδοτούμενου περιεχομένου και να το διαμοιράζεται με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό, ή το δικαιούχο, ή/και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο.
Προϋπόθεση επίσης είναι να μη χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο ή τα δικά του παράγωγα δημιουργήματα για εμπορικούς σκοπούς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11-30
1.1 Καρκίνος του Μαστού	
1.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα .	
1.3 Τεχνολογίες ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων	
1.4 Τεχνολογίες ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη	
1.5 Κλινική σημασία ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων	
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	31
3. ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΙ	32-42
3.1 Ασθενείς	
3.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος...	
3.3 Καταμέτρηση κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και οπτικής μικροσκοπίας	
3.4 Επίστρωση κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες	
3.5 Ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με ανοσοφθορισμό	
3.6 Απομόνωση ολικού RNA	
3.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	
3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)	
3.9 Cell Search System	
3.10 Στατιστικός σχεδιασμός και ανάλυση	

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43-51
4.1 Ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων στο περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών	
4.2 Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού	
4.3 Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού	
4.4 Έκφραση των μορίων EpCam και CK19 στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα σε ασθενείς με καρκίνο μαστού	
4.5 Προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των CTCs με τις τρεις μεθόδους, στον πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού	
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	57
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59
Πίνακας Συντμήσεων.....	68
Δημοσίευση στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής.....	69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Πολλές τεχνολογίες απομόνωσης και ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (circulating tumor cells, CTCs ή ΚΚΚ) έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια με ραγδαίο ρυθμό. Παρ' όλα αυτά η ασυμφωνία μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων είναι μεγάλη, γεγονός που δυσχεραίνει την εφαρμογή τους στην καθημερινή κλινική πράξη. Σε αυτή την μελέτη, σκοπός είναι να συγκρίνουμε τρεις μεθοδολογίες ανίχνευσης των κυττάρων στο αίμα ασθενών με μεταστατικό και πρώιμο καρκίνο μαστού: την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου [Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)] για την ανίχνευση του mRNA της κυτταροκερατίνης 19 [Cytokeratin 19 (CK19)], τον ανοσοφθορισμό σε επιστρωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες και το εγκεκριμένο από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) σύστημα Cell Search (Menarini, Silicon Biosystems, Italy), καθώς και να εκτιμήσουμε την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης σε σχέση με την κλινική έκβαση των ασθενών.

Μέθοδοι: 200 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού και 164 με μεταστατικό καρκίνο μαστού ελέγχθησαν πριν την έναρξη συμπληρωματικής ή πρώτης γραμμής θεραπείας χρησιμοποιώντας το σύστημα Cell Search, την RT-qPCR για την ανίχνευση του CK-19 mRNA και την τεχνική του ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση των CTCs.

Αποτελέσματα: Με το Cell Search System, το ποσοστό των ασθενών με πρώιμη νόσο που είχαν CTCs (cut off ≥ 1 και ≥ 2 CTCs σε 23 ml αίματος) ήταν 37% και 16.5% αντίστοιχα, με RT-qPCR 18.0% και με ανοσοφθορισμό 16.9%. Μεταξύ των μεθόδων δεν υπήρξε συμφωνία. Όσον αφορά στους μεταστατικούς ασθενείς, με το Cell Search System, ανιχνεύτηκαν CTCs στο 34.8% και 53.7% των ασθενών αντίστοιχα (για ≥ 5 και ≥ 2 CTCs σε 7.5 ml αίματος), με RT-qPCR 37.8% και με ανοσοφθορισμό 28.5%. Μία στατιστικά σημαντική συμφωνία παρατηρήθηκε μεταξύ του Cell Search System και της RT-qPCR. Σε ποσοστό 60.8% των περιπτώσεων, διαφορετική έκφραση του EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) και της CK-19 στα CTCs με ανοσοφθορισμό θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει τις διαφωνίες μεταξύ CellSearch System και RT-qPCR. Στην ομάδα των ασθενών με μεταστατική νόσο η ανίχνευση των CTCs με οποιαδήποτε από τις τρεις μεθόδους σχετίζονταν με μειωμένη συνολική επιβίωση.

Συμπέρασμα: Μία στατιστικά σημαντική συμφωνία παρατηρήθηκε όσον αφορά την ανίχνευση των CTCs με την τεχνολογία Cell Search System και RT-qPCR στους μεταστατικούς ασθενείς και όχι στους ασθενείς με πρώιμη νόσο μαστού. Εξαιτίας της ετερογένειας των καρκινικών κυττάρων, κάποιες διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων θα μπορούσαν να δικαιολογηθούν. Η ανίχνευση των CTCs με όλες τις μεθόδους αποδείχθηκε ότι είχε προγνωστική σημασία στις ασθενείς με μεταστατική νόσο.

ABSTRACT

Background: Several techniques have been developed for the detection of circulating tumor cells (CTCs) in patients with breast cancer. We designed this study to compare the CellSearch™ system, with real time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and an immunofluorescent method for CTC detection in patients with breast cancer.

Methods: Blood was obtained from patients with early and metastatic breast cancer before the initiation of adjuvant or first-line chemotherapy. Different aliquots of the same blood sample were evaluated for the presence of CTCs by the CellSearch™ System, the RT-qPCR and by double immunofluorescence (IF) microscopy.

Results: In early breast cancer, using the CellSearch™ System, 37% and 16.5% of patients were CTC-positive (cut-offs ≥ 1 and ≥ 2 CTCs per 23 ml of blood), 18.0% by RT-qPCR and 16.9% by IF. In the metastatic setting, 34.8% of patients had ≥ 5 and 53.7% had ≥ 2 CTCs per 7.5 ml of blood, 37.8% were CTC-positive by RT-qPCR, and 28.5% by IF. In 60.8% of cases presenting discordant results by CellSearch™ and RT-qPCR, the differential expression of EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) and CK19 on CTCs, could explain the discrepancies observed.

Conclusion: A significant concordance in CTC detection between the CellSearch™ and RT-qPCR was observed in metastatic setting. CTC detection by either method had prognostic relevance in metastatic patients. Discordant results could be explained in part by CTC heterogeneity.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Καρκίνος του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί πλέον με βάση τα στοιχεία του Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.fr>) 2020 την πιο συχνή μορφή καρκίνου και είναι το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα στις γυναίκες παγκοσμίως (2.1 εκατομμύρια), η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες της Αμερικής, ακολουθώντας τον καρκίνο του πνεύμονα. Σε όλες τις γωνίες του πλανήτη, ο καρκίνος του μαστού συνεχώς αυξάνεται, αλλά κυρίως η αύξηση παρατηρείται στις βιομηχανικές χώρες. Περίπου το μισό ποσοστό των περιπτώσεων σε παγκόσμια κλίμακα παρατηρείται στις αναπτυσσόμενες χώρες, ίσως σχετιζόμενο με τον δυτικό τρόπο ζωής, ο οποίος παραπέμπει σε κακή διατροφή, κάπνισμα, υπερβολικό στρες, ελλιπή φυσική δραστηριότητα [1]. Εκτιμάται ότι το 2018, 627.000 άνθρωποι πέθαναν παγκοσμίως από καρκίνο του μαστού και διαγνώστηκαν περί τα 2,089 εκατομμύρια γυναίκες παγκοσμίως. 36% των ογκολογικών ασθενών αποτελούν οι ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού. Μόνο 1% των περιπτώσεων αφορά άνδρες [2]. Η πιθανότητα μία γυναίκα να νοσήσει από καρκίνο του μαστού κατά την διάρκεια της ζωής της έχει αυξηθεί από 1/11 το 1975, στο 1/8 σήμερα (breast cancer landscape).

Ο καρκίνος του μαστού χωρίζεται σε 3 μεγάλες ομάδες ανάλογα με την παρουσία ή απουσία έκφρασης των μοριακών δεικτών: οιστρογονικοί ή προγεστερονικοί υποδοχείς και human epidermal growth factor 2 (ERBB2/HER2). 70% των ασθενών παρουσιάζουν καρκίνο θετικό σε ορμονουποδοχείς και αρνητικό Her2, 15-20% θετικό σε Her2 και 15% με τριπλά αρνητικό προφίλ στους συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες. Περισσότερο από 90% των καρκίνων του μαστού την στιγμή της διάγνωσης είναι μη-μεταστατικοί. Οι καρκίνοι με τριπλά αρνητικό προφίλ έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής συγκριτικά με τους δύο άλλους υπότυπους [3].

Η πιθανότητα γενικευμένης υποτροπής της νόσου, είναι περίπου της τάξεως του 30% στην δεκαετία που ακολουθεί την διάγνωση, ακόμα και στις περιπτώσεις που διαγιγνώσκονται σε πρώιμα στάδια [4]. Ο καρκίνος του μαστού αποδεικνύεται μία ετερογενής ασθένεια η οποία αποτελείται από μία πληθώρα διαφορετικών φαινοτύπων που απαιτεί την ανάγκη ανάπτυξης στοχευμένων και εξατομικευμένων για κάθε ασθενή θεραπειών [5]. Είναι μία ασθένεια κατά την οποία τα νεοπλασματικά

κύτταρα του μαζικού αδένου πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα ξεφεύγοντας της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων στον μαστό τα οποία μεταλλάσσονται σε καρκινικά διαχωρίζουμε και τους τύπους καρκίνου του μαστού (λοβιακός, πορογενής). Λοβιακός ονομάζεται ο καρκίνος που προέρχεται από τα κύτταρα των αδενικών λοβίων, αυτά δηλαδή που παράγουν το γάλα, ενώ πορογενής ονομάζεται ο καρκίνος ο οποίος προέρχεται από κύτταρα των πόρων του μαστού, αυτά δηλαδή που μεταφέρουν το γάλα. Ανάλογα με το πόσο βαθιά έχει προχωρήσει ένας καρκίνος μέσα στο μαστό, χωρίζεται σε **in situ** και σε **διηθητικό**. Επίσης ανάλογα με το πόσο γρήγορα πολλαπλασιάζονται τα κύτταρα και πόσο γρήγορα μεγαλώνει ο όγκος, αναφερόμαστε σε βαθμό κακοήθειας 1, 2, 3 ξεκινώντας από τον αργό και προχωρώντας προς τον γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης. Ο καρκίνος μπορεί να χαρακτηριστεί ως υψηλής, μέσης ή χαμηλής διαφοροποίησης κάτι το οποίο συνδέεται με δείκτη επιθετικότητας του καρκίνου. Όσο πιο χαμηλή είναι η διαφοροποίηση του καρκίνου, τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται ο όγκος.

Η αγγειογένεση που επιτελείται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην πρωτοπαθή εστία, δημιουργεί την αιμάτωση που απαιτείται για την ανάπτυξη του όγκου μέσω της δημιουργίας των τριχοειδών αγγείων [6]. Η αγγειογένεση διευκολύνει τα καρκινικά κύτταρα να διαφεύγουν και να διεισδύουν στον μεσοκυττάριο χώρο που περιβάλλει τον πρωτοπαθή όγκο με επακόλουθο και την είσοδό τους στη συστηματική κυκλοφορία [7,8]. Η διείσδυση των κυττάρων στο γειτονικό ιστό και ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους οδηγεί στο σχηματισμό μεταστάσεων [9], που θεωρείται και η κύρια αιτία θανάτου. Το 1889, ένας Άγγλος χειρουργός με το όνομα Stephen Paget στο πρώτο τεύχος του περιοδικού *Lancet*, εισήγαγε την υπόθεση του "σπόρου και εδάφους" σύμφωνα με την οποία η μετάσταση στηρίζεται στην διασταύρωση μεταξύ επιλεγμένων καρκινικών κυττάρων (καρπός) και ενός συγκεκριμένου οργανικού μικροπεριβάλλοντος (έδαφος) [10].

Βασιζόμενοι σε αυτή την θεωρία, πληθώρα μελετών έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να ανακαλύψουν πώς ο καρπός "καρκινικό κύτταρο" μπορεί να συντελέσει στην δημιουργία μεταστάσεων [11]. Παρ' όλο που ο ρυθμός διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την πρωταρχική εστία παραμένει άγνωστος, σύμφωνα με πειραματικά μοντέλα, εκατομμύρια καρκινικά κύτταρα διαχέονται στον οργανισμό, αλλά ένας μικρός αριθμός είναι αυτός ο οποίος θα φτάσει σε απομακρυσμένα όργανα, θα επιβιώσει σε ληθαργική κατάσταση ακόμη και για χρόνια, θα διαφύγει του ανοσοποιητικού

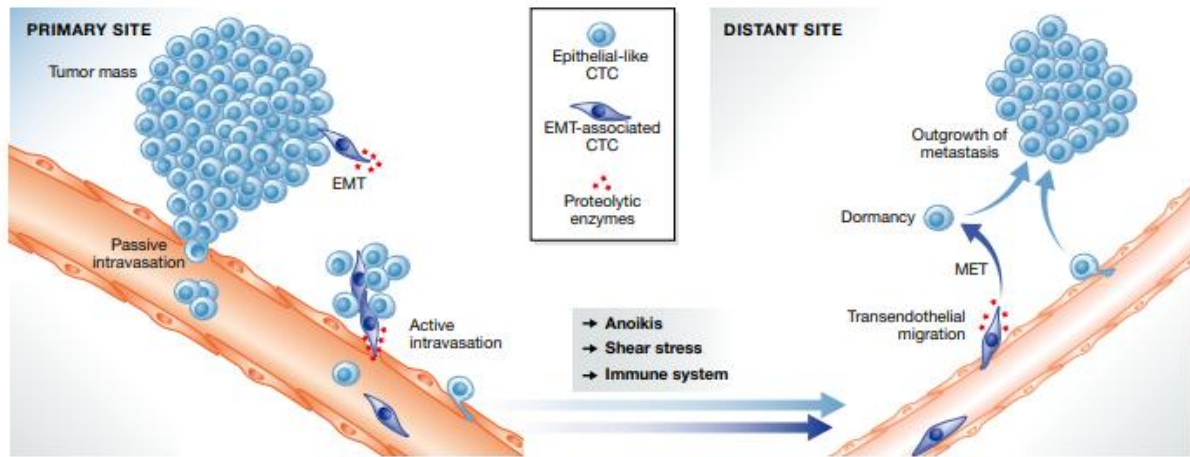
συστήματος και της συστηματικής θεραπείας και θα αποτελέσει μετέπειτα την αιτία της απομακρυσμένης μετάστασης [12]. Η προσαρμογή σε ένα νέο μικροπεριβάλλον και ο πολλαπλασιασμός ενός μόνο κυττάρου σε απομακρυσμένο σημείο σαφέστατα προϋποθέτει κάποια χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει το κύτταρο ή να έχει αποκτήσει, όπως η ικανότητα διαπερατότητας, η κινητικότητα, οι ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος στρώματος όπως π.χ σε συνθήκες υποξίας. Οι νέες περιβαλλοντικές συνθήκες θα δώσουν το σήμα στα κύτταρα ώστε να ξεκινήσουν να πολλαπλασιάζονται πάλι στο απομακρυσμένο όργανο [13]. Στις δυτικές χώρες, 30-40% των ασθενών διαγνωσθέντων με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού πεθαίνει από την νόσο λόγω της μεταστατικής υποτροπής [14].

1.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

Τα νεοπλασματικά κύτταρα που ανιχνεύονται στο αίμα ή το μυελό των οστών, ονομάζονται μικρομεταστατικά κύτταρα (micrometastatic ή occult tumor cells) και έχουν παρατηρηθεί πρωτίστως στο αίμα μέσω μικροσκοπίου εδώ και σχεδόν 160 χρόνια. Ο Thomas Ashworth, ένας Αυστραλός φυσικός, το 1869 ήταν ο πρώτος ο οποίος αναφέρθηκε στην παρουσία των κυττάρων αυτών [15] και από τότε πολλές μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνου που έχουν πραγματοποιηθεί επισημαίνουν την παρουσία και κλινική σημασία της ανίχνευσης τους στο αίμα ασθενών [16] [17]. Η δυσκολία ανίχνευσής τους έγκειται στο γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά είναι πολύ σπάνια στο αίμα (περίπου 1 ανά 10^6 με 10^7 λευκά αιμοσφαίρια) [18], περιστοιχιζόμενα από δισεκατομμύρια φυσιολογικά αιμοποιητικά ή και φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα [19]. Αρχικά το ενδιαφέρον στράφηκε στην ταυτοποίηση και μελέτη των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (ΔΚΚ) στο μυελό των οστών.

Ο μυελός των οστών θεωρείται μία δεξαμενή καρκινικών κυττάρων κατά την οποία τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells, CTCs) μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας προκειμένου να επιβιώσουν και να επεκταθούν μέσω της δημιουργίας των μεταστάσεων [20]. Πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει την σημασία της ανίχνευσης των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων (ΔΚΚ) στο μυελό των οστών συνδέοντας τη παρουσία τους με χειρότερη κλινική έκβαση [21], αλλά η διαδικασία της δειγματοληψίας από το μυελό των οστών είναι επίπονη και επώδυνη, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την επανάληψή της σε τακτά χρονικά διαστήματα. Αντίθετα, η διαδικασία της απλής και σχετικά ανώδυνης αιμοληψίας που

μπορεί να πραγματοποιηθεί σε τακτά χρονικά διαστήματα είτε κατά την διάρκεια της θεραπείας των ασθενών είτε της περαιτέρω παρακολούθησής τους, είναι αυτή η οποία προτιμάται προκειμένου να μας δώσει πληροφορίες για την ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.



Joosse, S.A. et al., EMBO Mol Med. 2015; 7(1):1-11

Εικόνα 1. Μεταστατική διαδικασία: Τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία παθητικά ή ενεργά μέσω βιολογικών γεγονότων όπως επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση. Τα ΔΚΚ πρέπει να προσπελάσουν διάφορα εμπόδια προκειμένου να φθάσουν στα απομακρυσμένα όργανα, να αναπτυχθούν τοπικά και να προκαλέσουν μεταστάσεις ή να παραμείνουν σε ληθαργική κατάσταση.

Τα CTCs θεωρούνται ως υγρή βιοψία πραγματικού χρόνου καθώς μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό προφίλ του όγκου αλλά και το φορτίο της νόσου σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή [18,22]. Μπορεί να αποτελέσουν από τα πιο σημαντικά υποσχόμενα τεστ στην ογκολογία όπως αποτελεί η μέτρηση του ζαχάρου για την διαχείριση της θεραπείας με ινσουλίνη στους διαβητικούς [23]. Τα χαρακτηριστικά τους μπορούν να καθορίσουν την επιλογή θεραπειών όσον αφορά στη στόχευση ειδικών μορίων δεικτών που εκφράζονται στα κύτταρα αυτά [24].

Ένας σημαντικός περιορισμός κατά την ανίχνευση των CTCs είναι η μεγάλη ετερογένεια των κυττάρων αυτών ως προς την έκφραση των διαφόρων μορίων. Είναι επίσης γνωστή πλέον η σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης διαφόρων μορίων μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και CTCs, ή ακόμη και μεταξύ μετάστασης και CTCs στον ίδιο ασθενή [25]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί μεγάλη ετερογένεια του μοριακού προφίλ των CTCs μεταξύ διαφορετικών ασθενών [26]. Λόγω της έλλειψης ειδικών δεικτών για τα CTCs, η ταυτοποίησή τους πραγματοποιείται κυρίως βάσει της

ανίχνευσης μορίων που εκφράζονται στα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης και όχι στα κύτταρα του αίματος. Ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου χρησιμοποιούνται δείκτες επιθηλιακής προέλευσης, όπως είναι οι κυτταροκερατίνες (cytokeratin, CK), οι οποίες είναι ενδιάμεσα κυτταροπλασματικά ινίδια, και ο καρκίνο-σχετιζόμενος μεταγωγέας σήματος ασβεστίου EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), ή η απουσία του λευκοκυτταρικού δείκτη CD45 (Cluster of Differentiation 45) ή και άλλων ειδικών δεικτών σε καρκινικούς ιστούς, όπως MUC1 (Mucin 1, Cell Surface Associated) και HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) [27]. Λόγω της σπανιότητας του πληθυσμού των CTCs, ο εμπλουτισμός των κυττάρων αυτών είναι απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευσή τους.

1.3 Τεχνολογίες ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων

Η ανίχνευση των CTCs παραμένει μία μεγάλη τεχνική πρόκληση, παρ όλη την συνεχή ανάπτυξη ολοένα και πιο συναρπαστικών τεχνολογιών [28]. Ωστόσο η ειδικότητα και κλινική χρησιμότητα αυτών των μεθόδων μένει να αποδειχθεί σε μεγάλες προοπτικές πολυκεντρικές μελέτες προκειμένου να ληφθούν σοβαρά υπόψιν στην κλινική πράξη [29]. Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα CTCs συναντώνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο αίμα, ο εμπλουτισμός συνήθως προϋπάρχει της ανίχνευσης [30].

Ο εμπλουτισμός των CTCs επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης διαφόρων τεχνολογιών που βασίζονται στις διαφορετικές ιδιότητες των CTCs που τα κάνουν να ξεχωρίζουν από τα περιβάλλοντα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, όπως είναι το μέγεθος, η πυκνότητα, το ηλεκτρικό φορτίο και η ικανότητα παραμόρφωσης, είτε σε βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η έκφραση ορισμένων μορίων, η βιωσιμότητα και η ικανότητα εισβολής [31]. Ο εμπλουτισμός των CTCs βάσει του αυξημένου τους μεγέθους είναι σήμερα δυνατός μέσω μιας σειράς συσκευών που εμπεριέχουν ειδικά φίλτρα μεμβράνης, όπως είναι οι τεχνολογίες: ScreenCell[®] (French Company) [32], CellOptics[®] [33], η μικροσυσκευή MEMS (PRIME FARADAY) (micro electro-mechanical system) [34] και η τεχνολογία ISET (RARE CELLS) (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells) η οποία δεν στηρίζεται στην ανίχνευση ειδικών δεικτών, αλλά στο μεγαλύτερο μέγεθος των κυττάρων αυτών σε σχέση με τα κύτταρα του αίματος, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να συγκρατούνται πάνω σε μία μεμβράνη για μελλοντικό χαρακτηρισμό μέσω χρώσης με ειδικά αντισώματα ή μοριακής ανάλυσης

DNA/RNA μετά από μικροτόμηση με λέιζερ [35]. Το Parsortix System (Angle, PLC, UK) είναι μία ακόμη τεχνολογία η οποία χρησιμοποιεί αίμα ασθενών για τη συλλογή των νεοπλασματικών κυττάρων βάσει μεγέθους μέσω μιας κασέτας, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να βαφούν με αντισώματα, να χρησιμοποιηθούν για μοριακή ανάλυση είτε ακόμη και να καλλιεργηθούν. Μία άλλη μορφή εμπλουτισμού επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής πυκνότητας των CTCs, όπως για παράδειγμα είναι η φυγοκέντρηση με διαβάθμιση πυκνότητας φικόλης [36] και η συσκευή OncoQuick™ (Hexal Gentech and Greiner Bio-One) [37]. Το μειονέκτημα των παραπάνω μεθόδων είναι η αυξημένη πιθανότητα απώλειας ορισμένων υποπληθυσμών με διαφορετικό μέγεθος και πυκνότητα [36,38], λόγω της μεγάλης ετερογένειας των CTCs.

Μια σειρά από συσκευές έχουν επίσης κατασκευαστεί για το διαχωρισμό των CTCs βάσει της ικανότητας παραμόρφωσης και του ηλεκτρικού τους φορτίου, όπως είναι η φωτοακουστική κυτταρομετρία ροής [39], ένα καινοτόμο τσιπ τρισδιάστατης γεωμετρίας το οποίο βασίζεται στη διαφορετική ικανότητα παραμόρφωσης των κυττάρων [40], συσκευές που χρησιμοποιούν την κλασματοποίηση μέσω πολλαπλών οπών (multiorifice flow fractionation, MOFF) ή τη διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis, DEP) [41,42] και η συσκευή ApoStream, η οποία παγιδεύει τα καρκινικά κύτταρα σε θάλαμο ροής [43].

Μία εναλλακτική προσέγγιση εμπλουτισμού αφορά στον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό των κυττάρων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντισώματα και τη βοήθεια κατάλληλου μαγνήτη, όπως για παράδειγμα είναι η θετική επιλογή των CTCs με τη χρήση σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντίσωμα έναντι του EpCAM, το οποίο εκφράζεται στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων διαφόρων όγκων [44,45]. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η αρνητική επιλογή των CTCs, μέσω απομάκρυνσης των κυττάρων του αίματος έπειτα από χρήση σφαιριδίων με αντίσωμα έναντι του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45 [46]. Η κυριότερη μέθοδος ταυτοποίησης CTCs στο αίμα που βασίζεται στον ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό βάσει της έκφρασης του EpCAM είναι η τεχνολογία CellSearch, η οποία είναι και η μοναδική τεχνική απομόνωσης και ανίχνευσης CTCs με έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) [47] που χρησιμοποιείται σε ασθενείς με καρκίνο μαστού, παχέος εντέρου και προστάτη, αποδεικνύοντας την κλινική σημασία της ανίχνευσης των κυττάρων αυτών [48-50].

Άλλες μεθοδολογίες στις οποίες πραγματοποιείται ανοσομαγνητική απομόνωση βάσει έκφρασης, είναι το MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) [51] και το AdnaTest στο οποίο χρησιμοποιείται ένα μείγμα μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντισώματα έναντι του EpCAM και του MUC1 προκειμένου να απομονώσει τα CTCs και εν συνεχεία μέσω ποσοτικής PCR να ανιχνεύσει γονίδια [52]. Ως εναλλακτικές στρατηγικές των ανοσολογικών μεθόδων για την ανίχνευση των ΚΚΚ που αναπτύχθηκαν, στηρίζονται στην παρουσία mRNA γνωστών μορίων όπως πχ. είναι το CK19 mRNA για τον καρκίνο του μαστού το οποίο πολύ συχνά συναντάται σε κλινικές μελέτες [28]. Κάποια μετάγραφα όπως πχ. αυτά που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες CK18, CK19, CK20, MUC1 PSA, CEA, εκφράζονται παρόλα αυτά σε χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα και στα κύτταρα του μυελού των οστών [28,53] επομένως ποσοτικές RT-PCR με επικαιροποιημένες τιμές cut off απαιτούνται να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα. Το 2011, η Μάρκου με την ομάδα της περιέγραψε μία ευαίσθητη τεχνική [54].

Το CTC chip που αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια αποτελεί μία πλατφόρμα η οποία επιτρέπει την απομόνωση των CTCs από ολικό αίμα, το οποίο ρέει μέσα σε κολώνες ανάμεσα σε μικροβοθρία επικαλυμμένα με αντίσωμα EpCAM υπό ελεγχόμενες συνθήκες ροής και την ανίχνευσή τους με αντισώματα έναντι των CK και CD45 [55,56] με ιδιαίτερα υψηλή απόδοση και καθαρότητα. Αντίστοιχα τσιπ είναι το Ephesia chip [57], το IsoFlux system [58], το Herringbone-Chip [59] και η συσκευή JETTA™ [60].

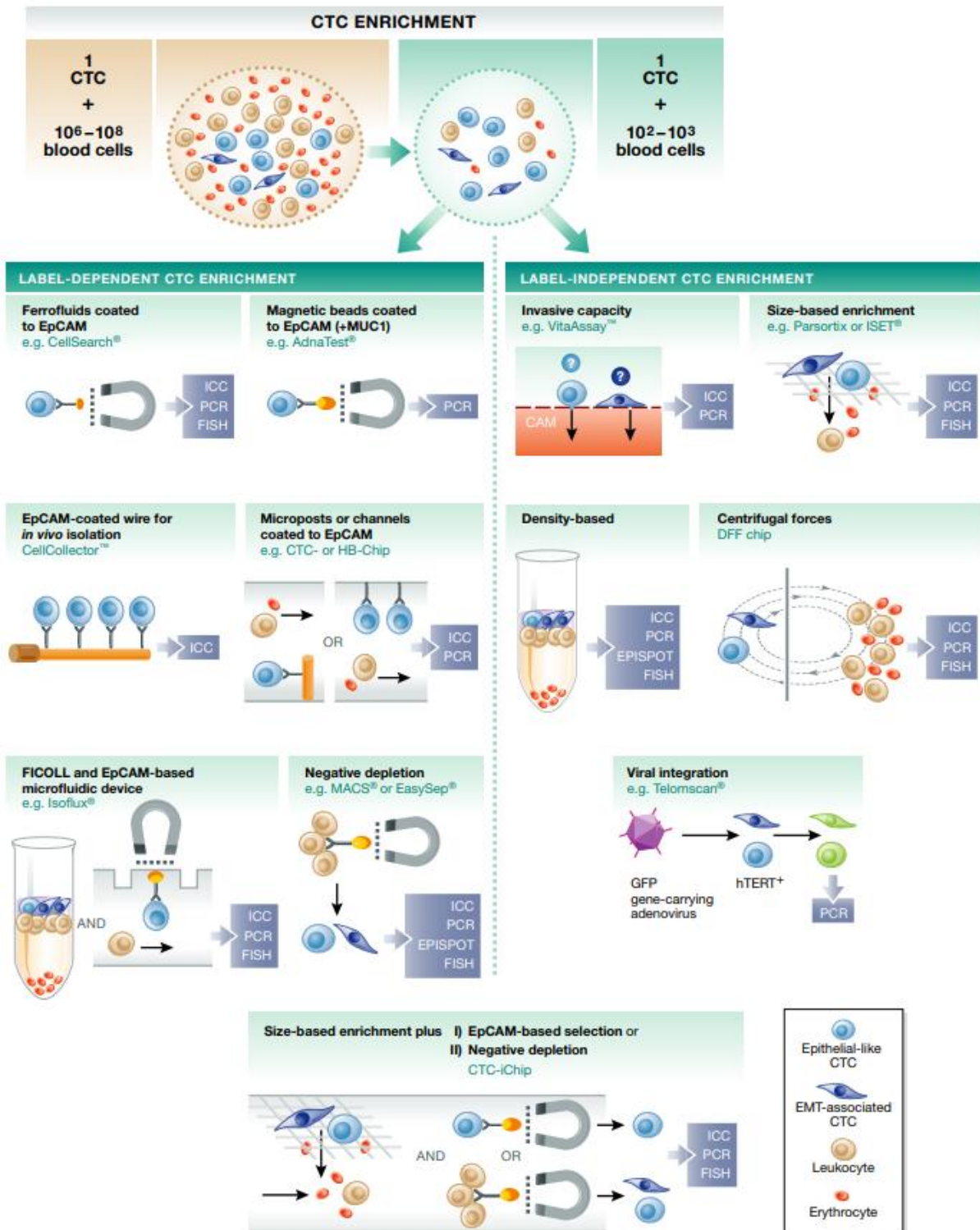
Επίσης, η τεχνική RARE (RosetteSep-Applied imaging Rare Event), η οποία συνδυάζει το μαγνητικό διαχωρισμό των CTCs μέσω έκπλυσης των CD45-θετικών φυσιολογικών κυττάρων και επιπλέον στη διαφορετική πυκνότητα των κυττάρων [61]. Τέλος, μία καινοτόμος τεχνική που περιλαμβάνει τη στόχευση των CTCs σε ολικό αίμα, χρησιμοποιώντας μαγνητική απομόνωση με σφαιρίδια, σε συνδυασμό με φασματοσκοπία και νανοσωματίδια SERS [Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)] συνδεδεμένα με αντίσωμα έναντι των EpCAM, HER2 ή EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) [62,63].

Παρ' όλα αυτά, είναι πλέον γνωστή η αδυναμία των παραπάνω μεθόδων να απομονώσουν τον υποπληθυσμό των CTCs που δεν εκφράζουν το μόριο EpCAM, στα πλαίσια της Επιθηλιο-Μεσεγγυματικής Μετάβασης [Epithelial to Mesenchymal

Transition (EMT)] που συχνά υφίστανται τα καρκινικά κύτταρα κατά την είσοδό τους στη κυκλοφορία [64]. Η μετάβαση αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα αποκτούν μία αυξημένη κινητικότητα, χάνοντας την κυτταρική γεινίαση και μερικώς ή ολικά τον επιθηλιακό τους φαινότυπο (έκφραση epCAM, E-cadherin και CK) σε μεσεγχυματικό (έκφραση N-cadherin, Vimentin). Οι τεχνολογίες βασιζόμενες στην ανίχνευση των επιθηλιακών αντιγόνων, το πιθανότερο είναι να χάσουν υποπληθυσμούς επιθετικών κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων [30], επομένως υπάρχει μια αυξημένη ανάγκη βελτίωσης τεχνολογιών οι οποίες να ανιχνεύουν δείκτες των οποίων η έκφραση δεν μειώνεται αισθητά κατά την επιθηλιο-μεσεγχυματική κατάσταση. Σε καμία από τις μεθόδους ανίχνευσης των CTCs, είτε αυτές βασίζονται στον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, είτε στις διαφορετικές φυσικές ιδιότητες των κυττάρων, δεν επιτυγχάνεται η απόλυτη απομόνωση των CTCs χωρίς πρόσμιξη φυσιολογικών κυττάρων. Αντιθέτως, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που επιτρέπουν την απομόνωση μεμονωμένων CTCs με απόλυτη καθαρότητα, όπως είναι η απομόνωση με τη βοήθεια του ειδικού μικροχειριστή TransferMan NKII [65] και το αυτοματοποιημένο σύστημα DEPArray, το οποίο απομονώνει μονήρη CTCs μέσω διηλεκτροφόρησης, έπειτα από ανοσομαγνητικό εμπλουτισμό μέσω του Cell Search System [66]. Η VyCAP είναι μία εταιρεία βιοτεχνολογίας η οποία σχεδιάζει εξοπλισμό για την απομόνωση, ανίχνευση και ανάλυση καρκινικών κυττάρων από βιολογικά δείγματα. Ο εξοπλισμός εμπεριέχει το hardware, software και επικαιροποιημένα πρωτόκολλα. Η ανίχνευση των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω ενός συστήματος φιλτραρίσματος που χρησιμοποιεί φίλτρο με προκαθορισμένους πόρους ($5.0 \pm 0.2\mu\text{m}$) και ενός απεικονιστικού συστήματος που αναλύει τα επιλεγμένα κύτταρα (VyCAP FORMAL SITE).

Μία επίσης ιδιαίτερα καινοτόμος μεθοδολογία που αναπτύχθηκε πρόσφατα είναι το CellCollectorTM, το οποίο αποτελείται από ένα ειδικό σύρμα επικαλυμμένο με ανοσοσφαιρίδια EpCAM, το οποίο εισέρχεται μέσω ειδικού καθετήρα στη φλέβα του ασθενή, επιτρέποντας την in vivo ανίχνευση των CTCs στην κυκλοφορία (Gilupi nanodetector^R) με την παγίδευση τους από τα ανοσοσφαιρίδια anti-EpCAM. Η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση 1,5 λίτρου αίματος σε διάρκεια μισής ώρας, αυξάνοντας κατά πολύ την ευαισθησία της μεθόδου [67]. Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι η ανάπτυξη της λευκαφαίρεσης και έκλουσης αίματος ασθενών για την περαιτέρω ανάλυση CTCs ex vivo χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής και την

αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για μοριακό χαρακτηρισμό [68].



Joosse, S.A. et al., EMBO Mol Med. 2015;7(1):1-11

Εικόνα 2. Τεχνολογίες εμπλουτισμού και ανίχνευσης των ΚΚΚ.

Από την άλλη πλευρά, τεχνικές υψηλές σε ειδικότητα και ευαισθησία όσον αφορά την ανίχνευση κυκλοφορούντος DNA που απορρέει από καρκινικά κύτταρα του όγκου (circulating tumor DNA, ctDNA) και έχει υποστεί αλλαγές, έχουν αναπτυχθεί και οι οποίες θα μπορούσαν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες στην κλινική πράξη. Η συγκέντρωση του ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA είναι υψηλή στους καρκινοπαθείς. Νωρίς στο μονοπάτι της καρκινογένεσης, αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα απελευθερώνουν DNA στην κυκλοφορία του αίματος [29]. Στο περιφερικό αίμα, το κυκλοφορούν DNA συναντάται πρωτίστως με την μορφή των νουκλεοσωμάτων, υποδεικνύοντας ότι διατηρεί έστω και ελάχιστα χαρακτηριστικά της χρωματίνης του πυρήνα. Το DNA μπορεί να απομονωθεί από το αίμα και οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές μπορούν να καθοριστούν [69]. Επιγενετικές αλλαγές αφορούν την μεθυλίωση του DNA και αλλαγές στην διάταξη της χρωματίνης των ιστονών [70]. Επιγενετικές αλλαγές σε χρωμοσωμικές περιοχές γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση μπορεί να επηρεάσει ρυθμιστικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην κακοήγη μεταλλαγή. Ωστόσο οι αλλαγές στο κυκλοφορούν DNA στο αίμα δεν μοιάζουν απαραίτητα με τις αλλαγές που συμβαίνουν στον πρωτοπαθή όγκο. Αυτό εν μέρει μπορεί να οφείλεται στα ΚΚΚ ή στα ΔΚΚ τα οποία και αυτά με την σειρά τους απελευθερώνουν DNA στην κυκλοφορία του αίματος.

Η ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στο ctDNA μπορεί να δώσει αντιπροσωπευτική πληροφορία για το γονιδίωμα του όγκου και να αποτελέσει μία εναλλακτική μη επεμβατική μέθοδος. Το ctDNA δίνει το περιθώριο ελέγχου της ανταπόκρισης στην θεραπεία και την αποφυγή αναποτελεσματικών θεραπειών, όπως και η αυξημένη ανίχνευση των επιπέδων του μπορεί να προβλέψει επιθετικότητα της ασθένειας αρκετό διάστημα πριν τις απεικονιστικές μεθόδους [71]. Τέλος, η τεχνολογία EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT) αποτελεί μία μεθοδολογία που ταυτοποιεί έμμεσα την παρουσία ζωντανών CTCs τα οποία είναι και τα λειτουργικά τα οποία θα δώσουν μεταστάσεις, μέσω ανίχνευσης των πρωτεϊνών που εκκρίνονται ή διαχέονται ελεύθερα από τα CTCs σε καλλιέργεια που διαρκεί 24 με 48 ώρες [72].

Στον Πίνακα 1 παραθέτονται κάποιες από τις τεχνολογίες ανίχνευσης των καρκινικών κυττάρων και οι αρχές λειτουργίας τους [30].

Table 1. Current technologies for CTC detection

Assay system	Enrichment	Detection	Comments
EPCAM-based assays			
CellSearch® system	Immunomagnetic beads: EpCAM-Ab-coupled ferrofluid	Immunocytochemistry: Positive for CK8, 18, 19 Negative for CD45 Nucleus positive for DAPI	Semi-automated system with FDA approval for metastatic breast, colon and prostate cancer. CTC can be enumerated and visualized [2]
CTC-chip	Microposts: EpCAM-Ab-coupled microposts	Immunocytochemistry: Positive for CK8, 18, 19 Negative for CD45 Nucleus positive for DAPI	Semi-automated system with FDA approval for metastatic breast, colon and prostate cancer. CTC can be enumerated and visualized [2]
CTC-chip Ephesia	Column of nanobeads: EpCAM-Ab-coupled ferrofluids	Immunocytochemistry: Positive for CKs Negative for CD45 Nucleus positive for DAPI	High detection rate (approximately 100%) even in M ₀ -patients warrants further investigations on assay specificity; the Herringbone second generation of this microchip is more specific. Needs to be validated in clinical trials [67-70]
MagSweeper	Immunomagnetic beads: EpCAM-Ab-coupled ferrofluids	Immunocytochemistry: Positive for CK8, 18, 19 Negative for CD45 Nucleus positive for DAPI	Lack of validation studies in clinical settings [71]
Laser scanning cytometry Maintrac®	RBC lysis	Immunocytochemistry: Positive for EpCAM Negative for CD45	Isolation of C _{epC} with a high degree of purity. Analysis of large blood volume [72]
	RBC lysis	Immunocytochemistry: Positive for EpCAM Negative for CD45	High incidence of positive events up to 3 logs higher CTC counts than those obtained with other techniques warrants further investigations of assay specificity [73]
Ikonoscope® imaging system	Ficoll-Isopaque or filtration with track-etched membranes	Immunocytochemistry: Positive for EpCAM, CK7/8 PSA (prostate only)	High incidence of positive events up to 3 logs higher CTC counts than those obtained with other techniques warrants further investigations of assay specificity [73]
	Ficoll-Isopaque or filtration with track-etched membranes	Immunocytochemistry: Positive for EpCAM, CK7/8 PSA (prostate only) FISH: chromosomes 7 and 8 Nucleus positive for DAPI	Two epithelial specific Abs and FISH to detect chromosomal abnormalities in CTCs [74]
Ariol® system	RBC lysis, then immunomagnetic beads: CK-Ab- + EpCAM-Ab-coupled ferrofluids	Immunocytochemistry: Positive for CK8, 18, 19 Negative for CD45	Two epithelial specific Abs and FISH to detect chromosomal abnormalities in CTCs [74]
AdnaTest	Immunomagnetic beads: MUC1-, EpCAM-Ab-coupled microbeads	Nucleus positive for DAPI Molecular biology: RT-PCR Positive for at least one of the following markers: MUC1, HER2, EpCAM	Detection of EpCAM ⁺ and EpCAM ⁻ CTCs [75]
Functional assays EPISPOT assay	Rosette plus Ficoll:		Detection of EpCAM ⁺ and EpCAM ⁻ CTCs [75]
	Depletion of CD45 cells	Secretion of proteins: CK19, MUC1, Cath-D (breast); CK19 (colon); PSA (prostate); TG (thyroid)	Detection of EpCAM ⁺ and EpCAM ⁻ CTCs [75]
Vita-Assay™ or Collagen Adhesion Matrix (CAM) technology	Invasion capacity: Ingestion of fluorescent CAM fragments (CAM+) Invasion capacity: Ingestion of fluorescent CAM fragments (CAM+)	Immunocytochemistry: Positive for EpCAM, ESA, pan-CK 4, 5, 6, 8, 10, 13 and 18 Negative for CD45	AdnaTest also does not quantify the tumour cell load, false positive results due to unspecific amplification, no further analysis possible [76]
			Detection of viable epithelial secreting-cells; unbiased enrichment independent of CTC/DTC phenotype [41,77]
			Detection of CTCs with the invasive phenotype in blood [78]
			Detection of CTCs with the invasive phenotype in blood [78]

Others ISET	Cell size	Immunocytochemistry: Positive for CK Nucleus: Mayer's hematoxylin	Sensitivity threshold of one carcinoma cell per milliliter of blood; HER2 amplification determined by real-time PCR on DNA extracted from CK immunostained cells (CTCs) collected by laser microdissection from selected ISET-positive filters; the possibility of false-positive diagnosis stresses the need for using ancillary methods to improve this approach [79-81]
FAST (fiber-optic array scanning technology)	No pre-enrichment	Immunofluorescence: Positive for CK	Rare cells detected by laser scanning to almost 1,000 times faster than digital microscopy [82,83]
	No pre-enrichment	Immunofluorescence: Positive for CK Nucleus positive for DAPI Morphology	Rare cells detected by laser scanning to almost 1,000 times faster than digital microscopy [82,83]
DEP-FFF (dielectrophoretic field-flow fractionation)	Phenotype - membrane capacitance	Immunocytochemistry: Wright stain	No need for labeling or modification of CTCs; PBMC/CTC ratio is enriched more than 2000-fold; CTCs isolated by DEP are viable and suitable for a wide spectrum of analyses [84]
	Phenotype - membrane capacitance	Immunocytochemistry: Wright stain	No need for labeling or modification of CTCs; PBMC/CTC ratio is enriched more than 2000-fold; CTCs isolated by DEP are viable and suitable for a wide spectrum of analyses [84]
Versatile label free biochip	Cell size deformability	Immunofluorescence: Positive for CK	Label free selection and CTCs are viable after blood processing [85]
	Cell size deformability	Immunofluorescence: Positive for CK Negative for CD45 Nucleus positive for DAPI Morphology	Label free selection and CTCs are viable after blood processing [85]

Abbreviations: Ab, antibody; BM, bone marrow; Cath-D, cathepsin D; CepC, circulating epithelial cell; CK, cytokeratin; CTC, circulating tumor cell; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DEP, dielectrophoresis; DTC, disseminated tumor cell; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; EPISPOT, EPithelial immunoSPOT; ESA, epithelial specific antigen; FDA, Food and Drug Administration; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; ISET, isolation by size of epithelial tumor cells; MUC1, mucine 1; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PSA, prostate specific antigen; RBC, red blood cell; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; TG, thyroglobulin. [30]

1.4 Τεχνολογίες ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη

Μία γενική ταξινόμηση των μεθοδολογιών ανίχνευσης των CTCs στηρίζεται στην ανίχνευση πρωτεϊνών που εκφράζονται στα κύτταρα ή των νουκλεϊκών οξέων τους, κατηγοριοποιώντας τις σε κυτταρομετρικές και μοριακές, αντίστοιχα [31]. Και οι δύο κατηγορίες βασίζονται στη χρήση ειδικών δεικτών, ωστόσο οι κυτταρομετρικές μέθοδοι εμπεριέχουν σε μεγαλύτερο βαθμό τον παράγοντα της υποκειμενικής αξιολόγησης. Η υποκειμενικότητα αφορά ακόμη και τις ημι-αυτοματοποιημένες μεθόδους, όπως το Cell Search System. Το συγκεκριμένο μηχάνημα αποτελείται από 2 μέρη: α) το Cell Tracks AutoPrep System και β) το Cell Tracks Analyzer II.



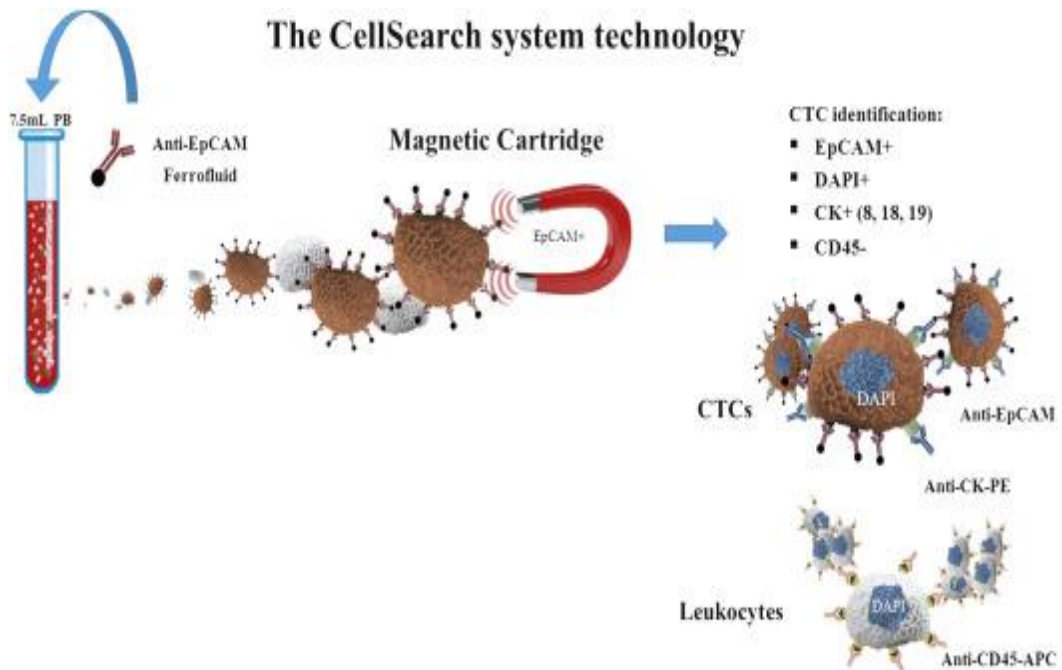
Εικόνα 3. Cell Search System Overview

Στο πρώτο τμήμα γίνεται απομόνωση των επιθηλιακών κυττάρων με την χρήση του **CELL SEARCH EPITHELIAL CELL KIT** το οποίο περιέχει μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με anti-EpCAM αντισώματα.



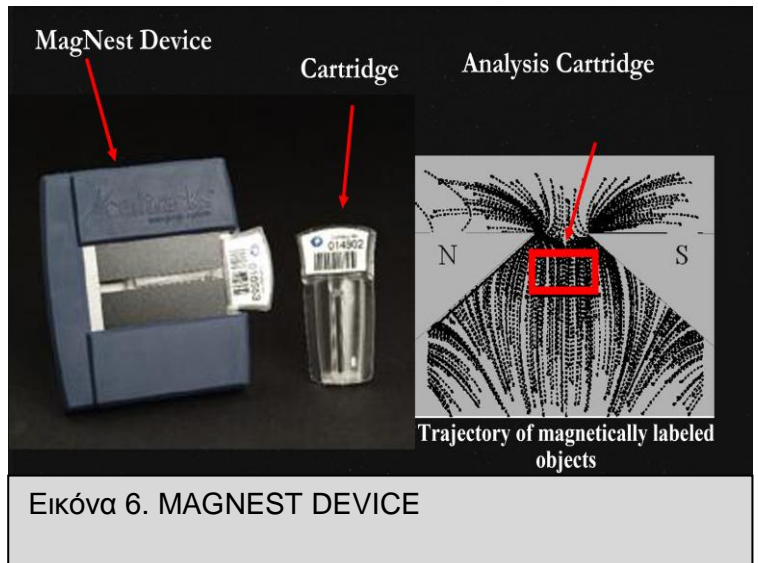
Εικόνα 4. CELL SEARCH EPITHELIAL CELL KIT

Στη συνέχεια, ακολουθεί η χρώση των απομονωθέντων επιθηλιακών κυττάρων με φθορίζοντα αντισώματα έναντι των κυτταροκερατινών 8, 18, 19 (anti-CK PE) και του CD45 μεμβρικού υποδοχέα των λευκοκυττάρων (Anti-CD45 APC), ώστε να υπάρξει διαχωρισμός από την πληθώρα των αιμοποιητικών. Επίσης πραγματοποιείται πυρηνική χρώση με 4',6-diamidino-2-phenylindole/DAPI για τον εντοπισμό των πυρήνων ενώ υπάρχει και η δυνατότητα χρήσης ενός ακόμη αντισώματος επιλογής [48] για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

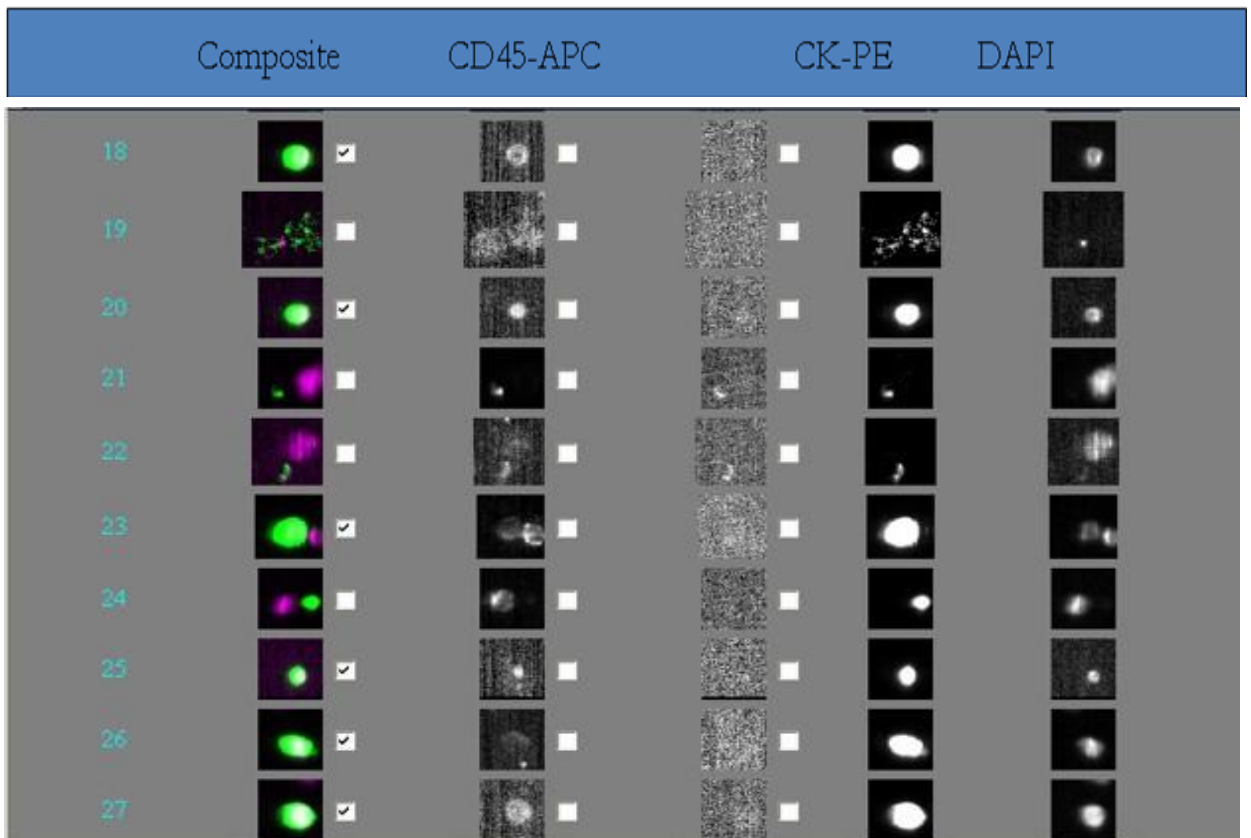


Εικόνα 5. ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ CELLSEARCH

Στο δεύτερο τμήμα του συστήματος, το τελικό προϊόν από την πρώτη επεξεργασία που περιέχει τα επιλεγμένα κύτταρα σε ένα τριχοειδές, αποθηκεύεται σε μία μαγνητική φωλιά η οποία αποτελείται από δύο μαγνήτες που ενώνονται μεταξύ τους με ένα μέταλλο. Η φωλιά τοποθετείται σε μία βάση όπου σαρώνεται όλη η επιφάνειά της από ένα ημί-αυτόματο μικροσκόπιο φθορισμού με 4 φίλτρα και μία ψηφιακή κάμερα η οποία συλλέγει εικόνες.



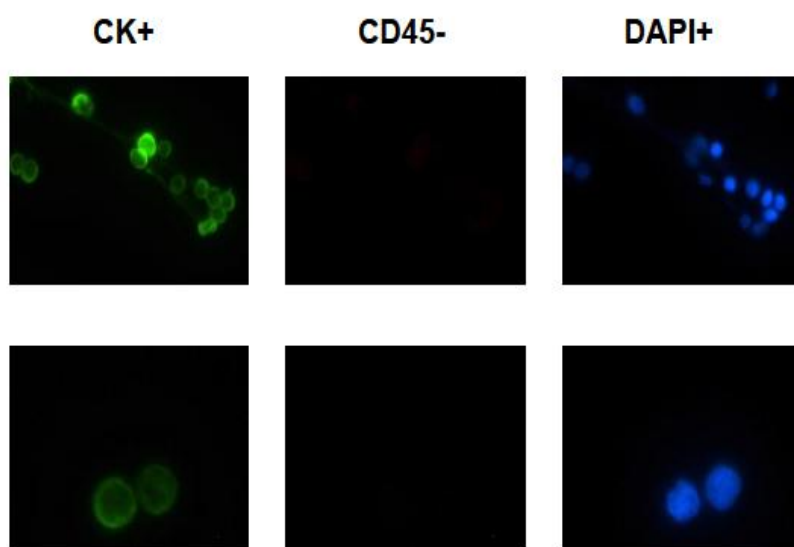
Οι εικόνες που συγκεντρώνονται, ομαδοποιούνται και προβάλλονται στην οθόνη ενός υπολογιστή, έτοιμες για αξιολόγηση από τον εκάστοτε χειριστή. Τα μικρομεταστατικά κυττάρα ταυτοποιούνται με βάση τον φαινότυπο DAPI(+), CD45(-), CK(+). (Cell Search System Manual, Veridex)



Εικόνα 7. Συλλογή εικόνων όπως απεικονίζονται στο Cell Search System

Μία άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των CTCs είναι η ανοσοκυτταροχημεία η οποία στηρίζεται στη χρήση αντισωμάτων ειδικών έναντι μεμβρανικών ή κυτταροπλασματικών αντιγόνων των μικρομεταστατικών κυττάρων και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες ανίχνευσης των κυττάρων αυτών στο μυελό των οστών. Η ανοσοκυτταροχημεία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και 1-2 καρκινικά κύτταρα σε 1.000.000 φυσιολογικά μονοπύρηνια κύτταρα μυελού των οστών. Η μέθοδος μπορεί να αυτοματοποιηθεί με την χρήση ενός σαρωτή που γρήγορα και αξιόπιστα μπορεί να εκτελέσει την μικροσκοπική απεικόνιση ενός μεγάλου αριθμού κυτταρολογικών δειγμάτων και να ανιχνεύσει τα μικρομεταστατικά κύτταρα [73].

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιεί αντισώματα ειδικά για αντιγόνα επιθηλιακής προέλευσης τα οποία προσδένονται με φθορίζουσες χρωστικές και ανιχνεύουν τα κύτταρα του ενδιαφέροντός μας με το μικροσκόπιο φθορισμού.



Εικόνα 8. Ανοσοφθορισμός

Πέραν του απλού μικροσκόπιου φθορισμού και της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) που έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CTCs [74,75], τα τελευταία χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί ένα ημι-αυτοματοποιημένο σύστημα μικροσκοπίας φθορισμού, το σύστημα ARIOL, το οποίο περιλαμβάνει λογισμικό κατασκευασμένο ειδικά για την ανίχνευση των CTCs [76,77]. Η μεθοδολογία αυτή

παρέχει τη δυνατότητα του πολλαπλού ταυτόχρονου χαρακτηρισμού των CTCs έπειτα από ανοσοφθορισμό με διαφορετικά αντισώματα, την αυτόματη σάρωση μεγάλου αριθμού δειγμάτων και τον εντοπισμό των CTCs βάσει κριτηρίων που ορίζονται από το χειριστή. Το σύστημα ARIOL επιτρέπει επίσης τον περαιτέρω φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των CTCs ως προς επιπλέον μόρια του ενδιαφέροντος, ανάλογα με τις ανάγκες κάθε μελέτης, καθώς επίσης και την ποσοτικοποίηση της έντασης της έκφρασης κάθε μορίου, συμβάλλοντας στην πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση της αξιολόγησης των CTCs στη βάση της σημαντικής τους ετερογένειας.



Εικόνα 9. ARIOL SYSTEM

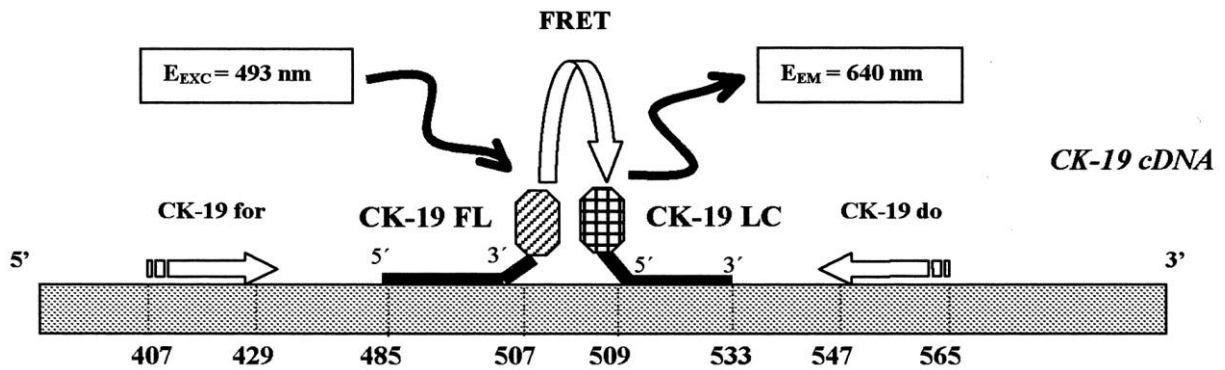
Η ανίχνευση των CTCs έχει επίσης επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια μέσω απλής κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση αντισωμάτων έναντι EpCAM, CK και CD45 [78].

Οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης των CTCs θεωρούνται πιο ευαίσθητες και αντικειμενικές σε σχέση με τις κυτταρομετρικές μεθόδους. Ωστόσο δεν επιτρέπουν το μορφολογικό χαρακτηρισμό των κυττάρων και επιπλέον απαιτούν καλύτερο εμπλουτισμό του δείγματος σε CTCs, καθώς η πρόσμιξη με τα φυσιολογικά κύτταρα μειώνει πολύ την ειδικότητά τους [79,80]. Η ανίχνευση του DNA των CTCs είναι δυνατή μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), η οποία ωστόσο έχει το μειονέκτημα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, λόγω της ανίχνευσης και του ελεύθερου DNA που απελευθερώνεται στο αίμα από αποπτωτικά CTCs [81]. Για το λόγο αυτό οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) για την ανίχνευση του mRNA, το οποίο προέρχεται κυρίως από ζωντανά CTCs δεδομένου του ιδιαίτερα μικρού χρόνου

ζωής του [82]. Η προγνωστική αξία της ανίχνευσης γονιδίων που σχετίζονται με καρκινικά και επιθηλιακά αντιγόνα, έχει επανειλημμένα δειχθεί μέσω RT-PCR στον καρκίνο του μαστού, με το mRNA της CK19 να αποτελεί το συχνότερα μελετημένο μόριο σε κλινικές μελέτες [83-85]. Η CK19 είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού η οποία εκφράζεται στα επιθηλιακά αλλά όχι στα μεσεγχυματικά κύτταρα. Το γονίδιο της CK19 έχει εντοπισθεί στο χρωμόσωμα 17, συνίσταται από 4667 νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει 6 εξώνια και 5 ιντρόνια. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης επιτρέπει την ειδική ενζυμική ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Στην περίπτωση ενίσχυσης ενός τμήματος RNA, ένα περαιτέρω βήμα αντίστροφης μεταγραφής του RNA σε cDNA μέσω της χρήσης ενός ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης πρέπει να προηγηθεί της RT-PCR. Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο συνθετικά τμήματα DNA (εκκινητές ή primers), οι οποίοι αντίστοιχα υβριδοποιούνται σε κάθε μία από τις δύο έλικες του DNA που μας ενδιαφέρει. Στο σημείο πάνω στο DNA όπου εγκαθίστανται οι εκκινητές, η DNA πολυμεράση συνθέτει μια συμπληρωματική έλικα. Η συνεχής δημιουργία καινούργιου κλώνου βοηθάει στην ενίσχυση της αλληλουχίας του DNA-στόχου (PCR-A revolutionary method in Diagnostics, Roche). Το προϊόν αυτής της πρώτης PCR χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για μια δεύτερη αντίδραση PCR (nested PCR). Για την nested PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών, συμπληρωματικό ως προς την αλληλουχία-στόχο, που υβριδοποιείται σε εσωτερική περιοχή από αυτής της πρώτης PCR. Το τελικό προϊόν από τις 2 αντιδράσεις PCR εντοπίζεται αφού γίνει ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι κύριοι περιορισμοί στις μοριακές μεθόδους είναι η ετερογένεια της έκφρασης των διαφόρων δεικτών, καθώς επίσης και η σημαντική πρόσμιξη των δειγμάτων με φυσιολογικά κύτταρα του αίματος, τα οποία είναι δυνατόν να εκφράζουν επιθηλιακούς ή καρκινικούς δείκτες, αν και σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα [86,87]. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται πλέον ευρέως η ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), η οποία παρέχει τη δυνατότητα αφενός της ποσοτικοποίησης του καρκινικού φορτίου και αφετέρου του προσδιορισμού ενός ορίου μεταγράφων του εκάστοτε δείκτη μεταξύ θετικού και αρνητικού σε CTCs δείγματος, αυξάνοντας ιδιαίτερα την ειδικότητα της ανίχνευσης [28,88,89]

Στην περίπτωση της real time RT-qPCR, η εντόπιση του προϊόντος της PCR γίνεται με τη βοήθεια ενός ζεύγους ανιχνευτών υβριδισμού που είναι σημασμένοι με χρωστικές (χρωστική/δότης-χρωστική/δέκτης). Μέσω του φαινομένου FRET

(Fluorescence Resonance Energy Transfer), στο τελικό στάδιο η χρωστική-δέκτης εκπέμπει φθορισμό, η ένταση του οποίου προσδιορίζεται σε κατάλληλο μήκος κύματος από ένα μηχάνημα π.χ. το LightCycler (Roche) και είναι ανάλογη του ποσού του DNA που συντίθεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης της PCR (PCR-A revolutionary method in Diagnostics, Roche).



Εικόνα 10. Αρχή λειτουργίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για την CK-19 mRNA [87]

1.5 Κλινική σημασία ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων

Η ανίχνευση των CTCs μέσω της ανάπτυξης των τεχνολογιών σε πρώιμο ή μεταστατικό στάδιο ανάπτυξης του καρκίνου, μπορεί να μας επιτρέψει να εκτιμήσουμε το ρίσκο υποτροπής και επιβίωσης. Πολλές ερευνητικές ομάδες ασχολούνται και έχουν αναδείξει την σημαντική προγνωστική σημασία των CTCs στον μεταστατικό καρκίνο μαστού [16,40], και σε άλλους συμπαγείς καρκίνους όπως ο προστάτης [49], ο κολοορθικός καρκίνος [50] και ο πνεύμονας [90,91] και τα οποία δείχνουν να υπερτερούν των συμβατικών απεικονιστικών μεθόδων σχετικά με την εκτίμηση της ανταπόκρισης [92]. Ωστόσο, η μεγάλη πρόκληση για τις τεχνολογίες ανίχνευσης αφορά ασθενείς σε πρώιμα στάδια όπου το φορτίο νόσου είναι ιδιαίτερα χαμηλό. Ενθαρρυντικά είναι τα στοιχεία όσον αφορά τα CTCs σε χαμηλά επίπεδα, τα οποία δείχνουν να έχουν προγνωστική σημασία στον καρκίνο του μαστού [17,93] στον γυναικολογικό καρκίνο [94,95] και κολοορθικό καρκίνο [96]. Η ανάλυση μεγαλύτερων ποσοτήτων αίματος θα μπορούσε να βοηθήσει στην καλύτερη ανίχνευση των CTCs σε αυτή την ομάδα ασθενών [67,97].

Μελέτες που διενεργήθηκαν στο εργαστήριό μας, έδειξαν ότι η μοριακή ανίχνευση CK19 mRNA θετικών κυττάρων μέσω nested RT-PCR στο περιφερικό αίμα ασθενών σταδίου I και II καρκίνου του μαστού πριν την χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας που σχετίζεται με κακή έκβαση της νόσου [98]. Σε μία άλλη μελέτη που έγινε σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού μετά το πέρας της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, φάνηκε ότι η μοριακή ανίχνευση CK19 mRNA θετικών κυττάρων μέσω nested RT-PCR, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μειωμένο ελεύθερου νόσου διάστημα σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού που είχαν λιγότερους από τέσσερις διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες [99].

Στο εργαστήριό μας, δεδομένα σε μεγάλο αριθμό ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, η μοριακή ανίχνευση CK19 mRNA θετικών κυττάρων σε περιφερικό αίμα μέσω real time RT-qPCR πριν την χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας βρέθηκε ότι ήταν ανεξάρτητος κακός προγνωστικός δείκτης ιδιαίτερα σε ασθενείς με όγκους αρνητικούς σε οιστρογονικούς υποδοχείς (ER-negative), τριπλά αρνητικούς (triple negative) και HER-2 θετικούς όγκους [100]. Επίσης με την ίδια μεθοδολογία αποδείχτηκε ότι η ανίχνευση των CK19 mRNA θετικών κυττάρων καθ' όλη την διάρκεια χορήγησης συμπληρωματικής θεραπείας με ταμοξιφένη, αποτελεί ένα ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό παράγοντα που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, μειωμένο ελεύθερου νόσου διάστημα, μειωμένη συνολική επιβίωση και θάνατο από τη νόσο [101].

Σε μία πρόσφατη μελέτη, η ανίχνευση CK19 mRNA θετικών CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, πριν και μετά το πέρας της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για πρώιμη υποτροπή [102]. Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον αφορά την ανάδειξη της κλινικής σημασίας ανίχνευσης των CTCs, οδήγησε στην πρώτη μελέτη STIC CTC METABREAST η οποία έδειξε ότι με την ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, τους έθεσε υπό χημειοθεραπεία ή ορμονοθεραπεία. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένα CTCs οι οποίοι σύμφωνα με τους κλινικούς, θεωρήθηκαν χαμηλού ρίσκου, τελικά ευνοήθηκαν από την χορήγηση

χημειοθεραπείας [127]. Επίσης σε μία άλλη μελέτη, η ανίχνευση CK19 mRNA θετικών CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο μετά το πέρας της πρώτης γραμμής θεραπείας σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση [103].

Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού η ανίχνευση CK19 mRNA θετικών κυττάρων στο αίμα μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο πριν την έναρξη πρώτης γραμμής θεραπείας αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης όπως απεδείχθη σε μία άλλη μελέτη του εργαστηρίου [104].

Μελέτες έδειξαν ότι η ανίχνευση CK θετικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού με την τεχνολογία CellSearch System (≥ 5 κύτταρα/7.5 ml ολικού αίματος) πριν την χορήγηση χημειοθεραπείας, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα και σχετίζεται με μειωμένο ελεύθερου νόσου διάστημα και συνολική επιβίωση [48]. Σε μία άλλη μελέτη, η ανίχνευση CK θετικών κυττάρων με την τεχνολογία CellSearch (≥ 5 κύτταρα/7.5 ml ολικού αίματος) στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού καθ' όλη την διάρκεια χορήγησης της χημειοθεραπείας, ήταν μία σαφής ένδειξη ταχείας εξέλιξης της νόσου λόγω ανθεκτικότητας στη θεραπεία και αυξημένης θνησιμότητας [105]. Ο Hayes και οι συνεργάτες του εκτίμησαν τη συνολική επιβίωση [Overall Survival (OS)] και το ελεύθερο νόσου διάστημα [Disease Free Survival (DFS)] σε 4 ομάδες ασθενών: α) < 5 CTCs /7.5ml αίματος σε όλες τις αιμοληψίες, β) ≥ 5 CTCs/7.5ml στην αρχική αιμοληψία και < 5 CTCs/7.5ml στην τελευταία αιμοληψία γ) < 5 CTCs/7.5ml στην αρχική αιμοληψία και ≥ 5 CTCs/7.5ml στην τελευταία αιμοληψία και δ) ≥ 5 CTCs/7.5ml σε όλες τις αιμοληψίες. Η τελευταία κατηγορία ασθενών ήταν αυτή οι οποία είχε το μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα και μειωμένη συνολική επιβίωση σε σχέση με τις υπόλοιπες. Επίσης, η ομάδα των ασθενών με ≥ 5 CTCs/7.5ml που μεταβλήθηκε σε < 5 CTCs/7.5ml κατά την διάρκεια της θεραπείας εμφάνισαν DFS και OS παρόμοια με αυτή των ασθενών που δεν ήταν ποτέ αυξημένα. Τέλος, σε ασθενείς που είχαν < 5 CTCs και μεταβλήθηκαν σε ≥ 5 CTCs σε 7.5ml αίματος, η συνολική επιβίωση ήταν μειωμένη σε σχέση με την συνολική επιβίωση ασθενών στους οποίους τα CTCs παραμένουν χαμηλά, αλλά μεγαλύτερη από αυτών που το φορτίο τους ήταν πάντα αυξημένο. Ο Cristofanilli έδειξε επίσης ότι η ανίχνευση ≥ 5 CTCs/7.5ml ήταν προγνωστικός παράγοντας μειωμένης συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς με ER

θετικό/HER-2 αρνητικό και τριπλά αρνητικό μεταστατικό καρκίνο μαστού πέραν από το φορτίο της νόσου [106].

Σε μία πολυκεντρική μελέτη που διεξήχθη σε δύο διαφορετικά κέντρα στην Γερμανία ελέγχθηκε η αναλυτική ικανότητα δύο διαφορετικών μηχανημάτων Cell Search ως προς την ανίχνευση κυττάρων ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού. Διπλά δείγματα από 14 ασθενείς εξετάσθηκαν ξεχωριστά από δύο διαφορετικά Cell Search μηχανήματα και παρατηρήθηκε συμφωνία σε ποσοστό 78.6% [107]. Μία τέτοια μελέτη θα άξιζε τον κόπο να διεξαχθεί σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού όπου το φορτίο νόσου είναι αρκετά χαμηλό.

Στην μελέτη SUCCESS που πραγματοποιήθηκε σε πληθυσμό 1767 ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού και θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες όπως επίσης και σε υψηλού κινδύνου ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες πριν και μετά το πέρας της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας βασισμένη σε ταξάνες, >1 CTCs/23ml ανιχνεύθηκε στο 9.6% των ασθενών την στιγμή της διάγνωσης πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας. Από τους ασθενείς που ήταν αρχικά CTCs θετικοί, 10% παρέμειναν θετικοί και 90% ήταν αρνητικοί μετά την χημειοθεραπεία [108]. Οι ασθενείς στους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου CTCs είχαν σημαντικά καλύτερη πρόγνωση [109].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη μεθοδολογιών που στοχεύουν στην αποτελεσματική απομόνωση και ανίχνευση των CTCs στο αίμα ασθενών με καρκίνο είναι ραγδαία. Παρόλα αυτά η ασυμφωνία ως προς την ευαισθησία των μεθόδων ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων είναι μεγάλη [110,111], γεγονός που δυσχεραίνει την εφαρμογή τους στην καθημερινή κλινική πράξη. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι α) να συγκρίνουμε τρεις μεθοδολογίες ανίχνευσης των κυττάρων στο αίμα ασθενών με μεταστατικό και πρώιμο καρκίνο μαστού συγκεκριμένα την ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του CK19 mRNA, τον ανοσοφθορισμό σε επιστρωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες και την πλατφόρμα Cell Search System και β) να εκτιμήσουμε την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης σε συσχέτιση με την κλινική έκβαση των ασθενών.

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Ασθενείς

200 ασθενείς με πρώιμο καρκίνο και 164 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού που εξετάστηκαν στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου καθώς και στην Ογκολογική Κλινική του Θεραπευτηρίου ΙΑΣΩ Αθηνών και οι οποίοι ήταν μεγαλύτεροι των 18 χρονών και χωρίς ιστορικό άλλης κακοήθειας τα τελευταία 5 χρόνια πήραν μέρος στην μελέτη, για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα τους προ της έναρξης συμπληρωματικής ή πρώτης γραμμής θεραπείας αντίστοιχα. 26 φυσιολογικοί αιμοδότες συμπεριελήφθησαν στην μελέτη σαν ομάδα ελέγχου. Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν την έγγραφη συγκατάθεσή τους προκειμένου να πάρουν μέρος στην μελέτη.

3.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος

Από κάθε συμμετέχοντα ελήφθησαν 20 ml φλεβικού αίματος σε σωληνάρια που περιέχουν EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ/ethylenediamine tetraacetic acid) μία ουσία με αντιπηκτική δράση. Τα πρώτα 5ml αίματος που ελήφθησαν, απορρίφθηκαν προκειμένου να αποφευχθεί η πρόσμιξη με τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος. Το αίμα αραιώνεται με ίσο όγκο ισότονου διαλύματος 0,9% NaCl και στρώνεται στάγδην σε δύο σωληνάρια πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50ml που περιέχουν 12.5 ml Ficoll-Hyraque 1077 (Sigma) υπό στείρες συνθήκες και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σωληνάρια φυγοκεντρώνονται στις 1800 στροφές/λεπτό (rpm) για 30 λεπτά χωρίς φρένο στους 4°C . Μετά τη φυγοκέντρηση, λόγω της ειδικής πυκνότητας της φικόλης (1,077 gr/ml), δημιουργείται ένας δακτύλιος μεταξύ του κλάσματος της φικόλης και του πλάσματος ο οποίος περιέχει τα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος, όπου εμπεριέχονται και τα CTCs, ο οποίος συλλέγεται χωρίς να διαταραχθεί η στοιβάδα της φικόλης. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο των 50 ml στο οποίο προσθέτουμε 40ml ισότονου διαλύματος PBS-PH 7.3 και το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 1600 στροφές για 10 λεπτά στους 25°C. Η έκπλυση των κυττάρων

επαναλαμβάνεται δύο φορές. Στο τέλος τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml PBS και ακολουθεί η καταμέτρησή τους με τη βοήθεια της χρωστικής κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue), αιματοκυτταρόμετρου Mallasez και οπτικού μικροσκοπίου. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ένα μέρος από τα απομονωμένα μονοπύρηννα κύτταρα υπό μορφή ιζήματος φυλάσσεται στους -80°C για τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου είτε επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες (500.000 κύτταρα/πλακάκι) προκειμένου να ακολουθήσει ανοσοφθορισμός και παρατήρηση με μικροσκοπία.

3.3 Καταμέτρηση κυττάρων με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και οπτικής μικροσκοπίας

Μετά την διάλυση των απομονωθέντων μονοπύρηννων κυττάρων σε 10 ml PBS, μεταφέρονται 10μl κυτταρικού διαλύματος σε σωληνάριο των 1,5ml, στο οποίο προστίθενται 90μl χρωστικής Trypan Blue. Η ουσία αυτή έχει την ιδιότητα να ενσωματώνεται στις μεμβράνες των νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων, χρωματίζοντάς τα μπλε. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μεταφορά 20μl από το διάλυμα σε αιματοκυτταρόμετρο (Mallasez) και με τη χρήση κατάλληλου οπτικού μικροσκοπίου (OLYMPUS Bx40F) πραγματοποιείται μέτρηση των ζωντανών κυττάρων, δηλαδή εκείνων που δεν εμφανίζουν χρώση, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται ως εξής:

Συνολικός αριθμός κυττάρων =

$(\text{Αριθμός μετρηθέντων κυττάρων}/9_{(\alpha)}) \times 10^4_{(\beta)} \times 10_{(\gamma)}$ x τελικός όγκος διαλύματος

α: αριθμός μετρηθέντων μεγάλων τετραγώνων

β: σταθερή τιμή αιματοκυτταρόμετρου, αντιστοιχεί στον όγκο διαλύματος που καλύπτεται από τα 16 τετράγωνα, ο οποίος ισούται με 0.1 mm^3

γ: αραιώση 1:10 της χρωστικής Trypan Blue

3.4 Επίστρωση κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες

Αφού μετρηθεί ο ακριβής αριθμός των κυττάρων, προστίθεται ανάλογη ποσότητα διαλύματος PBS/FBS 2% σε τελική συγκέντρωση . Στη συνέχεια μεταφέρονται 500μl κυτταρικού διαλύματος μέσα σε ειδικά σωληνάρια που εφαρμόζονται στην επιφάνεια κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε κυτταροφυγόκεντρο

με ειδικές θήκες για αντικειμενοφόρες πλάκες για 2 λεπτά στις 2000 στροφές. Τέλος, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται έως ότου στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία είτε χρησιμοποιούνται άμεσα για ανοσοφθορισμό, είτε φυλάσσονται στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.5 Ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με ανοσοφθορισμό

Με την βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού ή της κυτταρομετρίας ροής, ο ανοσοφθορισμός επιτρέπει τον έλεγχο των κυττάρων για την παρουσία συγκεκριμένων αντιγόνων, μέσω της χρήσης ειδικών μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Κατά τον **έμμεσο ανοσοφθορισμό**, το αντίσωμα που χρησιμοποιείται για να αντιδράσει με το κυτταρικό αντιγόνο δεν είναι το ίδιο σημασμένο κι επομένως απαιτείται η χρήση ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο είναι σημασμένο με φθορίζουσα ουσία, το οποίο προσδένεται στο πρώτο. Κατά τον **άμεσο ανοσοφθορισμό**, το αντίσωμα που προσδένεται στο αντιγόνο είναι άμεσα σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική. Ο εντοπισμός των CTCs ανάμεσα στα PBMCs βασίστηκε στην ταυτοποίηση της επιθηλιακής τους προέλευσης, δηλαδή στην ανίχνευση της έκφρασης των κυτταροκερατινών 8, 18 και 19, έναντι των οποίων προσδένεται ειδικά το αντίσωμα A45-B/B3, είτε στην ανίχνευση του μορίου επιφανείας των επιθηλιακών κυττάρων EpCAM. Η απουσία της έκφρασης του μορίου επιφανείας των αιμοποιητικών κυττάρων CD45 χρησιμοποιήθηκε επιπλέον για την επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα που ταυτοποιήθηκαν ήταν CTCs και όχι αιμοποιητικά κύτταρα στα οποία υπήρχε έκτοπη έκφραση της κυτταροκερατίνης ή του EpCAM.

Αρχικά, τα πλακίδια με επιστρωμένα κύτταρα εκτίθενται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αποψυχθούν. Ακολουθεί η επώαση τους με διάλυμα παγωμένης ακετόνης/μεθανόλης σε αναλογία 9:1 για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την μονιμοποίηση των κυττάρων. Συνεχίζεται η οριζόντια τοποθέτησή τους σε ειδική κασετίνα, όπου πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις με διάλυμα PBS, διάρκειας 3 λεπτών και ακολουθεί επώαση με διάλυμα PBS/5% FBS, 0.9mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂ για μία ώρα, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος. Ακολουθεί η επώαση των πλακιδίων με αντίσωμα anti-CD45 (κοινό αντιγόνο των λευκοκυττάρων/rabbit) για 1 ώρα ακολουθούμενο από το δευτεροταγές σημασμένο με alexa 555 (anti-rabbit) για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται

αντίσωμα A45-B/B3 (ειδικό για την ανίχνευση των κυτταροκερατινών 8/18 ή και 19/mouse) για 1 ώρα ακολουθούμενο από το αντίστοιχο δευτεροταγές σημασμένο με FITC (anti-mouse) για 45 λεπτά. Έπειτα από κάθε επώαση, ακολουθούν πάντοτε 3 εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης διάρκειας 3 λεπτών για την απομάκρυνση της περίσσειας του μη δεσμευμένου αντισώματος. Η ποσότητα του αντισώματος που προστίθενται ανά πλακίδιο είναι 100μl, έτσι ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πλακιδίου. Τέλος, σε κάθε πλακίδιο προστίθεται μία σταγόνα φθορίζουσας χρωστικής Dapi anti-fade, η οποία προσδένεται απευθείας στο DNA και σημαίνει τον πυρήνα των κυττάρων. Στην επιφάνεια κάθε πλακιδίου τοποθετείται καλυπτρίδα, προκειμένου να ακολουθήσει η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Σε κάθε πειραματική διαδικασία που λαμβάνει χώρα συμπεριλαμβάνονται πάντοτε πλακίδια επιστρωμένα με κατάλληλες καρκινικές σειρές που εκφράζουν ή δεν εκφράζουν το κάθε αντίσωμα, ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, αντιστοίχως. Ως επιπλέον αρνητικός μάρτυρας για κάθε αντίσωμα, συμπεριλαμβάνεται πάντοτε ένα πλακίδιο στο οποίο δεν γίνεται προσθήκη του συγκεκριμένου αντισώματος, προστίθεται όμως το φθοριόχρωμα με το οποίο αυτό σημαίνεται, καθώς και όλα τα υπόλοιπα αντισώματα και φθοριοχρώματα. Με τον τρόπο αυτό υπάρχει η πληροφορία του θορύβου από όλα τα αντισώματα και φθορίζουσες χρωστικές της συγκεκριμένης χρώσης, εξασφαλίζοντας την καλύτερη ειδικότητα του σήματος που αξιολογείται στη συνέχεια ως θετική έκφραση.

Τα πλακίδια αξιολογούνται από τον εκάστοτε παρατηρητή με την βοήθεια laser συνεστιακής μικροσκοπίας (Leica DM 2500, Heidelberg, Germany) όπου, μπορούν να ανιχνευτούν ταυτόχρονα διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές με διακριτά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής. Τα κύτταρα τα οποία αξιολογήθηκαν και θεωρήθηκαν ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ήταν αυτά τα οποία παρουσίαζαν έκφραση κυτταροκερατινών και απουσίαζε η έκφραση του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου και επίσης κάλυπταν τα κυτταρομορφολογικά κριτήρια των καρκινικών κυττάρων τα οποία έχουν προταθεί από την Meng et al. (θετική πυρηνική χρώση, υψηλή πυρηνική/κυτταροπλασματική επιφάνεια, μέγεθος μεγαλύτερο των λευκών αιμοσφαιρίων). Σε κάθε ασθενή εξετάστηκαν 2 πλακίδια επιστρωμένα με 500,000 μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος το καθένα και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως αριθμός καρκινικών κυττάρων/ 10^6 μονοπύρηνα κύτταρα. Η

ανίχνευση έστω και ενός καρκινικού κυττάρου/ 10^6 μονοπύρρηνα κύτταρα θεωρήθηκε θετική.

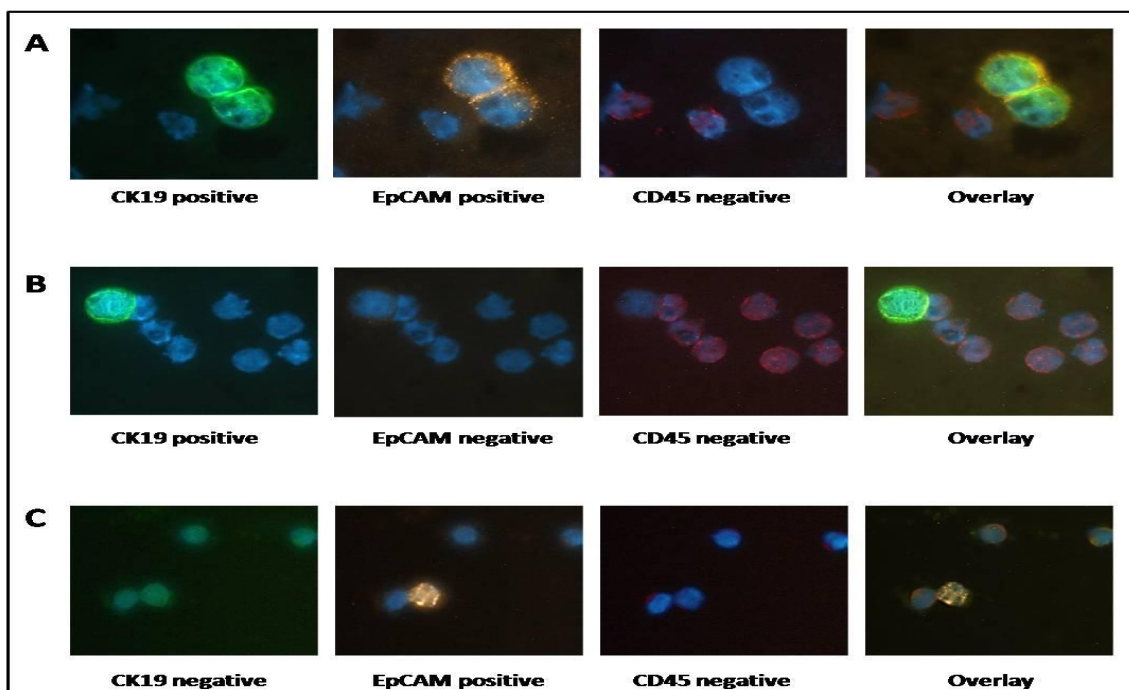
Προκειμένου να αξιολογήσουμε την επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας του ανοσοφθορισμού, 10 και 100 κύτταρα καρκινικής κυτταρικής σειράς μαστού MCF-7 αναμείχθηκαν με 1,000,000 κύτταρα φυσιολογικού αιμοδότη και μετά από απομόνωση μέσω φυγοκέντρησης διαβάθμισης πυκνότητας φικόλης, αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρώθηκαν με 500,000 κύτταρα/πλάκα και δύο τυχαίες πλάκες επιλέχθηκαν από την κάθε συγκέντρωση και σημάνθηκαν με αντισώματα CD45/A45B-B/3 για την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον Πίνακα 2.

MCF-7 cells spiked/ 10^6 PBMCs	CTC detection		
	Cytospin 1	Cytospin 2	CTC-Positivity
10	-	+	+
10	-	+	+
10	+	+	+
100	+	+	+
100	+	+	+
100	+	+	+

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Επαναληψιμότητα της τεχνικής του ανοσοφθορισμού μέσω προσθήκης MCF 7 καρκινικών κυττάρων (10 και 100 κυττάρων αντίστοιχα) σε 10^6 μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και αντικειμενοφόρες πλάκες με 500,000 κύτταρα ελέγχθηκαν. Δύο τυχαία πλακίδια μελετήθηκαν σε κάθε συγκέντρωση. Θετικότητα χαρακτηρίστηκε η παρουσία έστω και ενός CK θετικού κυττάρου/ εκατομμύριο κύτταρα περιφερικού αίματος.

Προκειμένου να μελετήσουμε τις διαφορές όσον αφορά την ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μεταξύ Cell Search System και RT-qPCR σε ασθενείς, πειράματα τριπλής χρώσης ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκαν. Η τεχνική που ακολουθήθηκε έχει περιγραφεί αναλυτικά παραπάνω. Συγκεκριμένα,

αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με κύτταρα αξιολογήθηκαν ως προς την έκφραση μορίων του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου (CD45), κυτταροκερατίνης 19 (CK19) και του μορίου επιφανείας των επιθηλιακών κυττάρων/καρκίνο-σχετιζόμενος μεταγωγέας σήματος ασβεστίου EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες επωάστηκαν αρχικά με anti CD45 αντίσωμα (mouse) ακολουθούμενο από το αντίστοιχο φθοριόχρωμα (Alexa 633/far red anti-mouse), μετέπειτα με anti EpCAM αντίσωμα (rabbit) συνοδευόμενο με το φθοριόχρωμα Alexa 555 (anti-rabbit) και τελευταία με το anti-CK 19 (mouse) σημασμένο με fluorescein isothiocyanate (CK19 FITCH conjugated). Τα πλακίδια αξιολογήθηκαν με την χρήση του ημί-αυτόματου συστήματος μικροσκοπίας ARIOL το οποίο έχει τη δυνατότητα μέσω ειδικού λογισμικού να πραγματοποιεί μία ημι-αυτοματοποιημένη αξιολόγηση πολλαπλών δειγμάτων, βάσει συγκεκριμένων παραμέτρων που ορίζονται από το χρήστη. Δύο πλακίδια μελετήθηκαν ανά ασθενή και το αποτέλεσμα εκφράστηκε ως αριθμός κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων/ 10^6 μονοπύρηνων κυττάρων.



Εικόνα 12. Έκφραση της CK19, EpCAM και CD45 σε ΚΚΚ ασθενών με καρκίνο μαστού
 Α) Αντιπροσωπευτική εικόνα από δύο ΚΚΚ τα οποία είναι θετικά ως προς τη CK19 και EpCAM μέσα σε πληθυσμό PBMCS. (Β) Αντιπροσωπευτική εικόνα από ένα ΚΚΚ θετικό για CK19. (C) Αντιπροσωπευτική εικόνα από ένα ΚΚΚ θετικό ως προς το EpCAM. Εικόνες έχουν προκύψει από το ARIOL System (X60).

3.6 Απομόνωση ολικού RNA

Η μέθοδος που ακολουθείται έχει τροποποιηθεί από την αρχική που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi (1987, single step method of RNA isolation). Στο ίζημα των μονοπύρηνων κυττάρων, που έχει διατηρηθεί στους -80°C και το οποίο μεταφέρουμε σε πάγο, προστίθεται 1ml Trizol (Gibco, Invitrogen) και αναδεύεται με σύριγγα ινσουλίνης (1ml) ώστε να επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστίθεται 200μl χλωροφόρμιο και το μίγμα αναδεύεται έντονα και επωάζεται στον πάγο για 5 λεπτά. Η λύση των κυττάρων βασίζεται στην παρουσία ισοθιοκυανικής γουανιδίνης, ενός αποδιατακτικού παράγοντα, ο οποίος βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκα τους με το RNA και επιπλέον αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά την λύση των κυττάρων. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 12.000 rcf για 15 λεπτά στους 4°C . Μετά την φυγοκέντρηση, το διάλυμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: α) στην κατώτερη ερυθρωπή, οργανική φάση στην οποία παραμένουν οι πρωτεΐνες και όλα τα κυτταρικά υπολείμματα β) στην λευκωπή μεσόφαση στην οποία παραμένει το DNA και στην ανώτερη διαυγή, υδατινή φάση στην οποία βρίσκεται το ολικό RNA των κυττάρων. Η υδατινή φάση που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, στο οποίο προσθέτουμε 500 μl ισοπροπανόλης και το αναδεύουμε ελαφρά. Ακολουθεί επώαση για 16-18 ώρες στους -20°C έτσι ώστε επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση του RNA με την μορφή ενός πηκτώδους ιζήματος και την επόμενη ημέρα το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 12.000 rcf για 10 λεπτά στους 4°C , απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml 75% αιθανόλης. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 7600 rcf για 6 λεπτά στους 4°C και απομακρύνεται η αιθανόλη (2 φορές). Αφού το ίζημα στεγνώσει τελείως είτε εκτεθειμένο στον αέρα, είτε σε κενό αέρα για 5-10 λεπτά, το RNA διαλύεται σε 15 μl RNA storage buffer (Ambion, USA). Το διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 55°C για 10 λεπτά. Μικρή ποσότητα RNA (5 μg) θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) μέσω της αντίστροφης μεταγραφής. Η συγκέντρωση του RNA που απαιτείται υπολογίζεται με τη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 260nm στο Nanodrop Spectrophotometer ND-1000. Τα δείγματα του RNA φυλάσσονται στους -80°C .

3.7 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Στην PCR αντίδραση για τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας στόχου χρησιμοποιείται ως εκμαγείο το cDNA που προκύπτει από την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA. Αρχικά, μετατρέπουμε το mRNA σε cDNA και έπειτα ακολουθεί η σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει από το cDNA (PCR). Η σύνθεση του cDNA γίνεται με το SUPERSRIPT™ III PlatinumTwo-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) το οποίο περιέχει το RT ENZYME MIX που περιλαμβάνει το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (SUPER SCRIPT RT) και μια RnaseOUT, ένας ανασυνδυασμένος αναστολέας ριβονουκλεάσης προκειμένου να προστατεύσει την κατακρήμνιση του RNA. Το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης μπορεί να συνθέσει συμπληρωματικό DNA σε υψηλές θερμοκρασίες. Το kit επίσης περιέχει το μίγμα αντίδρασης, 2X RT REACTION MIX το οποίο περιλαμβάνει oligo DT, 10mM MgCl₂, dNTPS. Συγκεκριμένα σε κάθε δείγμα τοποθετούμε 10μl από το Reaction Mix και 2 μl από το RT enzyme mix. Ο υπόλοιπος όγκος αποτελείται από το δείγμα RNA (5μg RNA) και το νερό (DEPC-H₂O) και ανέρχεται συνολικά στα 8 μl. Το δείγμα το οποίο έχει προετοιμαστεί σε πάγο (όγκου 20μl) τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή και επωάζεται αρχικά 10 λεπτά στους 25°C, 50 λεπτά στους 42°C, και 5 λεπτά στους 85 °C, όπου αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA-cDNA και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση. Μετέπειτα τοποθετείται στον πάγο όπου προσθέτουμε 1 μl RNASE H για τα τελικά 20 λεπτά στους 37 βαθμούς, όπου συντελείται η αποδόμηση του συμπληρωματικού RNA. Το προϊόν φυλάσσεται στους -20°C, μέχρι χρήσης του για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR)

Στην αντίδραση χρησιμοποιείται ως εκμαγείο το cDNA. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι καταλήγουν στον εκθετικό πολλαπλασιασμό του τμήματος cDNA που ορίζεται από τους εκκινητές. Στην περίπτωση της Real Time RT-PCR, οι εκκινητές οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν είναι οι ακόλουθοι: α) το Cytokeratin-19 Quantification Kit που χρησιμοποιεί τους εκκινητές do2 For2 ειδικούς για την κυτταροκερατίνη 19, οι οποίοι δεν ανιχνεύουν γενομικό DNA, ούτε τα δύο ψευδογονίδια της CK19 και είναι:

CK19 for2 (forward primer)/CgggACAAGATTCTTggT και CK19 do2 (reverse primer)/CgTTgATGTCggCCTCCA [72].

Οι ανιχνευτές υβριδισμού (probes) οι οποίοι χρησιμοποιούνται και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις είναι:

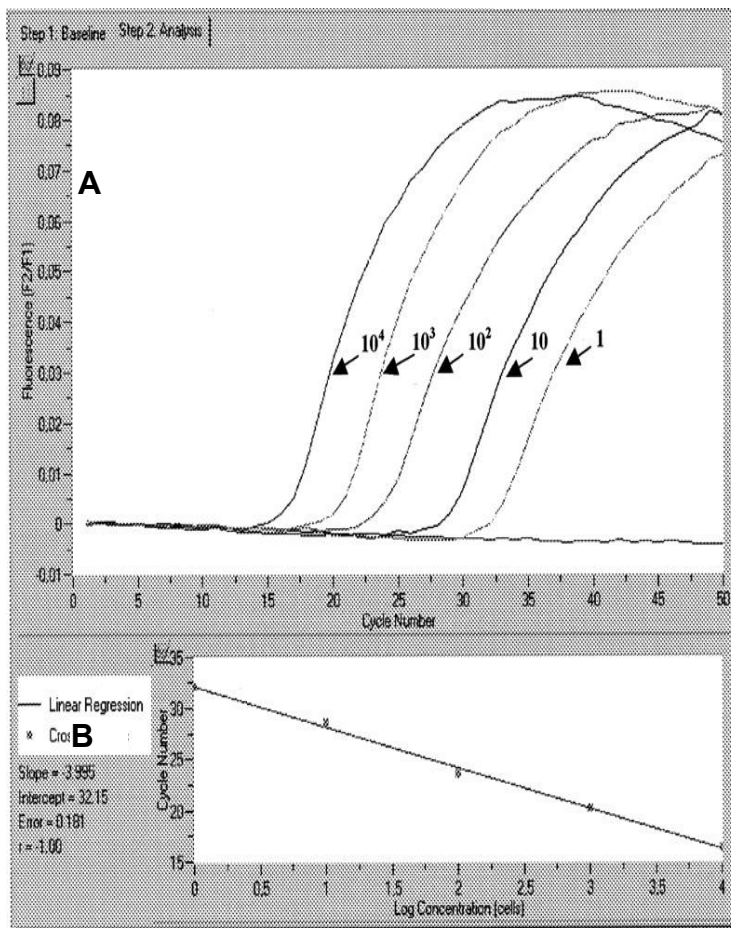
CK-19-FL/ TgTCCTgCAgATCgACAACgCCC-FL

CK-19-LC/LCRed640-CTggCTgCAgATgACTTCCgAACC,

σύμφωνα με το πρωτόκολλο [70].

Συγκεκριμένα, το δείγμα μας το οποίο έχει όγκο 10μl, περιλαμβάνει 1 μl cDNA μαζί με 9 μl διαλύματος τα οποία εμπεριέχουν, 1 μl PCR Synthesis buffer (10x), 0.5 50Mm MgCl₂, 0.2 dNTPS 10μM, 0.15 BSA 10μg/μl, 5 H₂O, 0.1 platinum taq polymerase, 0.5 3μM do primer, 0.5 3μM for primer, 0.5 ck19-fl probe, 0.5 ck19-lc εκκινήτες και ανιχνευτές υβριδισμού (TIBMOBIO/., Berlin, Germany) και το οποίο τοποθετείται στα τριχοειδή του μηχανήματος Light Cycler (ROCHE), προκειμένου να επιτευχθεί η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου στόχου. Για τον έλεγχο της ποιότητας των RNA δειγμάτων θα γίνει real time RT-PCR αντίδραση ενίσχυσης ενός γονιδίου βασικής λειτουργίας (housekeeping gene), του GAPDH. Τα δείγματα με θετική ανίχνευση κατά την ηλεκτροφόρηση σε τζελ αгарόζης 2%, θεωρούνται ότι βρίσκονται σε καλά διατηρημένη κατάσταση.

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων γίνεται σε σχέση με πρότυπα δείγματα (διαδοχικές αραιώσεις MCF-7 καρκινικών κυττάρων μαστού) τα οποία παρέχουν την καμπύλη αναφοράς στο Light Cycler System Software 3.1 πάνω στην οποία στηρίζεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του άγνωστου δείγματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ισοδύναμα των MCF-7 καρκινικών κυττάρων, μαστού στα 5μg συνολικού RNA. Σαν κατώτερο όριο ανίχνευσης έχει προσδιοριστεί, το ≥ 0.6 MCF-7 cell equivalents/5μg RNA των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος των ασθενών.



Εικόνα 13. Ποσοτικοποίηση των CK-19 mRNA θετικών κυττάρων με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο στο LightCycler System.

A. Λογαριθμική καμπύλη του σήματος φθορισμού (F2/F1) κατά την ενίσχυση του προϊόντος. Οι καμπύλες από δεξιά προς τα αριστερά αντιστοιχούν σε 1, 10, 100, 1000 και 10000 κύτταρα MCF-7, ενώ η ευθεία γραμμή αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα.

B. Cps (crossing points): αριθμός των κύκλων vs τον λογάριθμο του αριθμού των MCF-7 κυττάρων [87]

3.9 Cell Search System

Περιφερικό αίμα συλλέγεται σε ειδικά σωληνάρια (CELL Save Preservative Tubes) τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό EDTA και κάποιο συντηρητικό κυττάρων. Το EDTA απορροφά τα ιόντα ασβεστίου, εμποδίζοντας την πήξη του αίματος και το συντηρητικό διατηρεί την μορφολογία και την επιφανειακή έκφραση του αντιγόνου των επιθηλιακών κυττάρων. Το αίμα το οποίο συλλέγεται στα ειδικά σωληνάρια μπορεί να επεξεργαστεί εντός 96 ωρών εφόσον διατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στην περίπτωση ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού συλλέγονται 7.5 ml αίματος, ενώ για ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού και θεωρητικά μικρότερο φορτίο νόσου, απαιτούνται 23ml. Αναλυτικότερα, στην πρώτη περίπτωση, το ολικό αίμα που έχει συλλεχθεί στο ειδικό σωληνάριο θα μεταφερθεί σε κωνικό σωληνάριο το οποίο περιέχεται στο cell search epithelial cell kit και θα αραιωθεί με 6.5ml ενός διαλύματος που παρέχεται από το kit (dilution buffer), θα αναδευθεί με το χέρι 5 φορές και θα φυγοκεντρηθεί για 10 λεπτά στα 800 g με το φρένο ανενεργό. Μέσα στην επόμενη ώρα, το δείγμα αυτούσιο, θα τοποθετηθεί επάνω στο μηχάνημα (Cell Tracks AutoPrep

System) για το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας. Μετά την επιλογή των κυττάρων με την χρήση του cell search epithelial cell kit στο τριχοειδές, το δείγμα θα περάσει στο Cell Tracks Analyzer II προκειμένου να γίνει η αξιολόγηση των κυττάρων του ενδιαφέροντος, όπως προαναφέρθηκε σε παραπάνω ενότητα. Στην περίπτωση ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού, 23ml θα επεξεργαστούν. Αρχικά 16.5ml αίματος θα τοποθετηθούν σε 50 ml σωληνάριο πολυπροπυλενίου και θα φυγοκεντρηθούν για 10 λεπτά χωρίς φρένο στα 800g. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, το πλάσμα απομακρύνεται, το δείγμα αραιώνεται με περίπου 10 ml διαλύματος που περιέχεται στο kit (dilution buffer), αναδεύεται 8 φορές πάνω κάτω και ακολούθως επιστρώνεται σε 4ml φικόλης με μοριακό βάρος 1083 gr/ml και φυγοκέντρηση στα 400g για 10 λεπτά χωρίς φρένο. Μετά την φυγοκέντρηση, ο δακτύλιος συλλέγεται, μεταφέρεται στο cell save tube που παρέχεται από το kit, στο οποίο ήδη έχουμε βάλει 6.5 ml αίματος προκειμένου να φθάσουμε στον επιθυμητό όγκο των 23 ml και συμπληρώνουμε με dilution buffer έως τα 14ml όπως γίνεται και στη περίπτωση των δειγμάτων ασθενών με μεταστατικό καρκίνο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 800g χωρίς φρένο για 10 λεπτά. Το δείγμα μετά το πέρας του χρόνου τοποθετείται στο Cell Tracks Autoprep System, προκειμένου να ακολουθηθεί η ίδια διαδικασία.

Προκειμένου να ελέγξουμε την ποιότητα και ευαισθησία του συστήματος (cell search epithelial cell kit, cell tracks autoprep system, cell tracks analyzer ii), σε κάθε πείραμα με ασθενείς το οποίο πραγματοποιείται στο cell tracks autoprep system, ένα δείγμα ελέγχου (control) περιλαμβάνεται. Συγκεκριμένα, το φιαλίδιο του δείγματος ελέγχου περιέχει ένα πληθυσμό καρκινικών κυττάρων μαστού (SKBR3) με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (μονιμοποιημένα κύτταρα) του οποίου το περιεχόμενο το αναδεύουμε 5 φορές πάνω κάτω και το μεταφέρουμε σε κωνικό σωληνάριο με bar code για να αναγνωρίζεται από το μηχάνημα. Στο δεύτερο τμήμα του συστήματος, τα κύτταρα του δείγματος ελέγχου τα οποία αναλύονται, πρέπει να εμπίπτουν σε συγκεκριμένες αναμενόμενες τιμές (low/high) ώστε να θεωρήσουμε ότι η πειραματική διαδικασία έχει επιτευχθεί με τον καλύτερο τρόπο.

3.10 Στατιστικός σχεδιασμός και ανάλυση

Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να συγκρίνουμε τρεις τεχνικές ανίχνευσης CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό και πρώιμο καρκίνο μαστού και να αξιολογήσουμε την σημασία της ανίχνευσης ως προς την κλινική έκβαση των ασθενών.

Οι συνοπτικοί πίνακες παρέχονται για όλες τις βασικές μεταβλητές και μεταβλητές αποτελεσματικότητας, όπου απαιτείται. Συνεχόμενες μεταβλητές συνοψίζονται με στατιστικούς όρους (n, mean, standard deviation, range, and median). Το ελεύθερο νόσου διάστημα στους ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού, χαρακτηρίστηκε το διάστημα από την στιγμή που εισήχθησαν στην μελέτη, μέχρι την στιγμή που εμφανίστηκε η πρώτη ένδειξη υποτροπής (κλινικά ή απεικονιστικά) ή θάνατος από οποιαδήποτε αιτία. Σαν ελεύθερο υποτροπής διάστημα στους ασθενείς με μεταστατική νόσο, χαρακτηρίστηκε το διάστημα από την στιγμή που εισήχθησαν στην μελέτη, μέχρι την στιγμή που εμφανίστηκε η πρώτη ένδειξη υποτροπής (κλινικά ή απεικονιστικά) ή θάνατος από οποιαδήποτε αιτία. Η συνολική επιβίωση αξιολογήθηκε από την στιγμή της έναρξης συμμετοχής στην μελέτη μέχρι την ημερομηνία θανάτου από οποιαδήποτε αιτία ή την ημερομηνία του τελευταίου ελέγχου. Ποιοτικοί παράγοντες αξιολογήθηκαν με το Pearson's Chi-square test ή με το Fisher's exact test, όπου απαιτήθηκε. Διαφορές στις θετικότητες αξιολογήθηκαν με το McNemar Test. Το Kappa Test χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις προκειμένου να εκτιμήσει τις συμφωνίες μεταξύ των τριών τεχνικών. Η κανονικότητα των συνεχόμενων μεταβλητών ελέγχθηκε με το Kolmogorov-Smirnov test ενώ το Spearman's exact test χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογήσει τις συσχετίσεις μεταξύ των τριών μεθόδων. DFS, PFS, OS εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας την Kaplan-Meier ανάλυση και οι συγκρίσεις μέσω του log-rank test. Όλα τα στατιστικά τεστ ήταν αμφίπλευρα και οι τιμές του $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Η πληροφορία αναλύθηκε μέσω του προγράμματος SPSS (Statistical software, version 22.0 (SPSS Inc. Chicago II, USA)).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Διακόσιοι ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας και 164 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού πριν την έναρξη της πρώτης γραμμής θεραπείας πήραν μέρος στην μελέτη ως προς την ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μέσω της χρήσης real time RT-PCR, Cell Search System και ανοσοφθορισμού όπου μελετήθηκε μικρότερος αριθμός ασθενών από κάθε ομάδα (178 στην περίπτωση των ασθενών με πρώιμη νόσο και 105 με μεταστατική νόσο). Τα χαρακτηριστικά των ασθενών απεικονίζονται στον Πίνακα 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Χαρακτηριστικά ασθενών

A) Πρώιμος Καρκίνος Μαστού

No of Patients	N =172	%
Age		
Median (min –max)	50 (25-81)	
Menopausal status		
Premenopausal	64	37.2
Postmenopausal	108	62.8
Type of Surgery		
Breast conserving surgery	123	71.5
Mastectomy	49	28.5
Histology		
Ductal	153	89.0
Lobular	11	6.4
Mixed	6	3.5
Mucinous	2	1.2
Tumor size		
≤2 cm	70	40.7
2 - 5cm	85	49.4
≥5cm	17	9.9
Lymph Nodes		
0	49	28.5
1-3	82	47.7
≥4	41	23.8
Grade		
I	8	4.7
II	73	42.4
III	83	48.3
Lobular	6	3.5
Unknown	2	1.2
Hormone Receptor Status		
ER and/or PR positive	132	76.7
ER and PR negative	40	23.3
Her2		
Negative	134	77.9
Positive	38	22.1
Relapse		
Yes	32	18.6
No	140	81.4
Status		
Dead	19	11.0
Alive	153	89.0

B) Μεταστατικός Καρκίνος Μαστού

No of Patients	N =137	%
Age		
Median (min –max)	61.0 (23-82)	
Menopausal status		
Premenopausal	34	24.8
Postmenopausal	103	75.2
Primary Breast Cancer at diagnosis		
Yes	91	66.4
No	46	33.6
Prior Adjuvant therapy		
Chemotherapy	81	59.1
Hormone therapy only	7	5.1
Unknown	3	2.2
Hormone Receptor Status		
ER and/or PR positive	103	75.2
ER and PR negative	30	21.9
Unknown	4	2.9
Her2		
Negative	110	80.3
Positive	22	16.1
Unknown	5	3.6
Metastatic Disease status		
Visceral	93	67.9
Non Visceral	44	32.1
Best response		
CR+PR	73	53.3
SD+PD	64	46.7
Relapses		
Yes	112	81.8
No	25	18.2
Status		
Dead	74	54.0
Alive	63	46.0

4.1 Ανίχνευση επιθηλιακών κυττάρων στο περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών

Καμία ανίχνευση ως προς την έκφραση της κυτταροκερατίνης 19 mRNA δεν βρέθηκε στο περιφερικό αίμα 26 υγιών αιμοδοτών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time RT PCR). Στην περίπτωση του ανοσοφθορισμού, ένας στους 26 υγιείς αιμοδότες διέθετε ένα κύτταρο στο ένα εκατομμύριο μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Στο Cell Search System, σε έναν αιμοδότη ανιχνεύτηκε ένα κύτταρο θετικό στην κυτταροκερατίνη όταν χρησιμοποιήθηκε 7.5 ml όγκος αίματος, ενώ σε δύο αιμοδότες ανιχνεύθηκε από ένα κύτταρο θετικό στην κυτταροκερατίνη όταν ο όγκος αίματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 23ml.

4.2 Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού

Σε 36/200 (18%) ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού πριν την έναρξη της θεραπείας ανιχνεύτηκαν κύτταρα μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Με το Cell Search System, 74 (37%) και 33 (16.5%) ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα κύτταρα (cut off ≥ 1 και ≥ 2 , αντίστοιχα). 30 ασθενείς/178 (16.9%) οι οποίοι εκτιμήθηκαν μέσω του ανοσοφθορισμού και οπτικής μικροσκοπίας, παρουσίασαν θετικότητα στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. Στην περίπτωση του cut off ≥ 1 CTCs /23ml αίματος, ο ρυθμός θετικότητας με έστω και μία εκ των τριών μεθόδων, ανέρχεται στο 38.5%. Από την άλλη πλευρά, η πιθανότητα ανίχνευσης CTCs σε ένα ασθενή και με τις τρεις μεθόδους ανέρχεται μόλις στο 2.5%. Οι διαφορές στην θετικότητα μεταξύ των τριών μεθόδων μελετήθηκε με την χρήση του Mc Nemar Test.

Οι ασθενείς ήταν πιο πιθανό να είναι θετικοί στην παρουσία κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων μέσω του Cell Search System (στο cut off ≥ 1) παρά μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (37% vs 18.0%, $P < 0.001$) ή του ανοσοφθορισμού (37% vs 16.9%, $P < 0.001$).

Η συνολική συμφωνία (concordance) μεταξύ της RT-qPCR και του CellSearch, (η οποία υπολογίζεται όταν το δείγμα είναι είτε διπλά θετικό είτε διπλά αρνητικό στις δύο

αυτές μεθόδους) είναι 62% and 73.5% για τα cut-offs ≥ 1 and ≥ 2 , αντίστοιχα ($\kappa=0.088$, $p=0.161$ και $\kappa=0.072$, $p=0.307$, κ - test). Αντιστοίχως, η συνολική συμφωνία μεταξύ του ανοσοφθορισμού και του CellSearch είναι 61.8% and 71.9% για τα cut-offs ≥ 1 and ≥ 2 , αντίστοιχα ($\kappa=0.078$, $p=0.233$ and $\kappa=0$, $p=0.976$, κ - test). Τέλος η συμφωνία μεταξύ ανοσοφθορισμού και RT-qPCR είναι 73% ($\kappa=0.086$, $p=0.248$, κ - test). Οι ρυθμοί συμφωνίας μεταξύ των μεθόδων απεικονίζονται στον Πίνακα 4Α.

A. Πρώιμος Καρκίνος Μαστού

	K coefficient	p-value	Degree of agreement	Agreement (%)
Cell search (cut-off ≥ 1) vs RT-qPCR	0.088	0.161	Poor	62
Cell search (cut-off ≥ 1) vs IF	0.078	0.233	Poor	61.8
Cell search (cut-off ≥ 2) vs RT-qPCR	0.072	0.307	Poor	73.5
Cell search (cut-off ≥ 2) vs IF	0	0.976	None	71.9
RT-qPCR vs IF	0.086	0.248	Poor	73.0

ΠΙΝΑΚΑΣ 4Α. Συμφωνίες μεταξύ των τριών μεθόδων στον πρώιμο καρκίνο του μαστού

4.3 Ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού

Χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, 62/164 ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού είχαν ανιχνεύσιμο CK19 mRNA στο αίμα. Με το Cell Search System, 57 (34.8%) ασθενείς είχαν ≥ 5 και 88 (53.7%) είχαν ≥ 2 CTCs/7.5ml αίματος. Μεταξύ των 105 ασθενών που ελέγχθηκαν με ανοσοφθορισμό, 30 ασθενείς εμφάνισαν κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (28.6%). Στο cut-off των ≥ 5 CTCs/7.5 ml αίματος για το CellSearch system, 6.1% των ασθενών είχαν ανιχνεύσιμα CTCs και με τις τρεις μεθόδους και 64% με έστω και μία μέθοδο.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στην θετικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ του CellSearch (cut-off ≥ 2), της RT-qPCR και του ανοσοφθορισμού. Ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού παρουσίασαν μεγαλύτερη θετικότητα σε CTCs μέσω της ανίχνευσης με το CellSearch System συγκριτικά με την real-time RT-qPCR (53.7 vs 37.8%, $P=0.001$, McNemar test) ή με τον ανοσοφθορισμό (56.2% vs 28.6%, $P<0.001$, McNemar test). Επίσης, στατιστικά σημαντική διαφορά στην θετικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ της RT-qPCR και του ανοσοφθορισμού (52.4% vs 28.6%, $P=0.001$, McNemar test).

Η συνολική συμφωνία μεταξύ της RT-qPCR και του CellSearch ήταν 63.4% and 67.7% ($\kappa=0.281$, $p<0.001$ and $\kappa=0.302$, $p<0.001$, κ -test) για ≥ 2 και ≥ 5 CTCs, αντίστοιχα. Όσον αφορά την σύγκριση μεταξύ CellSearch και ανοσοφθορισμού η συμφωνία ήταν 49.5% ($\kappa=0.041$, $p=0.619$, κ -test) και 58.1% ($\kappa=0.049$, $p=0.607$, κ -test) για ≥ 2 και ≥ 5 CTCs αντίστοιχα, ενώ η συμφωνία μεταξύ RT-qPCR και ανοσοφθορισμού ήταν 49.5% ($\kappa=0.011$, $p=0.902$, κ -test). Οι ρυθμοί συσχέτισης των τριών μεθόδων στον μεταστατικό καρκίνο μαστού απεικονίζονται στον Πίνακα 4B.

B. Μεταστατικός Καρκίνος Μαστού

	<i>K</i> coefficient	<i>p</i> -value	Degree of agreement	Agreement (%)
Cell search (cut-off ≥ 2) vs RT-qPCR	0.281	<0.001	Fair	63.4
Cell search (cut-off ≥ 2) vs IF	0.041	0.619	Poor	49.5
Cell search (cut-off ≥ 5) vs RT-qPCR	0.302	<0.001	Fair	67.7
Cell search (cut-off ≥ 5) vs IF	0.049	0.607	Poor	58.1
RT-qPCR vs IF	0.011	0.902	Poor	49.5

ΠΙΝΑΚΑΣ 4B. Συμφωνίες μεταξύ των τριών μεθόδων στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού

4.4 Έκφραση των μορίων EpCam και CK19 στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα σε ασθενείς με καρκίνο μαστού

Προκειμένου να εξερευνήσουμε την σχέση που μπορεί να έχει η ετερογένεια των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ως προς τις διαφορές στην ανίχνευση

χρησιμοποιώντας τις τρεις μεθόδους, πειράματα ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση τριών δεικτών (EpCam, CD45, CK19) πραγματοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος από 72 ασθενείς που παρουσίαζαν μεγάλες διαφορές ως προς την ανίχνευση των CTCs μέσω του CellSearch System και RT-qPCR. Κατά τον ανοσοφθορισμό, CTCs εντοπίστηκαν σε 23 (31.94%) από τους 72 ασθενείς. Σε 7 από τους 23 ασθενείς CTCs ανιχνεύτηκαν με RT-qPCR μόνο [(CellSearch (-)/RT-qPCR(+)] και σε 16 με το CellSearch μόνο [CellSearch (+)/RT-qPCR(-)]. Μεταξύ ενός συνόλου 747 CTCs ανιχνεύσιμων με ανοσοφθορισμό, 34% εξέφραζαν συγχρόνως CK19 και EpCAM [CK19(+)/EpCAM(+)], 26% ήταν CK19(-) /EpCAM(+) και 39% CK19(+)/EpCAM(-).

Οι διαφορετικοί ανοσοφαινότυποι των CTCs σε κάθε ασθενή απεικονίζονται στον Πίνακα 5.

Pt No	CellSearch TM No of CTCs	CK19 mRNA +/-	IF		
			CK19(+)/ EpCAM(+)	CK19(+)/ EpCAM(-)	CK19(-)/ EpCAM(+)
			No OF CTCs		
1	0	+	0	21	0
2	0	+	0	2	0
3	0	+	0	115	0
4	0	+	0	1	0
5	0	+	0	37	0
6	0	+	0	1	0
7	0	+	0	1	1
8	2	-	0	0	1
9	3	-	0	0	2
10	2	-	161	100	0
11	3	-	1	14	0
12	3	-	18	0	0
13	3	-	2	1	0
14	25	-	0	0	1
15	27	-	22	0	2
16	9	-	1	1	0
17	80	-	52	0	155
18	21	-	1	0	0
19	7	-	0	0	26
20	9	-	0	0	2
21	21	-	0	0	1
22	8	-	0	0	2
23	3	-	0	0	2

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Χαρακτηρισμός της έκφρασης CK19 και EpCAM στα CTCs ασθενών που παρουσίαζαν διαφορές στην ανίχνευση CTCs μέσω του Cell Search και της RT-qPCR με την χρήση μικροσκοπίας φθορισμού

Όπως διαφαίνεται, 6 από τους 7 ασθενείς οι οποίοι ήταν θετικοί σε CTCs μέσω της RT-qPCR μόνο (# 1-6), διέθεταν κύτταρα αποκλειστικά CK19(+)/EpCAM(-), τα οποία δεν θα μπορούσε να ανιχνεύσει το CellSearch system εξαιτίας της απουσίας έκφρασης του EpCAM ενώ σε μία περίπτωση (# 7), CK19(+)/EpCAM(-) μαζί με CK19(-) /EpCAM(+) CTCS παρατηρήθηκαν. Όσον αφορά τους ασθενείς που είχαν ανιχνεύσιμα CTCs μέσω του CellSearch μόνο, 50% των ασθενών είχαν αποκλειστικά EpCAM(+) /CK19(-) CTCS (patients # 8, 9, 14, 19, 20, 21, 22, 23), δικαιολογώντας έτσι το αρνητικό αποτέλεσμα της ανίχνευσης μέσω της RT-qPCR for CK19 mRNA, 13% (#12, 18) είχαν αποκλειστικά CK19(+)/EpCAM(+) CTCS, ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς παρουσίασαν μεγάλη ετερογένεια στον φαινότυπο των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

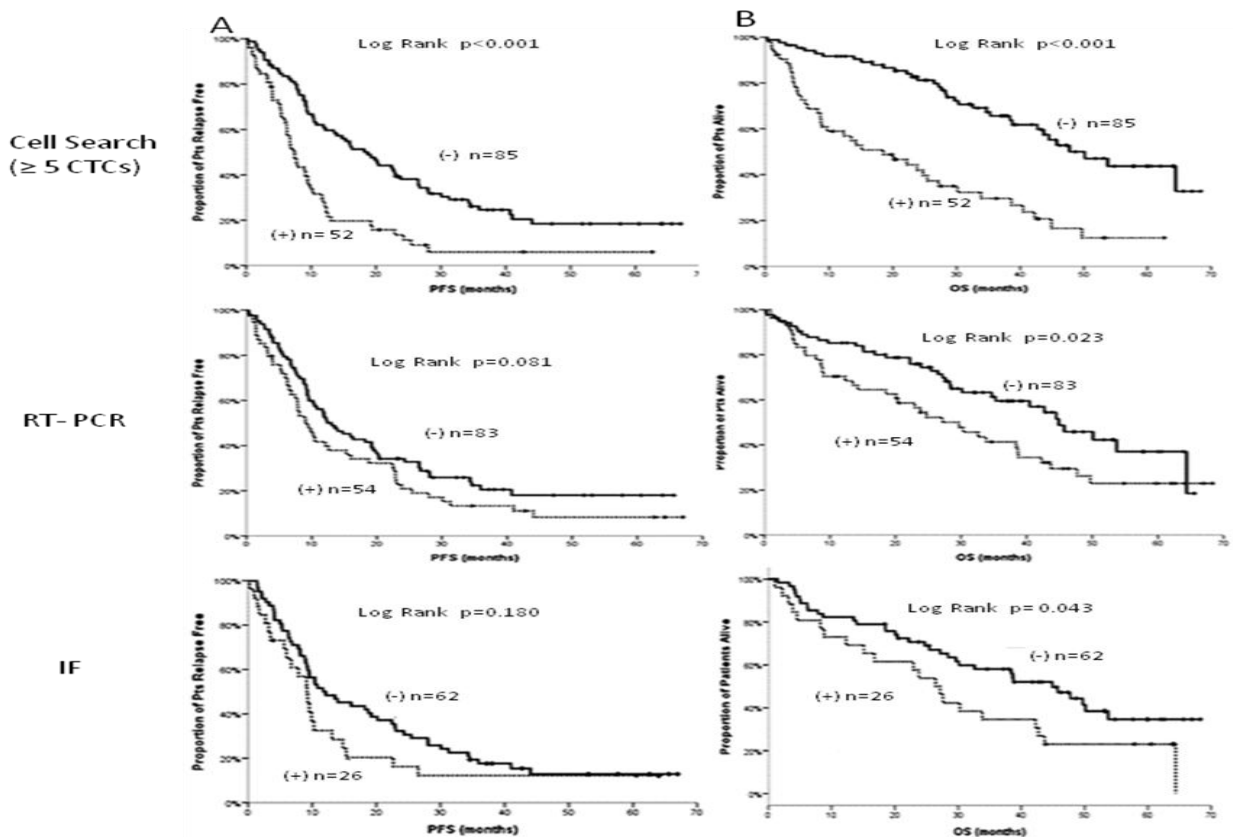
4.5 Προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των CTCs με τις τρεις μεθόδους, στον πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού

Η προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων αξιολογήθηκε σε ένα σύνολο 172 ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού που είχαν διαθέσιμα κλινικά στοιχεία. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύτηκαν στο 30.8% και 12.8% (cut off ≥ 1 και ≥ 2 CTCs αντίστοιχα) χρησιμοποιώντας το Cell Search System, στο 18.6% με την RT-qPCR και στο 19.2% με τον ανοσοφθορισμό. Μετά από μία μέση διάρκεια παρακολούθησης 74.8 μηνών (εύρος 2.1-100.7), 32 ασθενείς (18.6%) παρουσίασαν επανεμφάνιση (υποτροπή) της νόσου και 18 (11.0%) είχαν πεθάνει. Δεν υπήρχε διαφορά στον αριθμό των υποτροπών ή των θανάτων μεταξύ ασθενών που είχαν ανιχνεύσιμα ή μη καρκινικά κύτταρα, ανεξαρτήτως της μεθόδου που ακολουθήθηκε. Την στιγμή της ανάλυσης, το μέσο ελεύθερο νόσου διάστημα και η συνολική επιβίωση δεν ήταν ακόμα δυνατόν να προσδιοριστούν.

Όσον αφορά την προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στους μεταστατικούς ασθενείς, 137 άτομα μελετήθηκαν. CTCs ανιχνεύτηκαν σύμφωνα με την τεχνολογία Cell Search System στο 52.6% και 38% των ασθενών (για ≥ 2 και ≥ 5 CTCs cut offs, αντίστοιχα), στο 39.4% με RT-qPCR και στο 29.5% με ανοσοφθορισμό. Μετά από μία μέση διάρκεια παρακολούθησης 45.6 μηνών (εύρος 0.3 - 68.3), το μέσο ελεύθερο υποτροπής διάστημα σε ασθενείς με ανιχνεύσιμα CTCs σε αντίθεση με ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα CTCs σύμφωνα με το

Cell Search System, (στα ≥ 2 and ≥ 5 CTCs), ήταν 7.9 συγκριτικά με 22.4 μήνες ($p < 0.001$) και 7.4 σε αντίθεση με 18.7 μήνες ($p < 0.001$), αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο ελεύθερο υποτροπής διάστημα σε ασθενείς με ανιχνεύσιμα ή μη CTCs χρησιμοποιώντας την τεχνική της qRT-PCR ($p = 0.081$) ή την μέθοδο του ανοσοφθορισμού ($p = 0.180$). Η μέση συνολική επιβίωση σε ασθενείς με ανιχνεύσιμα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με ασθενείς χωρίς ανιχνεύσιμα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας το σύστημα Cell Search ήταν 23.8 μήνες (≥ 2 cut off) συγκριτικά με 53.7 μήνες ($p < 0.001$) και 18.5 μήνες (≥ 5 cut off) συγκριτικά με 47.7 μήνες ($p < 0.001$), αντίστοιχα. Παρομοίως, η ανίχνευση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων είτε με την μέθοδο της ποσοτικής σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (qRT-PCR) είτε μέσω του ανοσοφθορισμού (IF) φάνηκε να σχετίζεται με σημαντικά μειωμένη μέση συνολική επιβίωση (29.7 συγκριτικά με 44.9 μήνες, $p = 0.023$ και 26.5 συγκριτικά με 44.9 μήνες, $p = 0.043$, αντίστοιχα).

Αντιπροσωπευτικές καμπύλες επιβίωσης απεικονίζονται στο Διάγραμμα 1.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. Kaplan–Meier καμπύλες επιβίωσης (A) διάστημα επιβίωσης ελεύθερο υποτροπής και (B) συνολική επιβίωση σύμφωνα με την απουσία (-) ή παρουσία (+) ΚΚΚ στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο μαστού, χρησιμοποιώντας το CellSearch System (≥ 5 ΚΚΚ), RT-PCR και IF

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σημαντικός ρόλος των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων στο μονοπάτι της μεταστατικής διαδικασίας είναι ευρέως γνωστός [112,113]. Πολλές κλινικές μελέτες έχουν διενεργηθεί όπου έχουν αποδείξει ότι η ανίχνευση των CTCs σχετίζεται με μειωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα και συνολική επιβίωση σε ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο μαστού πριν ή μετά το τέλος της χημειοθεραπείας [83-85, 98-100]. Η ομάδα του Cristofanilli, το 2004, απέδειξε την σημασία της ανίχνευσης των CTCs στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού, όσον αφορά την υποτροπή της νόσου και την συνολική επιβίωση [48].

Η κλινική σημασία της ανίχνευσης των διεσπαρμένων καρκινικών κυττάρων στον μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο του μαστού έχει αποδειχθεί από ευρωπαϊκές ομάδες [21].

Διάφορες τεχνολογίες ανίχνευσης των CTCs υπάρχουν οι οποίες διαφέρουν στην μέθοδο και στους δείκτες που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και εντοπισμό των κυττάρων, τον όγκο του αίματος που αναλύεται και τον καθορισμό της θετικότητας ανίχνευσης. Το γεγονός ότι ο πληθυσμός των CTCs είναι πολύ σπάνιος και το δείγμα ανάλυσης που χρησιμοποιείται στις εκάστοτε τεχνολογίες ανίχνευσης είναι πολύ περιορισμένο, δημιουργεί τροχοπέδη στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Από την άλλη πλευρά, λαμβάνοντας υπόψη την σημαντική ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων, δεν είναι σαφές κατά πόσο αυτές οι μέθοδοι ανιχνεύουν όλα τα CTCs ή ακόμη και τον ίδιο υποπληθυσμό των CTCs που εξαιτίας της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης, μπορεί να διαφύγουν της ανίχνευσης, ιδιαίτερα με την χρήση μεθόδων που χρησιμοποιούν επιθηλιακούς δείκτες για την ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων [76,114,115]. Ως αποτέλεσμα, η σύγκριση μεταξύ διαφόρων κλινικών μελετών που περιλαμβάνουν ανίχνευση CTCs είναι δύσκολη παρά το γεγονός πως πολλές αναφορές έχουν συσχετίσει την ύπαρξη CTCs με την κλινική έκβαση. Γι' αυτό η σύσταση είναι ότι η ανίχνευση των CTCs δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα ως εργαλείο στην καθημερινή κλινική πράξη. Το Cell Search System είναι η μόνη ημιαυτοματοποιημένη μέθοδος ανίχνευσης και καταμέτρησης των CTCs το οποίο έχει πάρει έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων για χρήση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού, παχέος εντέρου και προστάτη. Η προγνωστική σημασία της ύπαρξης των CTCs σε πρώιμο καρκίνο μαστού έχει δείχθει σε πολλές μελέτες, απλά δεν υπάρχει ακόμη κάποια κοινά

αποδεκτή μέθοδος απομόνωσης και ανίχνευσης των CTCs για την συγκεκριμένη ομάδα ασθενών [17,84,85,116,117]. Στην παρούσα μελέτη, έγινε η προσπάθεια σύγκρισης τριών διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης των CTCs σε πρώιμο και μεταστατικό καρκίνο μαστού: α) του Cell Search System β) της σε πραγματικό χρόνο αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για την ανίχνευση του mRNA της κυτταροκερατίνης 19 σε περιφερικό αίμα και γ) της μεθόδου ανοσοφθορισμού για τον εντοπισμό των κυττάρων που εκφράζουν κυτταροκερατίνη.

Τα κύρια χαρακτηριστικά της κάθε μεθόδου απεικονίζονται συνοπτικά στον Πίνακα 6.

Assay	Blood volume	Enrichment method	Detection method	Cut-off
Cell Search	7.5ml/23ml (metastatic/ adjuvant disease)	Ferrofluids containing EpCAM antibodies	Immunodetection of CK 8, 18, 19 and DAPI staining, lack of CD45 detection	≥2, ≥5 CTCS /7.5ML ≥1,≥2 CTCS /23ML
RT-qPCR	20 ml	Manually operated density gradient centrifugation	RT-qPCR for CK19 mRNA	0.6 MCF-7 equivalents/5 µg RNA Not necessary for For2Do2 primers
Immunofluorescence	10 ⁶ PBMCs	Manually operated density gradient centrifugation	Immunodetection of CK 8, 18, 19 and DAPI staining, lack of CD45 detection	≥1 CTCS/ 10 ⁶ PBMCs

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Κύρια χαρακτηριστικά των 3 τεχνολογιών για την ανίχνευση των CTCs: CellSearch system, RT- qPCR για CK19 mRNA και ανοσοφθορισμός

Οι τρεις παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούν την ανίχνευση των κυτταροκερατινών σαν δείκτες των επιθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι σε ανοσοκυτταροχημική χρώση δειγμάτων προερχόμενων από τον μυελό των οστών ασθενών με καρκίνο μαστού με μία ευρεία γκάμα κυτταροκερατινών, ανιχνεύτηκαν διεσπαρμένα καρκινικά (CK19⁺) κύτταρα της τάξης των 52.6±11.5% [118].

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν μία πολλή σημαντική συμφωνία στην ανίχνευση των CTCs με την RT-qPCR και του συστήματος CellSearch στην μεταστατική ομάδα των ασθενών, αλλά όχι στους ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού. Καμία συμφωνία ως προς την ανίχνευση των CTCs δεν αποδείχθηκε μεταξύ του συστήματος CellSearch και του ανοσοφθορισμού ή του ανοσοφθορισμού και της

RT-qPCR στους ασθενείς με μεταστατικό ή πρώιμο καρκίνο μαστού. Όμως θα πρέπει να σημειωθεί ο μεγάλος αριθμός αρνητικών δειγμάτων και με τις τρεις μεθόδους, ιδιαίτερα στους ασθενείς με πρώιμο καρκίνο μαστού. Στην περίπτωση των ασθενών με μεταστατική νόσο η ανίχνευση των CTCs με καθεμία από τις τρεις μεθόδους είχε σημαντική προγνωστική αξία.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης CTCs σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο. Η σύγκριση του συστήματος CellSearch και του AdnaTest Breast Cancer, μίας εμπορικά διαθέσιμης μοριακής μεθόδου που περιλαμβάνει κυτταρική απομόνωση μέσω της χρήσης ενός κοκτέιλ αντισωμάτων έναντι του EpCAM και MUC-1 συνδεδεμένα με μαγνητικά σωματίδια και ακολουθούμενο από μια αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για EpCAM, MUC-1 και HER2, ανέδειξε σημαντική συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού [119]. Από την άλλη πλευρά, μία άλλη μελέτη όπου συγκρίθηκε το CellSearch με το AdnaTest Breast Cancer και την RT-qPCR για CK19 και μαστοσφαιρίνη σε μεταστατικούς ασθενείς, αναφέρει διαφορετικά ποσοστά ανίχνευσης και μία μέτρια συμφωνία μεταξύ των μεθόδων [110]. Επίσης, μία σύγκριση μεταξύ του συστήματος CellSearch και της τεχνικής Onco-Quick, έδειξε ότι το CellSearchTM είναι μια πιο ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος, όσον αφορά στην ανίχνευση και την καταμέτρηση των CTCs [120].

Στη μελέτη μας, η ανίχνευση των CTCs μεταξύ των ασθενών με πρώιμη νόσο ήταν 37% και 16.5% (με cut offs ≥ 1 και ≥ 2 CTCs) για το σύστημα CellSearch, 16.9% χρησιμοποιώντας τον ανοσοφθορισμό και 18% με την real time RT-qPCR. Μία άλλη προγενέστερη μελέτη από την ομάδα μας η οποία χρησιμοποίησε την ίδια υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας PCR μέθοδο σε πραγματικό χρόνο, ανέδειξε μια θετικότητα της τάξεως 20.6% σε 160 ασθενείς με πρώιμη νόσο οι οποίοι είχαν ανιχνεύσιμα CK19 mRNA θετικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα [88]. Παρομοίως σε μία μεγάλη πολυκεντρική μελέτη, την SUCCESS trial, 21.5% των ασθενών με πρώιμο καρκίνο μαστού είχαν ανιχνεύσιμο τουλάχιστον ένα CTCs σε 23 ml αίματος με την χρήση του συστήματος Cell Search [17], ενώ σε προηγούμενες μελέτες, ανιχνεύτηκαν CTCs σε ποσοστό έως και 30% σε ασθενείς με πρώιμη νόσο με την ίδια πλατφόρμα [121,122]. Επίσης στην μελέτη SUCCESS, 20.6% των 1221 ασθενών που πήραν

μέρος, είχαν έστω και ένα ανιχνεύσιμο CTCs μέσω χειροκίνητης ανοσοκυτταροχημικής χρώσης, (MICC) χρησιμοποιώντας anti-CK antibody A45-B/B3 στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος [123]. Στην δική μας μελέτη, ενώ οι συχνότητες ανίχνευσης και με τις τρεις μεθόδους είναι συγκρίσιμες, τα ποσοστά συμφωνίας (concordance) ως προς την θετικότητα ήταν χαμηλά, ενώ τα ποσοστά συμφωνίας ως προς τα αρνητικά ήταν μέτρια, συμβάλλοντας συνολικά σε σημαντική διαφωνία μεταξύ των μεθόδων.

Στον μεταστατικό καρκίνο μαστού, 53.7% των ασθενών είχαν ≥ 2 CTCs/7.5 ml αίματος. Χρησιμοποιώντας το ίδιο cut-off, ο Cristofanilli και συνεργάτες έδειξαν ότι η παρουσία των CTCs ήταν 64% μεταξύ ασθενών με μεταστατική νόσο που δεν είχαν πάρει προηγούμενα καμία θεραπεία [48]. Το σύστημα CellSearch και η RT-qPCR για την CK19 mRNA έδειξαν συγκρίσιμες συχνότητες ανίχνευσης στους μεταστατικούς ασθενείς ιδιαίτερα στο cut-off ≥ 5 CTCs/ 7.5 ml αίματος. Έτσι σε αντίθεση με τους ασθενείς με πρώιμη νόσο, μία σημαντική συμφωνία μεταξύ του CellSearch και της RT-qPCR ήταν εμφανής στη μεταστατική ομάδα ασθενών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο αυξημένο φορτίο των CTCs ή ίσως σε έναν πιο ομοιογενές γενετικά πληθυσμό των CTCs που μπορεί να υπάρχει στους μεταστατικούς ασθενείς συγκριτικά με αυτούς που έχουν πρώιμη νόσο [124]. Από την άλλη πλευρά, η σύγκριση μεταξύ του Cell Search και του ανοσοφθορισμού, όπως και της RT-qPCR και του ανοσοφθορισμού, έδειξε σημαντική διαφωνία στους μεταστατικούς ασθενείς.

Οι τεχνικές διαφορές στις προ-αναλυτικές και αναλυτικές διαδικασίες που αποτελούν μέρος σε καθεμία από τις μεθόδους ανίχνευσης θα μπορούσαν εν μέρει να δικαιολογήσουν τις ασυμφωνίες μεταξύ των μεθόδων που παρατηρήθηκαν. Ο όγκος αίματος που χρησιμοποιείται στον ανοσοφθορισμό είναι λιγότερος σε σχέση με το Cell Search ή την RT-qPCR. Επίσης διαφορετικές είναι οι τεχνικές απομόνωσης που χρησιμοποιούνται στις 3 μεθόδους: αυτόματος ανοσομαγνητικός διαχωρισμός στηριζόμενος στην έκφραση του EpCAM για το CellSearch, ενώ μία χειρωνακτική διαδικασία που περιλαμβάνει διαβαθμισμένη φυγοκέντρηση των δειγμάτων σύμφωνα με την πυκνότητα της φικόλης στην περίπτωση της RT-qPCR και του ανοσοφθορισμού. Ενώ η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο θεωρείται μία ειδική και ευαίσθητη τεχνολογία δεν μας επιτρέπει ακριβή

εκτίμηση του αριθμού των CTCs στο δείγμα, παρά μόνο τον αριθμό των μεταγράφων του γονιδίου στόχου.

Επίσης διαφορετικά cut-offs όρισαν την θετικότητα της κάθε μεθόδου.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφωνίες μεταξύ των μεθόδων λόγω της ετερογένειας των CTCs, είναι ότι η κάθε μέθοδος αξιολογεί διαφορετικούς δείκτες των CTCs. Προκειμένου να εξερευνήσουμε την βασιμότητα αυτής της υπόθεσης, πειράματα τριπλού ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του EpCAM, CK19 και CD45 πραγματοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρωμένες με μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών που παρουσίαζαν διαφορές στην ανίχνευση CTCs μέσω του Cell Search και της RT-qPCR. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5, η έκφραση των μορίων στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα εμφανίζει διαφοροποίηση τόσο στον ίδιο τον ασθενή όσο και μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Επιπροσθέτως στα 2/3 των ασθενών, η διαφορετική έκφραση των δεικτών θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων του CellSearch και της RT-qPCR που παρατηρήθηκε.

Η πολυπλοκότητα της σύγκρισης των τριών τεχνικών όσον αφορά την παρουσία των CTCs, απεικονίζεται πολύ ωραία στην αναφορά από την Στρατή και συνεργάτες, όπου αξιολογούνται τρεις μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση τους: μια singleplex RT-qPCR μέθοδος για CK-19, μια multiplex RT-qPCR για CK-19, HER-2, MAGE- A3, και PBGD και το AdnaTest Breast Cancer [89]. Στην μελέτη αυτή, υπήρξε πολύ καλή συμφωνία μεταξύ singleplex RT-qPCR και multiplex RT-qPCR στην ομάδα των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο, όταν ο ίδιος στόχος ανιχνεύτηκε στα ίδια cDNA, με το ίδιο σετ εκκινητών και ανιχνευτών. Από την άλλη πλευρά, διαφωνίες υπήρξαν μεταξύ των μεθόδων, όταν διαφορετικά γενετικά μετάγραφα χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να εκτιμήσουν την θετικότητα των CTCs, κάτι το οποίο υποστηρίζει την σημασία της ετερογένειας των CTCs ως προς την ανίχνευσή τους.

Ίσως η πιο σημαντική παράμετρος στη σύγκριση διαφορετικών μεθοδολογιών είναι εάν αυτές αναγνωρίζουν κλινικά παρεμφερείς πληθυσμούς CTCs. Από την άλλη πλευρά, η μελέτη της προγνωστικής σημασίας της ανίχνευσης των CTCs βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην τεχνολογία που χρησιμοποιείται. Το Cell Search System φαίνεται να υπερτερεί του ADNA test, στην πρόβλεψη της κλινικής έκβασης των ασθενών όσον

αφορά ασθενείς με προχωρημένο στάδιο καρκίνο του μαστού [111]. Στην μελέτη SUCCESS [17], η ανίχνευση των CTCs με την μέθοδο του Cell Search, φαίνεται να σχετίζεται με φτωχή κλινική έκβαση ασθενών με πρώιμη νόσο, ενώ από την άλλη στην ίδια μελέτη, η προγνωστική σημασία των CTCs δεν μπορεί να τεκμηριωθεί με την χρήση του MICC [123]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι διαφορετικές μέθοδοι ανίχνευσης των CTCs μπορούν να αναγνωρίσουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς των κυττάρων αυτών ο οποίος καθένας τους μπορεί να σχετίζεται διαφορετικά με την κλινική έκβαση των ασθενών. Στην μελέτη μας, η προγνωστική σημασία της ανίχνευσης των CTCs, δεν μπορεί να τεκμηριωθεί στην περίπτωση ασθενών με πρώιμη νόσο. Από την άλλη, στην περίπτωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο, η ανίχνευση των CTCs με καθεμία από τις τρεις μεθόδους, αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για μειωμένη συνολική επιβίωση. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα αποτελούν ανερχόμενους βιοδείκτες, μία υγρή βιοψία, που θα καθορίσει πρόγνωση και θα ληφθεί υπόψη για προσωποποιημένες θεραπείες. Ο μοριακός χαρακτηρισμός συγκεκριμένων υποτύπων CTCs που υπάρχει εξαιτίας της έκφρασης διαφορετικών γονιδίων θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της μετάστασης, στην αντίσταση σε καθιερωμένες θεραπείες (EMT, καρκινικός λήθαργος??) [125], όπως και στην ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων για βιολογικές θεραπείες.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη μας υποδεικνύει ότι η ποικιλομορφία των προ- και αναλυτικών διαδικασιών των διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης των CTCs αποτελεί έναν σημαντικό περιοριστικό παράγοντα όσον αφορά την πιθανότητα ανίχνευσης CTCs και την συνεπακόλουθη απόφαση που πρέπει να παρθεί σε κλινικό επίπεδο με βάση τα CTCs ως εργαλείο ανίχνευσης μικρομεταστατικής νόσου ή στην διαστρωμάτωση των ασθενών σε κλινικές δοκιμές. Το γεγονός της ετερογένειας των CTCs, της σπανιότητας, του περιορισμένου ποσοτικά βιολογικού δείγματος που μελετάται, αποτελούν τροχοπέδη στην αναλυτική διαδικασία και ταυτόχρονα μία πρόκληση. Ερευνητικά πρωτόκολλα και μέθοδοι για την απομόνωση, ανίχνευση και χαρακτηρισμό των CTCs πρέπει να βελτιστοποιηθούν και να επικυρωθούν σε μελλοντικές κλινικές δοκιμές. Για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, θα αποτελούσε μία μέθοδος η οποία θα μπορούσε να ανιχνεύσει όλους τους τύπους καρκινικών

κυττάρων (π.χ επιθηλιακού, επιθηλιο-μεσεγχυματικού, μεσεγχυματικού και μεσεγχυματικού /βλαστικού τύπου [126]).

7. Βιβλιογραφία

1. Bellanger, M.; Zeinomar, N.; Tehranifar, P.; Terry, M.B. Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies? *Journal of global oncology* **2018**, *4*, 1-16, doi:10.1200/jgo.17.00207.
2. Nardin, S.; Mora, E.; Varughese, F.M.; D'Avanzo, F.; Vachanaram, A.R.; Rossi, V.; Saggia, C.; Rubinelli, S.; Gennari, A. Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities. *Front Oncol* **2020**, *10*, 864, doi:10.3389/fonc.2020.00864.
3. Waks, A.G.; Winer, E.P. Breast Cancer Treatment: A Review. *Jama* **2019**, *321*, 288-300, doi:10.1001/jama.2018.19323.
4. O'Shaughnessy, J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. *The oncologist* **2005**, *10 Suppl 3*, 20-29, doi:10.1634/theoncologist.10-90003-20.
5. Sørlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 10869-10874, doi:10.1073/pnas.191367098.
6. Nishida, N.; Yano, H.; Nishida, T.; Kamura, T.; Kojiro, M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* **2006**, *2*, 213-219, doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.213.
7. Friedl, P.; Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 362-374, doi:10.1038/nrc1075.
8. Wyckoff, J.B.; Jones, J.G.; Condeelis, J.S.; Segall, J.E. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer research* **2000**, *60*, 2504-2511.
9. Bonnomet, A.; Syne, L.; Brysse, A.; Feyereisen, E.; Thompson, E.W.; Noël, A.; Foidart, J.M.; Birembaut, P.; Polette, M.; Gilles, C. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* **2012**, *31*, 3741-3753, doi:10.1038/onc.2011.540.
10. Fidler, I.J.; Poste, G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *Lancet Oncol* **2008**, *9*, 808, doi:10.1016/s1470-2045(08)70201-8.
11. Liu, Q.; Zhang, H.; Jiang, X.; Qian, C.; Liu, Z.; Luo, D. Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to "seed and soil" hypothesis. *Molecular cancer* **2017**, *16*, 176, doi:10.1186/s12943-017-0742-4.
12. Chambers, A.F.; Groom, A.C.; MacDonald, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 563-572, doi:10.1038/nrc865.
13. Joosse, S.A.; Gorges, T.M.; Pantel, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO molecular medicine* **2015**, *7*, 1-11, doi:10.15252/emmm.201303698.
14. Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **2010**, *60*, 277-300, doi:10.3322/caac.20073.
15. Ashworth, T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J.* **1869**, *14*, 146.
16. Bidard, F.C.; Peeters, D.J.; Fehm, T.; Nolé, F.; Gisbert-Criado, R.; Mavroudis, D.; Grisanti, S.; Generali, D.; Garcia-Saenz, J.A.; Stebbing, J.; et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* **2014**, *15*, 406-414, doi:10.1016/s1470-2045(14)70069-5.
17. Rack, B.; Schindlbeck, C.; Jückstock, J.; Andergassen, U.; Hepp, P.; Zwingers, T.; Friedl, T.W.; Lorenz, R.; Tesch, H.; Fasching, P.A.; et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **2014**, *106*, doi:10.1093/jnci/dju066.
18. Alix-Panabières, C.; Pantel, K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* **2013**, *59*, 110-118, doi:10.1373/clinchem.2012.194258.

19. Gross, H.J.; Verwer, B.; Houck, D.; Hoffman, R.A.; Recktenwald, D. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10(-7). *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 537-541, doi:10.1073/pnas.92.2.537.
20. Norton, L.; Massagué, J. Is cancer a disease of self-seeding? *Nat Med* **2006**, *12*, 875-878, doi:10.1038/nm0806-875.
21. Braun, S.; Vogl, F.D.; Naume, B.; Janni, W.; Osborne, M.P.; Coombes, R.C.; Schlimok, G.; Diel, I.J.; Gerber, B.; Gebauer, G.; et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 793-802, doi:10.1056/NEJMoa050434.
22. Ignatiadis, M.; Rothé, F.; Chaboteaux, C.; Durbecq, V.; Rouas, G.; Criscitiello, C.; Metallo, J.; Kheddoumi, N.; Singhal, S.K.; Michiels, S.; et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One* **2011**, *6*, e15624, doi:10.1371/journal.pone.0015624.
23. Alix-Panabières, C.; Riethdorf, S.; Pantel, K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 5013-5021, doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-5125.
24. Lianidou, E.S.; Markou, A.; Strati, A. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer: challenges and promises for individualized cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* **2012**, *31*, 663-671, doi:10.1007/s10555-012-9366-8.
25. Amir, E.; Clemons, M.; Purdie, C.A.; Miller, N.; Quinlan, P.; Geddie, W.; Coleman, R.E.; Freedman, O.C.; Jordan, L.B.; Thompson, A.M. Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev* **2012**, *38*, 708-714, doi:10.1016/j.ctrv.2011.11.006.
26. Powell, A.A.; Talasaz, A.H.; Zhang, H.; Coram, M.A.; Reddy, A.; Deng, G.; Telli, M.L.; Advani, R.H.; Carlson, R.W.; Mollick, J.A.; et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One* **2012**, *7*, e33788, doi:10.1371/journal.pone.0033788.
27. Witzig, T.E.; Bossy, B.; Kimlinger, T.; Roche, P.C.; Ingle, J.N.; Grant, C.; Donohue, J.; Suman, V.J.; Harrington, D.; Torre-Bueno, J.; et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 1085-1091.
28. Pantel, K.; Brakenhoff, R.H.; Brandt, B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 329-340, doi:10.1038/nrc2375.
29. Alix-Panabières, C.; Schwarzenbach, H.; Pantel, K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annual review of medicine* **2012**, *63*, 199-215, doi:10.1146/annurev-med-062310-094219.
30. Bednarz-Knoll, N.; Alix-Panabières, C.; Pantel, K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* **2011**, *13*, 228, doi:10.1186/bcr2940.
31. Broersen, L.H.; van Pelt, G.W.; Tollenaar, R.A.; Mesker, W.E. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)* **2014**, *37*, 9-15, doi:10.1007/s13402-013-0160-6.
32. Desitter, I.; Guerrouahen, B.S.; Benali-Furet, N.; Wechsler, J.; Jänne, P.A.; Kuang, Y.; Yanagita, M.; Wang, L.; Berkowitz, J.A.; Distel, R.J.; et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* **2011**, *31*, 427-441.
33. Vona, G.; Sabile, A.; Louha, M.; Sitruk, V.; Romana, S.; Schütze, K.; Capron, F.; Franco, D.; Pazzagli, M.; Vekemans, M.; et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* **2000**, *156*, 57-63, doi:10.1016/s0002-9440(10)64706-2.
34. Zheng, S.; Lin, H.; Liu, J.Q.; Balic, M.; Datar, R.; Cote, R.J.; Tai, Y.C. Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. *J Chromatogr A* **2007**, *1162*, 154-161, doi:10.1016/j.chroma.2007.05.064.

35. Ma, Y.C.; Wang, L.; Yu, F.L. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology. *Technol Cancer Res Treat* **2013**, *12*, 295-309, doi:10.7785/tcrt.2012.500328.
36. Rosenberg, R.; Gertler, R.; Friederichs, J.; Fuehrer, K.; Dahm, M.; Phelps, R.; Thorban, S.; Nekarda, H.; Siewert, J.R. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* **2002**, *49*, 150-158, doi:10.1002/cyto.10161.
37. Gertler, R.; Rosenberg, R.; Fuehrer, K.; Dahm, M.; Nekarda, H.; Siewert, J.R. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* **2003**, *162*, 149-155, doi:10.1007/978-3-642-59349-9_13.
38. Woelfle, U.; Breit, E.; Zafrakas, K.; Otte, M.; Schubert, F.; Müller, V.; Izbicki, J.R.; Löning, T.; Pantel, K. Bi-specific immunomagnetic enrichment of micrometastatic tumour cell clusters from bone marrow of cancer patients. *J Immunol Methods* **2005**, *300*, 136-145, doi:10.1016/j.jim.2005.03.006.
39. Galanzha, E.I.; Zharov, V.P. Circulating Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo. *Cancers (Basel)* **2013**, *5*, 1691-1738, doi:10.3390/cancers5041691.
40. Zhang, Z.; Xu, J.; Hong, B.; Chen, X. The effects of 3D channel geometry on CTC passing pressure--towards deformability-based cancer cell separation. *Lab Chip* **2014**, *14*, 2576-2584, doi:10.1039/c4lc00301b.
41. Moon, H.S.; Kwon, K.; Kim, S.I.; Han, H.; Sohn, J.; Lee, S.; Jung, H.I. Continuous separation of breast cancer cells from blood samples using multi-orifice flow fractionation (MOFF) and dielectrophoresis (DEP). *Lab Chip* **2011**, *11*, 1118-1125, doi:10.1039/c0lc00345j.
42. Alazzam, A.; Stiharu, I.; Bhat, R.; Meguerditchian, A.N. Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 1327-1336, doi:10.1002/elps.201000625.
43. Gupta, V.; Jafferji, I.; Garza, M.; Melnikova, V.O.; Hasegawa, D.K.; Pethig, R.; Davis, D.W. ApoStreamTM, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics* **2012**, *6*, 24133, doi:10.1063/1.4731647.
44. Went, P.T.; Lugli, A.; Meier, S.; Bundi, M.; Mirlacher, M.; Sauter, G.; Dirnhofer, S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* **2004**, *35*, 122-128, doi:10.1016/j.humphath.2003.08.026.
45. Failli, A.; Legitimo, A.; Migheli, F.; Coppedè, F.; Mathers, J.C.; Spisni, R.; Miccoli, P.; Migliore, L.; Consolini, R. Efficacy and feasibility of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) immunomagnetic cell sorter for studies of DNA methylation in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* **2013**, *15*, 44-57, doi:10.3390/ijms15010044.
46. Iinuma, H.; Okinaga, K.; Adachi, M.; Suda, K.; Sekine, T.; Sakagawa, K.; Baba, Y.; Tamura, J.; Kumagai, H.; Ida, A. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* **2000**, *89*, 337-344, doi:10.1002/1097-0215(20000720)89:4<337::aid-ijc4>3.0.co;2-r.
47. Dong, X.; Alpaugh, K.R.; Cristofanilli, M. Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer: a diagnostic tool for prognosis and molecular analysis. *Chin J Cancer Res* **2012**, *24*, 388-398, doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2012.11.03.
48. Cristofanilli, M.; Budd, G.T.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Matera, J.; Miller, M.C.; Reuben, J.M.; Doyle, G.V.; Allard, W.J.; Terstappen, L.W.; et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* **2004**, *351*, 781-791, doi:10.1056/NEJMoa040766.

49. de Bono, J.S.; Scher, H.I.; Montgomery, R.B.; Parker, C.; Miller, M.C.; Tissing, H.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W.; Pienta, K.J.; Raghavan, D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 6302-6309, doi:10.1158/1078-0432.ccr-08-0872.
50. Cohen, S.J.; Punt, C.J.; Iannotti, N.; Saidman, B.H.; Sabbath, K.D.; Gabrail, N.Y.; Picus, J.; Morse, M.; Mitchell, E.; Miller, M.C.; et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 3213-3221, doi:10.1200/jco.2007.15.8923.
51. Bluemke, K.; Bilkenroth, U.; Meye, A.; Fuessel, S.; Lautenschlaeger, C.; Goebel, S.; Melchior, A.; Heynemann, H.; Fornara, P.; Taubert, H. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma correlates with prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2009**, *18*, 2190-2194, doi:10.1158/1055-9965.epi-08-1178.
52. Zieglschmid, V.; Hollmann, C.; Gutierrez, B.; Albert, W.; Strothoff, D.; Gross, E.; Böcher, O. Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. *Anticancer Res* **2005**, *25*, 1803-1810.
53. Lianidou, E.S.; Markou, A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem* **2011**, *57*, 1242-1255, doi:10.1373/clinchem.2011.165068.
54. Markou, A.; Strati, A.; Malamos, N.; Georgoulas, V.; Lianidou, E.S. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem* **2011**, *57*, 421-430, doi:10.1373/clinchem.2010.154328.
55. Nagrath, S.; Sequist, L.V.; Maheswaran, S.; Bell, D.W.; Irimia, D.; Ulkus, L.; Smith, M.R.; Kwak, E.L.; Digumarthy, S.; Muzikansky, A.; et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **2007**, *450*, 1235-1239, doi:10.1038/nature06385.
56. Sequist, L.V.; Nagrath, S.; Toner, M.; Haber, D.A.; Lynch, T.J. The CTC-chip: an exciting new tool to detect circulating tumor cells in lung cancer patients. *J Thorac Oncol* **2009**, *4*, 281-283, doi:10.1097/JTO.0b013e3181989565.
57. Horak, D.; Svobodova, Z.; Autebert, J.; Coudert, B.; Plichta, Z.; Kralovec, K.; Bilkova, Z.; Viovy, J.L. Albumin-coated monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with immobilized antibodies: application to the capture of epithelial cancer cells. *J Biomed Mater Res A* **2013**, *101*, 23-32, doi:10.1002/jbm.a.34297.
58. Harb, W.; Fan, A.; Tran, T.; Danila, D.C.; Keys, D.; Schwartz, M.; Ionescu-Zanetti, C. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. *Transl Oncol* **2013**, *6*, 528-538, doi:10.1593/tlo.13367.
59. Stott, S.L.; Hsu, C.H.; Tsukrov, D.I.; Yu, M.; Miyamoto, D.T.; Waltman, B.A.; Rothenberg, S.M.; Shah, A.M.; Smas, M.E.; Korir, G.K.; et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 18392-18397, doi:10.1073/pnas.1012539107.
60. Riahi, R.; Gogoi, P.; Sepehri, S.; Zhou, Y.; Handique, K.; Godsey, J.; Wang, Y. A novel microchannel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer. *Int J Oncol* **2014**, *44*, 1870-1878, doi:10.3892/ijo.2014.2353.
61. Naume, B.; Borgen, E.; Tossvik, S.; Pavlak, N.; Oates, D.; Nesland, J.M. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy* **2004**, *6*, 244-252, doi:10.1080/14653240410006086.
62. Kroes, R.; Williams, G.M.; Weisburger, J.H. Early appearance of serum α -fetoprotein during hepatocarcinogenesis as a function of age of rats and extent of treatment with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer research* **1972**, *32*, 1526-1532.
63. Shi, W.; Paproski, R.J.; Moore, R.; Zemp, R. Detection of circulating tumor cells using targeted surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and magnetic enrichment. *J Biomed Opt* **2014**, *19*, 056014, doi:10.1117/1.JBO.19.5.056014.

64. Sieuwerts, A.M.; Kraan, J.; Bolt, J.; van der Spoel, P.; Elstrodt, F.; Schutte, M.; Martens, J.W.; Gratama, J.W.; Sleijfer, S.; Foekens, J.A. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* **2009**, *101*, 61-66, doi:10.1093/jnci/djn419.
65. Hannemann, J.; Meyer-Staekling, S.; Kemming, D.; Alpers, I.; Joosse, S.A.; Pospisil, H.; Kurtz, S.; Gorndt, J.; Puschel, K.; Riethdorf, S.; et al. Quantitative high-resolution genomic analysis of single cancer cells. *PLoS One* **2011**, *6*, e26362, doi:10.1371/journal.pone.0026362.
66. Di Trapani, M.; Manaresi, N.; Medoro, G. DEPArray system: An automatic image-based sorter for isolation of pure circulating tumor cells. *Cytometry A* **2018**, *93*, 1260-1266, doi:10.1002/cyto.a.23687.
67. Saucedo-Zeni, N.; Mewes, S.; Niestroj, R.; Gasiorowski, L.; Murawa, D.; Nowaczyk, P.; Tomasi, T.; Weber, E.; Dworacki, G.; Morgenthaler, N.G.; et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol* **2012**, *41*, 1241-1250, doi:10.3892/ijo.2012.1557.
68. Eifler, R.L.; Lind, J.; Falkenhagen, D.; Weber, V.; Fischer, M.B.; Zeillinger, R. Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation: proof of concept. *Cytometry B Clin Cytom* **2011**, *80*, 100-111, doi:10.1002/cyto.b.20560.
69. Schwarzenbach, H.; Hoon, D.S.; Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 426-437, doi:10.1038/nrc3066.
70. Cedar, H.; Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics* **2009**, *10*, 295-304, doi:10.1038/nrg2540.
71. Rossi, G.; Mu, Z.; Rademaker, A.W.; Austin, L.K.; Strickland, K.S.; Costa, R.L.B.; Nagy, R.J.; Zagonel, V.; Taxter, T.J.; Behdad, A.; et al. Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells: Comprehensive Liquid Biopsy Analysis in Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 560-568, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2092.
72. Alix-Panabieres, C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* **2012**, *195*, 69-76, doi:10.1007/978-3-642-28160-0_6.
73. Pantel, K.; Cote, R.J.; Fodstad, O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* **1999**, *91*, 1113-1124, doi:10.1093/jnci/91.13.1113.
74. Kallergi, G.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V.; Stournaras, C. Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells. *Mol Med* **2007**, *13*, 79-88, doi:10.2119/2006-00083.Kallergi.
75. Kallergi, G.; Markomanolaki, H.; Giannoukarakaki, V.; Papadaki, M.A.; Strati, A.; Lianidou, E.S.; Georgoulas, V.; Mavroudis, D.; Agelaki, S. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **2009**, *11*, R84, doi:10.1186/bcr2452.
76. Kallergi, G.; Papadaki, M.A.; Politaki, E.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V.; Agelaki, S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **2011**, *13*, R59, doi:10.1186/bcr2896.
77. Spiliotaki, M.; Mavroudis, D.; Kapranou, K.; Markomanolaki, H.; Kallergi, G.; Koinis, F.; Kalbakis, K.; Georgoulas, V.; Agelaki, S. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. *Breast Cancer Res* **2014**, *16*, 485, doi:10.1186/s13058-014-0485-8.
78. Wang, N.; Shi, L.; Li, H.; Hu, Y.; Du, W.; Liu, W.; Zheng, J.; Huang, S.; Qu, X. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry: a valuable tool for diagnosis and prognosis evaluation. *Tumour Biol* **2012**, *33*, 561-569, doi:10.1007/s13277-011-0303-1.

79. Schoenfeld, A.; Luqmani, Y.; Smith, D.; O'Reilly, S.; Shousha, S.; Sinnett, H.D.; Coombes, R.C. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer research* **1994**, *54*, 2986-2990.
80. Mocellin, S.; Keilholz, U.; Rossi, C.R.; Nitti, D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* **2006**, *12*, 130-139, doi:10.1016/j.molmed.2006.01.006.
81. Gerges, N.; Rak, J.; Jabado, N. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull* **2010**, *94*, 49-64, doi:10.1093/bmb/ldq011.
82. Smith, B.; Selby, P.; Southgate, J.; Pittman, K.; Bradley, C.; Blair, G.E. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* **1991**, *338*, 1227-1229, doi:10.1016/0140-6736(91)92100-g.
83. Ignatiadis, M.; Kallergi, G.; Ntoulia, M.; Perraki, M.; Apostolaki, S.; Kafousi, M.; Chlouverakis, G.; Stathopoulos, E.; Lianidou, E.; Georgoulis, V.; et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 2593-2600, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4758.
84. Xenidis, N.; Ignatiadis, M.; Apostolaki, S.; Perraki, M.; Kalbakis, K.; Agelaki, S.; Stathopoulos, E.N.; Chlouverakis, G.; Lianidou, E.; Kakolyris, S.; et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol* **2009**, *27*, 2177-2184, doi:10.1200/JCO.2008.18.0497.
85. Xenidis, N.; Perraki, M.; Kafousi, M.; Apostolaki, S.; Bolonaki, I.; Stathopoulou, A.; Kalbakis, K.; Androulakis, N.; Kouroussis, C.; Pallis, T.; et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* **2006**, *24*, 3756-3762, doi:10.1200/JCO.2005.04.5948.
86. Agrawal, B.; Krantz, M.J.; Parker, J.; Longenecker, B.M. Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer research* **1998**, *58*, 4079-4081.
87. Stathopoulou, A.; Gizi, A.; Perraki, M.; Apostolaki, S.; Malamos, N.; Mavroudis, D.; Georgoulis, V.; Lianidou, E.S. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 5145-5151.
88. Stathopoulou, A.; Ntoulia, M.; Perraki, M.; Apostolaki, S.; Mavroudis, D.; Malamos, N.; Georgoulis, V.; Lianidou, E.S. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer* **2006**, *119*, 1654-1659, doi:10.1002/ijc.22017.
89. Strati, A.; Kasimir-Bauer, S.; Markou, A.; Parisi, C.; Lianidou, E.S. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res* **2013**, *15*, R20, doi:10.1186/bcr3395.
90. Krebs, M.G.; Sloane, R.; Priest, L.; Lancashire, L.; Hou, J.M.; Greystoke, A.; Ward, T.H.; Ferraldeschi, R.; Hughes, A.; Clack, G.; et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **2011**, *29*, 1556-1563, doi:10.1200/jco.2010.28.7045.
91. Hou, J.M.; Krebs, M.G.; Lancashire, L.; Sloane, R.; Backen, A.; Swain, R.K.; Priest, L.J.; Greystoke, A.; Zhou, C.; Morris, K.; et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 525-532, doi:10.1200/jco.2010.33.3716.
92. Budd, G.T.; Cristofanilli, M.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Borden, E.; Miller, M.C.; Matera, J.; Repollet, M.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W.; et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 6403-6409, doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-1769.

93. Lucci, A.; Hall, C.S.; Lodhi, A.K.; Bhattacharyya, A.; Anderson, A.E.; Xiao, L.; Bedrosian, I.; Kuerer, H.M.; Krishnamurthy, S. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol* **2012**, *13*, 688-695, doi:10.1016/s1470-2045(12)70209-7.
94. Rink, M.; Chun, F.K.; Minner, S.; Friedrich, M.; Mauermann, O.; Heinzer, H.; Huland, H.; Fisch, M.; Pantel, K.; Riethdorf, S. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU international* **2011**, *107*, 1668-1675, doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09562.x.
95. Gazzaniga, P.; de Berardinis, E.; Raimondi, C.; Gradilone, A.; Busetto, G.M.; De Falco, E.; Nicolazzo, C.; Giovannone, R.; Gentile, V.; Cortesi, E.; et al. Circulating tumor cells detection has independent prognostic impact in high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Cancer* **2014**, *135*, 1978-1982, doi:10.1002/ijc.28830.
96. Denève, E.; Riethdorf, S.; Ramos, J.; Nocca, D.; Coffy, A.; Daurès, J.P.; Maudelonde, T.; Fabre, J.M.; Pantel, K.; Alix-Panabières, C. Capture of viable circulating tumor cells in the liver of colorectal cancer patients. *Clin Chem* **2013**, *59*, 1384-1392, doi:10.1373/clinchem.2013.202846.
97. Fischer, J.C.; Niederacher, D.; Topp, S.A.; Honisch, E.; Schumacher, S.; Schmitz, N.; Zacarias Föhrding, L.; Vay, C.; Hoffmann, I.; Kasprovicz, N.S.; et al. Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 16580-16585, doi:10.1073/pnas.1313594110.
98. Stathopoulou, A.; Vlachonikolis, I.; Mavroudis, D.; Perraki, M.; Kouroussis, C.; Apostolaki, S.; Malamos, N.; Kakolyris, S.; Kotsakis, A.; Xenidis, N.; et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* **2002**, *20*, 3404-3412, doi:10.1200/JCO.2002.08.135.
99. Xenidis, N.; Vlachonikolis, I.; Mavroudis, D.; Perraki, M.; Stathopoulou, A.; Malamos, N.; Kouroussis, C.; Kakolyris, S.; Apostolaki, S.; Vardakis, N.; et al. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol* **2003**, *14*, 849-855, doi:10.1093/annonc/mdg259.
100. Ignatiadis, M.; Xenidis, N.; Perraki, M.; Apostolaki, S.; Politaki, E.; Kafousi, M.; Stathopoulos, E.N.; Stathopoulou, A.; Lianidou, E.; Chlouverakis, G.; et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* **2007**, *25*, 5194-5202, doi:10.1200/JCO.2007.11.7762.
101. Xenidis, N.; Markos, V.; Apostolaki, S.; Perraki, M.; Pallis, A.; Sfakiotaki, G.; Papadatos-Pastos, D.; Kalmanti, L.; Kafousi, M.; Stathopoulos, E.; et al. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. *Ann Oncol* **2007**, *18*, 1623-1631, doi:10.1093/annonc/mdm208.
102. Matikas, A.; Kotsakis, A.; Apostolaki, S.; Politaki, H.; Perraki, M.; Kalbakis, K.; Nikolaou, M.; Economopoulou, P.; Hatzidaki, D.; Georgoulas, V. Detection of circulating tumour cells before and following adjuvant chemotherapy and long-term prognosis of early breast cancer. *Br J Cancer* **2022**, *126*, 1563-1569, doi:10.1038/s41416-022-01699-5.
103. Georgoulas, V.; Apostolaki, S.; Bozionelou, V.; Politaki, E.; Perraki, M.; Georgoulia, N.; Kalbakis, K.; Kotsakis, A.; Xyrafas, A.; Agelaki, S.; et al. Effect of front-line chemotherapy on circulating CK-19 mRNA-positive cells in patients with metastatic breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2014**, *74*, 1217-1225, doi:10.1007/s00280-014-2598-2.
104. Androulakis, N.; Agelaki, S.; Perraki, M.; Apostolaki, S.; Bozionelou, V.; Pallis, A.; Kalbakis, K.; Xyrafas, A.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V. Clinical relevance of circulating

- CK-19mRNA-positive tumour cells before front-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* **2012**, *106*, 1917-1925, doi:10.1038/bjc.2012.202.
105. Hayes, D.F.; Cristofanilli, M.; Budd, G.T.; Ellis, M.J.; Stopeck, A.; Miller, M.C.; Matera, J.; Allard, W.J.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 4218-4224, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2821.
106. Cristofanilli, M.; Broglio, K.R.; Guarneri, V.; Jackson, S.; Fritsche, H.A.; Islam, R.; Dawood, S.; Reuben, J.M.; Kau, S.W.; Lara, J.M.; et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer* **2007**, *7*, 471-479.
107. Riethdorf, S.; Fritsche, H.; Muller, V.; Rau, T.; Schindlbeck, C.; Rack, B.; Janni, W.; Coith, C.; Beck, K.; Janicke, F.; 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*, 920-928, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1695.
108. Rack, B.K.; Schindlbeck, C.; Hofmann, S.; Schneeweiss, A.; Rezai, M.; Beckmann, M.; Pantel, K.; Schneider, A.; Sommer, H.; Janni, W. Circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of primary breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* **2007**, *25*, 10595-10595, doi:10.1200/jco.2007.25.18_suppl.10595.
109. Rack, B.K.; Schindlbeck, C.; Andergassen, U.; Schneeweiss, A.; Zwingers, T.; Lichtenegger, W.; Beckmann, M.; Sommer, H.L.; Pantel, K.; Janni, W.; et al. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, *28*, 1003-1003, doi:10.1200/jco.2010.28.15_suppl.1003.
110. Van der Auwera, I.; Peeters, D.; Benoy, I.H.; Elst, H.J.; Van Laere, S.J.; Prove, A.; Maes, H.; Huget, P.; van Dam, P.; Vermeulen, P.B.; et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* **2010**, *102*, 276-284, doi:10.1038/sj.bjc.6605472.
111. Muller, V.; Riethdorf, S.; Rack, B.; Janni, W.; Fasching, P.A.; Solomayer, E.; Aktas, B.; Kasimir-Bauer, S.; Pantel, K.; Fehm, T.; et al. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System and AdnaTest Breast in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res* **2012**, *14*, R118, doi:10.1186/bcr3243.
112. Pantel, K.; Alix-Panabières, C.; Riethdorf, S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* **2009**, *6*, 339-351, doi:10.1038/nrclinonc.2009.44.
113. Kasimir-Bauer, S. Circulating tumor cells as markers for cancer risk assessment and treatment monitoring. *Molecular diagnosis & therapy* **2009**, *13*, 209-215, doi:10.1007/bf03256327.
114. Theodoropoulos, P.A.; Polioudaki, H.; Agelaki, S.; Kallergi, G.; Saridaki, Z.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett* **2010**, *288*, 99-106, doi:10.1016/j.canlet.2009.06.027.
115. Yu, M.; Bardia, A.; Wittner, B.S.; Stott, S.L.; Smas, M.E.; Ting, D.T.; Isakoff, S.J.; Ciciliano, J.C.; Wells, M.N.; Shah, A.M.; et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* **2013**, *339*, 580-584, doi:10.1126/science.1228522.
116. Daskalaki, A.; Agelaki, S.; Perraki, M.; Apostolaki, S.; Xenidis, N.; Stathopoulos, E.; Kontopodis, E.; Hatzidaki, D.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* **2009**, *101*, 589-597, doi:10.1038/sj.bjc.6605183.
117. Saloustros, E.; Perraki, M.; Apostolaki, S.; Kallergi, G.; Xyrafas, A.; Kalbakis, K.; Agelaki, S.; Kalykaki, A.; Georgoulas, V.; Mavroudis, D. Cytokeratin-19 mRNA-positive

- circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse. *Breast Cancer Res* **2011**, *13*, R60, doi:10.1186/bcr2897.
118. Demeulemeester, J.; Kumar, P.; Moller, E.K.; Nord, S.; Wedge, D.C.; Peterson, A.; Mathiesen, R.R.; Fjellidal, R.; Zamani Esteki, M.; Theunis, K.; et al. Tracing the origin of disseminated tumor cells in breast cancer using single-cell sequencing. *Genome Biol* **2016**, *17*, 250, doi:10.1186/s13059-016-1109-7.
119. Andreopoulou, E.; Yang, L.Y.; Rangel, K.M.; Reuben, J.M.; Hsu, L.; Krishnamurthy, S.; Valero, V.; Fritsche, H.A.; Cristofanilli, M. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int J Cancer* **2012**, *130*, 1590-1597, doi:10.1002/ijc.26111.
120. Balic, M.; Dandachi, N.; Hofmann, G.; Samonigg, H.; Loibner, H.; Obwaller, A.; van der Kooi, A.; Tibbe, A.G.; Doyle, G.V.; Terstappen, L.W.; et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom* **2005**, *68*, 25-30, doi:10.1002/cyto.b.20065.
121. Biggers, B.; Knox, S.; Grant, M.; Kuhn, J.; Nemunatitis, J.; Fisher, T.; Lamont, J. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for primary breast cancer: preliminary results of a pilot study. *Ann Surg Oncol* **2009**, *16*, 969-971, doi:10.1245/s10434-009-0314-y.
122. Sandri, M.T.; Zorzino, L.; Cassatella, M.C.; Bassi, F.; Luini, A.; Casadio, C.; Botteri, E.; Rotmensz, N.; Adamoli, L.; Nole, F. Changes in circulating tumor cell detection in patients with localized breast cancer before and after surgery. *Ann Surg Oncol* **2010**, *17*, 1539-1545, doi:10.1245/s10434-010-0918-2.
123. Jueckstock, J.; Rack, B.; Friedl, T.W.; Scholz, C.; Steidl, J.; Trapp, E.; Tesch, H.; Forstbauer, H.; Lorenz, R.; Rezai, M.; et al. Detection of circulating tumor cells using manually performed immunocytochemistry (MICC) does not correlate with outcome in patients with early breast cancer - Results of the German SUCCESS-A- trial. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 401, doi:10.1186/s12885-016-2454-3.
124. Klein, C.A. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* **2013**, *501*, 365-372, doi:10.1038/nature12628.
125. Mego, M.; Mani, S.A.; Cristofanilli, M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* **2010**, *7*, 693, doi:10.1038/nrclinonc.2010.171.
126. Barriere, G.; Fici, P.; Gallerani, G.; Fabbri, F.; Zoli, W.; Rigaud, M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Annals of translational medicine* **2014**, *2*, 109, doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04.
127. Bidard FC, Jacot W, Kiavue N, Dureau S, Kadi A, Brain E, Bachelot T, Bourgeois H, Gonçalves A, Ladoire S, Naman H, Dalenc F, Gligorov J, Espié M, Emile G, Ferrero JM, Loirat D, Frank S, Cabel L, Diéras V, Cayrefourcq L, Simondi C, Berger F, Alix-Panabières C, Pierga JY. Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2021** *7*(1):34-41. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.5660.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ (ABBREVIATIONS):

CTC	CIRCULATING TUMOR CELL
CK 18, 19, 20	CYTOKERATIN 18, 19, 20
ERBB2/HER2	HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2
EPCAM	EPITHELIAL CELL ADHESION MOLECULE
EMT	EPITHELIO-MESENCHYMATIC TRANSITION
MET	MESENCHYMATIC-EPITHELIO TRANSITION
MUC	MUCIN
CD45	CLUSTER OF DIFFERENTIATION 45
FITC	FLUORESCCEIN ISOTHIOCYANATE
FDA	FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
CT DNA	CIRCULATING TUMOR DNA
RT qPCR	REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION
PSA	PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN
CEA	CARCINO EMBRYONIC ANTIGEN
PE	PHYCOERYTHRIN
APC	ALLOPHYCOCYANIN
DFS	DISEASE FREE SURVIVAL
PFS	PROGRESSION FREE SURVIVAL
OS	OVERALL SURVIVAL
FRET	FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER
IF	IMMUNOFLUORESCENCE
PBS	PHOSPHATE BUFFER SALINE
FBS	FETAL BOVINE SERUM
EDTA	ETHYLENEDIAMINE TETRAACETIC ACID
ΚΚΚ	ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΔΚΚ	ΔΙΕΣΠΑΡΜΕΝΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

