Archive of SID

بررسی بیومارکر CK19 درخون بیماران مبتلا به سرطان پستان

دکتر مانا علومی[*]، دکتر سعید بوذری[**]، افسانه رسائیان[***]، دکتر محمد علی محققی[****]

چکیده:

زمینه و هدف: سرطان پستان، یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در زنان می‌باشد که در نتیجه ابتلا به آن سالانه حدود ٤٠٠٠٠ تا ٥٠٠٠٠ نفر جان خود را از دست می‌دهند. سرطان پستان در ایران و جهان یکی از شایعترین بدخیمی‌ها در بین زنان گزارش شده است، اما اپیدمیولوژی سرطان پستان در ایران مشخص نیست. تشخیص زود هنگام سلول‌های سرطانی انتشار یافته در خون محیطی می‌تواند به درمان به موقع بیماری کمک زیادی نماید. در حالیکه هتروژنیتی سرطان پستان در سطح مولکولی مشاهده شده است، سلول‌های سرطانی انتشار یافته در خون محیطی می‌تواند به عنوان یک مارکر جدید مطرح گردد. از طرف دیگر مارکر سیتوکراتین -۱۹ در خون بطور تقریبی در ۲۰ -٤٠٪ بیماران قابل شناسایی گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ابتدا از خون ٦٠ نمونه انسانی (۳۰ بیمار و۳۰ فرد سالم) RNA استخراج گردید. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن سیتوکراتین ۱۹ (CK19)، تکنیک RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) بر روی RNA استخراج شده انجام گرفت. سپس با استفاده از روش آماری کای‌اسکور اهمیت بیان ژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بیان سیتوکراتین در بین بیماران و افراد سالم نشان داد که از مجموع ۳۰ بیمار در تمامی موارد بیان ژن CK19 مشاهده گردید. در حالیکه افراد سالم در دو گروه قرار گرفتند: در یک گروه سیتوکراتین بیان نشد، اما در گروه دیگری از افراد سالم بیان سیتوکراتین مشاهده شد. بیان سیتوکراتین در این گروه از افراد سالم با سابقه فامیلی بیماری سرطان در ارتباط بود.

نتیجه‌گیری: بررسی حضور بیومارکر سیتوکراتین ۱۹ در مراحل اولیه بیماری می‌تواند به عنوان شاخص پیش‌آگهی مناسبی در خون بیماران مطرح گردد. بررسی تعداد بیشتری از بیماران با مارکرهای بیشتر با ارزش تشخیصی و یا با ارزش پیش‌آگهی بیماری در بررسی‌های آینده باید مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، بیومارکر

زمینه و هدف

سرطان پستان شایعترین سرطان بین زنان در دنیا است.[1] میزان شیوع سرطان پستان در زنان افزایش یافته و یکی از در کشورهای آسیایی مانند ایران نیز طی چهار دهه گذشته شایعترین بدخیمی‌ها در بین زنان ایرانی شناخته شده است.

[*] استادیار گروه بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

[**] استاد گروه بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

[***] کارشناس ارشد زیست جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی

[****] دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات سرطان

تاریخ وصول: ۱۳۸۹/۱۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۱۱

نویسندهٔ پاسخگو: دکتر مانا علومی

تلفن: ۲۰ - ۶۶۹۵۳۳۱۱

E-mail: manaoloomi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

این نوع سرطان در زنان کمتر از ۳۰ سال نادر است و پس از ۴۰ سالگی شیوع آن بیشتر می‌شود. در کشور آمریکا به عنوان دومین عامل مرگ و میر بعد از سرطان ریه در زنان محسوب می‌شود و نزدیک به ۴۰/۰۰۰ تا ۵۰/۰۰۰ مرگ به علت این بیماری در آمریکا گزارش شده است. سرطان پستان به عنوان اولین علت مرگ و میر خانم‌های ۴۰-۴۵ ساله در کانادا محسوب می‌شود. آمار سال ۲۰۰۱ نشان می‌دهد که به طور متوسط از ۴۰۰ زن کانادایی ۱۴ نفر دچار سرطان پستان می‌شوند. در ایران سرطان پستان در زنان یک دهه زودتر نسبت به کشورهای توسعه یافته ایجاد می‌شود. میزان مرگ و میر سرطان پستان در ایران در سال ۱۹۹۸ از هر ۶/۱۰۰/۰۰۰ نفر[۲] و در سال ۲۰۰۱، ۷۷۶۲ مرگ در ۱۸ استان ایران، گزارش شده است.[۳] با توجه به پایین بودن سن ابتلا به بیماری در ایران، تشخیص زود هنگام آن یکی از مهمترین چالش‌ها در جهت سلامت جامعه است. از طرف دیگر تشخیص زود هنگام سرطان پستان باعث درمان به موقع این بیماری خواهد شد. نشان داده شده است که تشخیص سلول‌های منتشر شده در خون محیطی حتی به اندازه یک سلول یا بیشتر می‌تواند برای تشخیص زود هنگام مفید واقع شود. سرطان پستان به تغییرات ژنتیکی وابسته است که این تغییرات می‌تواند مربوط به ژن‌های سوماتیک باشند.[۴] سیتوکراتین-۱۹ از فیلامنت‌های بینابینی سلول‌های اپی‌تلیال است که به عنوان یک بیو مارکر عمومی در سرطان سلول‌های اپی‌تلیالی مطرح شده است.[۵-۶] در انواع کارسینوما، تغییرات در بیان سیتوکراتین‌ها مانند افزایش رونویسی از این ژن ممکن است در زمان پیشرفت تومور اتفاق بیافتد و شناسایی این مارکر ممکن است بتواند به تشخیص به موقع بیماری کمک نماید.[۷-۹]

بیان این مارکر به وفور در سلول‌های سرطان‌ها با منشأ اپی‌تلیال گزارش شده است.[۱۰-۱۱] در این بررسی نیز با استفاده از تست تشخیصی RT-PCR، mRNA مارکر سیتوکراتین -۱۹ در خون بیماران سرطان پستان و در افراد سالم بررسی شد. با توجه به اینکه تعداد سلول‌های سرطانی انتشار یافته در خون وریدی بسیار کم است، به همین علت تکنیک مورد نیاز برای تشخیص علاوه براینکه باید از حساسیت زیادی برخوردار باشد، ویژگی آن نیز اهمیت دارد. در این بررسی، بیان سیتوکراتین با استفاده از تکنیک RT-PCR که می‌تواند هر دو ویژگی را دارا باشد، در بیماران و افراد سالم مورد شناسایی قرار گرفت.[۱۲و۱۳]

مواد و روش‌ها

بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام پس از تشخیص توسط متخصص و قبل از انجام هرگونه درمانی انتخاب شده و افراد سالم پس از معاینه پزشکی بطور داوطلبانه در این بررسی شرکت نمودند. جهت انجام بررسی آماری، تعداد ۳۰ بیمار و ۳۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفت. بیماران و افراد سالم در این بررسی در گروه‌های سنی یکسانی در نظر گرفته شدند.

در این پژوهش نمونه خون از افراد، با تشخیص سرطان پستان و از افراد سالم با حداقل سن ۲۲ سال و حداکثر ۷۷ سال مورد بررسی قرار گرفت. قبل از خون‌گیری، فرم‌های رضایت نامه و پرسشنامه توسط افراد پر شده و موارد فوق از افراد در نظر گرفته شد: سن بیمار، وضعیت تأهل، تعداد فرزندان، سابقه ابتلا بستگان به سرطان، مصرف دارو، نام داروی مصرفی، آدرس پستی و شماره تماس، سپس نمونه‌ها به انستیتو پاستور انتقال داده شد و استخراج RNA از ۳۰۰ میکرولیتر خون کامل با استفاده از کیت Bioneer صورت گرفت، جهت استخراج ۳۰۰ میکرولیتر از خون کامل و ۹۰۰ میکرولیتر بافر ضد انعقاد را وارد یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر نموده سپس کاملاً مخلوط کرده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از این مرحله، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتریفوژ قرار گرفته (دور ۵۰۰۰) و به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر از بافر سوسپانسیون اضافه گردید. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده به محلول اضافه شد و در مرحله آخر کلروفرم اضافه گردید و در سانتریفوژ قرار داده شد (دور ۱۳۰۰۰). در این مرحله RNA به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شود. سپس در مرحله بعدی واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمر Glyceraldehyde 3-(House Keeping Gene) Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) روی RNA استخراج شده انجام می‌شود. این مرحله در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۴ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر DNTP، ۱ میکرولیتر آنزیم، و ۵ میکرولیتر بافر 5x، ۲ میکرولیتر پرایمر و ۲ میکرولیتر از نمونه (۱-۰/۵ µg) انجام شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA حاصله از طریق این روش، واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمر CK19 بر روی نمونه صورت گرفت. واکنش RT-PCR در یک مرحله و با استفاده ازکیت Bioneer انجام شد. سپس جهت انجام تست RT-PCR بر طبق بروشور کیت، مخلوط RNA استخراج شده و پرایمر Reverse را دریک تیوب استریل وارد و در ۷۰ درجه سانتیگراد سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID

قرار گرفته و بر روی یخ، به این مخلوط پرایمر Forward اضافه گشته و به حجم رساندیم. برنامه RT-PCR در یک مرحله و به روش زیر انجام شد: ابتدا ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و پس از آن در دمای۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. محصول RT-PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز می‌گردد.

پرایمرهای طراحی شده جهت بیومارکر CK19 و GAPDH در ذیل آمده است:

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده جهت بیومارکر CK19 و GAPDH

نام پرایمر	سکانس پرایمرهای استفاده شده
CK19f	5'-ATgAAAgCTgCCTTggAAgA-3’
CK19r	5'-TgATTCTgCCgCTCACTATCAg-3'
GAPDHf	5′-ggTCggAgTCAACggATTTg-3′
GAPDHr	5′-ATgAgCCCCAgCCTTCTCCAT-3′

روش‌های آماری

جهت تحلیل آماری از برنامه SPSS استفاده شده و نمودارها در Excel رسم شدند. در این بررسی از آزمون کای اسکور با جداول دو بعدی استفاده شد.

یافته‌ها

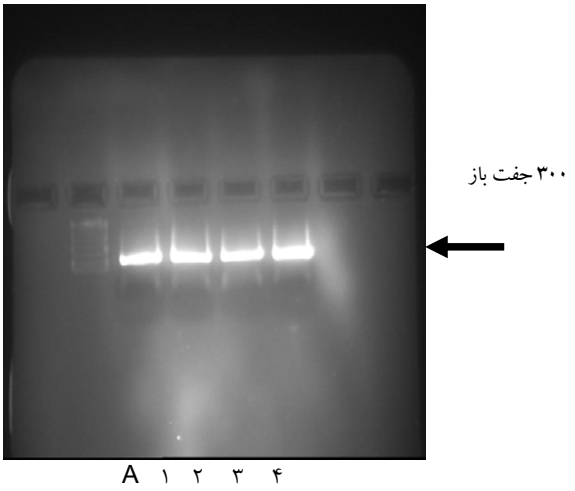
ابتدا جهت اطمینان از صحت RNA الگو استخراج شده در دو گروه بیان ژن GAPDH مورد بررسی قرار گرفت.

۱- تکثیر ژن GAPDH :

محصول واکنش RT-PCR، با استفاده از پرایمرهای GAPDH بر روی RNA الگو استخراج شده، بدست آمد. در نتیجه الکتروفورز باندی با طول ۳۰۰ جفت باز حاصل شد که کمی بالاتر از مارکر ۲۵۰ جفت باز قرار می‌گیرد (تصویر ۱). بررسی این ژن جهت صحت و خلوص RNA استخراج شده انجام شد.

۲- تکثیر ژن Ck19:

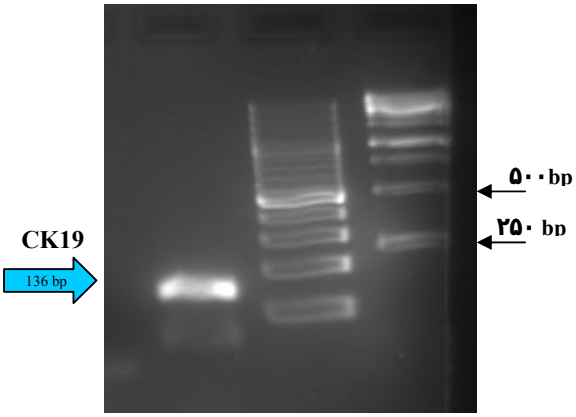
در مورد پرایمر CK19 هم محصول واکنش RT-PCR پس از الکتروفورز یک قطعه ۱۳۶ نوکلئوتیدی بود که کمی بالاتر از مارکر روی ژل آگارز مشاهده گردید (تصویر ۲). در این تست پرایمر CK19 بسیار اختصاصی عمل کرده و می‌توان گفت که هیچگونه باند غیر اختصاصی بر روی ژل آگارز مشاهده نشد (تصویر ۲).



تصویر ۱ - محصول تکثیر ژن GAPDH

A: مارکر ۲۵۰ جفت بازی

۱ و ۲ و ۳ و ۴ محصول تکثیر ژن GAPDH (۳۰۰ جفت باز) مربوط به نمونه‌ها



تصویر ۲- بیان ژن CK19 در نمونه‌های مورد مطالعه

اندازه دقیق ژن CK19 در تصویر ۲ از طریق دو مارکر ۱۰۰ و ۲۵۰ جفت بازی مشخص می‌شود.

A: قطعه CK19 با طول ۱۳۶ جفت باز مربوط به بیمار

B: مارکر ۱۰۰جفت باز

C: مارکر ۲۵۰ جفت باز

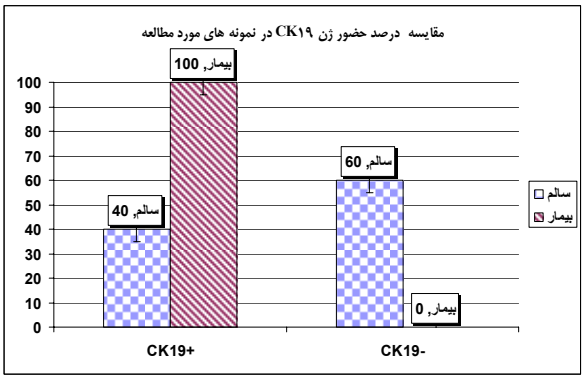
www.SID.ir

Archive of SID

بررسی بیان با استفاده از آزمون کای اسکور از طریق جداول دو بعدی، نشان دهنده ارتباط معنی‌دار ($P<0.001$) بین بیان ژن CK19 در خون بیماران و ابتلا به سرطان پستان می‌باشد (در این تست $P<0.05$، نشان دهنده معنی‌دار بودن است) نمودار ۱.

بیان سیتوکراتین در افراد بیمار ۱۰۰٪، و در ۴۰٪ از افرادی که سالم بودند، مشاهده گردید.

نمودار ۱- مقایسه درصد حضور ژن در نمونه‌های مورد مطالعه



همانطوریکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود از ۴۲ مورد مطالعه شده که سیتوکراتین ۱۹ درآنها بیان شده است، ۳۰ مورد بیمار و ۱۲ مورد بیمار نبودند. در حالیکه از ۳۰ فردی که بیماری را نشان ندادند (افراد سالم)، در۱۲ نفر بیان سیتوکراتین ۱۹ مشاهده شده و ۱۸ نفر از آنها بیان ژن سیتوکراتین ۱۹ را نشان ندادند.

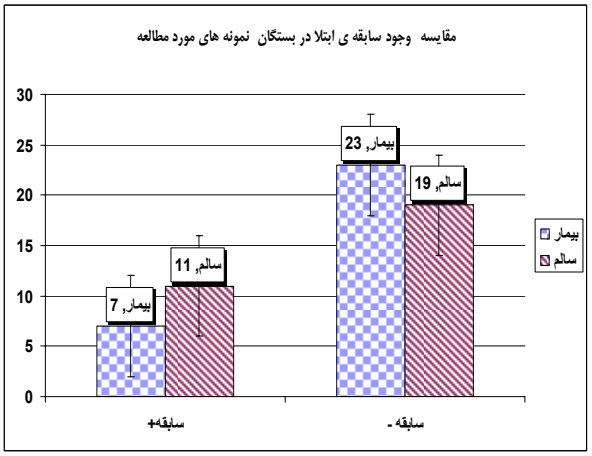
جدول ۲- نمونه‌های مورد بررسی از نظر بیان مارکر CK-19

افراد		+CK19	-CK19	جمع
	بیمار	۳۰	۰	۳۰
	سالم	۳۶	۱۸	۳۰
مجموع		۴۲	۱۸	۶۰

در تحقیق حاضر سابقه بیماری در کل افراد در نظر گرفته شد، در بیماران به نظر می‌رسدکه از بین تعداد ۳۰ نفر بیمار مورد بررسی تنها ۷ نفر (۲۳٪) سابقه ابتلا در بستگان را داشتند، در ۲۳ بیمار (۷۶٪) دیگر این سابقه دیده نشد.

در افراد سالم سابقه ابتلا در ۱۱ نفر (۳۶٪) از بستگان دیده شد و در ۱۹ فرد دیگر (۶۳٪) سابقه ابتلا دیده نشد.

نمودار ۲- ارتباط بیان ژن سیتوکراتین -۱۹ با سابقه فامیلی سرطان



در بررسی آماری و با استفاده از آزمون کای اسکور نشان داده شد که در گروه سالم سابقه فامیلی در ارتباط با بیان ژن سیتوکراتین -۱۹ بوده و با $P<0.005$ تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۲۰۰۳، تحقیقات Smith و همکارانش[۱۲] نشان داد که تشخیص به موقع سرطان پستان باعث جلوگیری از مرگ و میر زود هنگام بیماران خواهد شد. Bieche و همکارانش[۵] در سال ۲۰۰۴ طی تحقیقاتی به این نتیجه رسیدند که: سیتوکراتین از فیلامنت‌های سلول‌های اپیتلیال حاصل شده و درسلول‌های اپیتلیال بیشتر بافت‌ها بیان می‌شود. سلول‌های سرطانی خیلی زودتر از زمان آغاز بیماری در خون وریدی منتشر می‌شوند و نشان داده شده است که سرطان پستان یک بیماری سیستمیک می‌باشد.

در انواع کارسینوما ممکن است تغییرات منحصر به فردی در بیان ژن سیتوکراتین صورت گیرد که این تغییرات در طول گسترش تومور اتفاق می‌افتد. افراد باید قبل از دریافت دارو و هر گونه درمانی اعم از شیمی درمانی و یا رادیوتراپی و یا هورمون درمانی بررسی شده، زیرا موارد فوق می‌تواند منجر به تغییر نتایج گردد. در این بررسی نیز در تمام افراد بیمار سیتوکراتین -۱۹ بیان شد. نتایج به دست آمده نشان دهنده این هستند که این روش می‌تواند جهت تشخیص و یافتن سلول‌های سرطانی در خون مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش سابقه فامیلی نیز در افراد بیمار و سالم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان سیتوکراتین ۱۹ در افراد

www.SID.ir

Archive of SID

بیمار بدون ارتباط معنی‌دار با سابقه فامیلی است، این در حالی است که در افراد سالم یکی از دلایل بیان سیتوکراتین می‌تواند سابقه فامیلی باشد.

سن ابتلا به بیماری نیز در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت و نتایج پژوهش‌های قبلی را تائید نمود.[۱۴] این آمار پایین بودن سن ابتلا رادر کشور ایران نشان می‌دهد. میانگین سنی بیماران بین ۴۰ تا۵۰ سال بوده و نسبت به کل جهان میانگین پائین‌تری را نشان می‌دهد.[۱۴]

نتیجه این پژوهش نشان می‌دهد که بیان سیتوکراتین در افراد بیمار می‌تواند به علت منتشر شدن سلول‌های سرطانی در خون باشد. ارتباط کلینیکال تشخیص مارکر در خون محیطی با بیماران سرطان پستان در مطالعات آینده ارزش داشته[۶] و بدون شک تشخیص مولکولی آن ارزش بالینی خواهد داشت.[۷و۱۵]

در پژوهش حاضر زمانی که تومور رشد یافته بود، از بیمار خون وریدی گرفته شد و مورد بررسی قرار گرفت، در این مرحله بیان اختصاصی و ویژه بیومارکر سیتوکراتین ۱۹ در تمام بیماران دیده شد. طی آنالیز آماری نشان داده شد که بین بیان این مارکر و بیماری رابطه کاملاً معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$).

سیتوکراتین در افراد سالم هم مورد بررسی قرار گرفت تا مقایسه‌ای بین افراد سالم و افراد بیمار صورت گیرد، که بعد از بررسی مشاهده شد که با وجود بیمار نبودن این افراد بیان بیومارکر سیتوکراتین ۱۹ مشاهده می‌شود. علت مشترک بیان سیتوکراتین در افراد سالم می‌تواند داشتن ریسک فاکتور سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان باشد. سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان در بستگان افراد سالم دیده شد، که طی آنالیز آماری صورت گرفته به نظر می‌رسد که ارتباط معنی‌داری بین زمینه ابتلا به بیماری (که در اینجا داشتن سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان می‌باشد) و بیان سیتوکراتین مشاهده می‌شود. این ارتباط در مورد بیماران معنی‌دار نبوده که ممکن است به دلیل تعداد کم نمونه‌گیری باشد. بیومارکر سیتوکراتین ۱۹ در بقیه افراد سالم بیان نشد که به نظر می‌رسد می‌تواند به دلیل نداشتن ریسک فاکتور مرتبط با بیماری سرطان باشد.

از طرف دیگر مطالعات فوق نمایانگر اهمیت بیان بیومارکر Ck19 در شناسایی بیماران می‌باشد که بررسی روی نمونه‌های بیشتر و همچنین بررسی تغییرات آن طی پروسه درمانی می‌تواند اهمیت مارکر فوق را بیشتر آشکار نماید.

www.SID.ir

Archive of SID
نشریه جراحی ایران، دوره ۱۹، شماره ۱، سال ۱۳۹۰

Abstract:

Evaluation of CK-19 Biomarker in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients

Oloomi M. PhD [*], *Bouzari S. PhD* [**], *Rassaeian A. MSc* [***], *Mohagheghi M.A. MD* [****]

(Received: 1 March 2011 Accepted: 1 June 2011)

Introduction & Objective: Breast cancer is one of the main causes of cancer-related mortality, resulting in approximately 40,000 to 50, 000 deaths annually. Breast cancer is the most prevalent cancer in Iran and in the world, but the epidemiological aspects of Iranian breast cancer is uncertain. Early diagnosis of cancer cells in the peripheral blood is a critical determinant for proper treatment. In spite of the heterogeneity of breast cancer at the molecular level, circulating tumor cells (CTCs) may provide a novel marker. On the other hand, approximately 20-40% of breast cancer patients have shown detectable Cytokeratin 19 (CK19).

Materials & Methods: In the present study, the RNA of blood cells of 60 samples (30 patients and 30 normal) was extracted. The RT-PCR technique was applied to the extracted RNA, using specific primers. CK19 expression was evaluated by statistical chi-square test.

Results: Cytokeratin-19 was found to be present in the blood of all the patients. However, normal samples were divided in two groups: a) with cytokeratin expression b) without cytokeratin expression. Cytokeratin expression was related with history of cancer in their family.

Conclusions: Investigation on the presence of Cytokeratin-19 biomarker in the early stages of disease could be a suitable prognostic factor in blood of the patients. Study on a larger number of patients with more biomarkers with the predictive and/or prognostic value should be considered in the future studies.

Key Words: Breast Cancer, Biomarker

[*] *Assistant Professor of Molecular Biology Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

[**] *Professor of Molecular Biology Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

[***] *Master of Science of Biology, Azad University, Tehran, Iran*

[****] *Associate Professor, Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahen AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev. 2004; 5(1): 24-7.
2. Mohagheghi MA, Mosavi-Jarrahi A, Malekzadeh R, Parkin M. Cancer incidence in Tehran metropolis: the first report from the Tehran Population-based Cancer Registry, 1998-2001. Arch Iran Med. 2009; 12(1):15-23.
3. Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Mousavi SM, Montazeri A, Breast J. 2007; 13(4): 383-91.
4. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Molecular cell biology, 4th edition. 2005.
5. Bièche I, Tozlu S, Girault I, Lidereau R. Identification of a three-gene expression signature of poor-prognosis breast carcinoma. Mol Cancer 2004; 3: 37.
6. Cruz I, Ciudad J, Cruz JJ, Ramos M, Gómez-Alonso A, Adansa JC, Rodríguez C, Orfao A. Evaluation of multiparameter flow cytometry for the detection of breast cancer tumor cells in blood samples. Am J Clin Pathol 2005; 123: 66-74.
7. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L. The case for early detection. Nat Rev Cancer 2003; 3: 243-52.
8. Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, Brewczyńska E, Pieńkowski T, Siedlecki JA. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. Acta Biochim Pol 2004; 51: 747-55.
9. Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens MR, van den Bogaert W, van Oosterom AT, Vandekerckhove F. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. Ann Oncol 2001; 12: 39-46.
10. Alvero AB, Burtness BA, Ercan AG, Sapi E. Improved method for the detection of cytokeratin 19-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients. Lab Invest 2004; 84: 658-61.
11. Bilchik A, Miyashiro M, Kelley M, Kuo C, Fujiwara Y, Nakamori S, Monden M, Hoon DS. Molecular detection of metastatic pancreatic carcinoma cells using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. Cancer 2000; 88: 1037-44.
12. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, American Cancer Society. CA Cancer J Clin 2003; 53: 27-43.
13. Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, Burke W, Costanza ME, Evans WP, Foster RS Jr, Hendrick E, Eyre HJ, Sener S. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update. American Cancer Society High-Risk Work Group; American Cancer Society Screening Older Women Work Group; American Cancer Society Mammography Work Group; American Cancer Society Physical Examination Work Group; American Cancer Society New Technologies Work Group; American Cancer Society Breast Cancer Advisory Group. CA Cancer J Clin 2003; 53: 141-69.
14. Doroudchi M, Talei A, Modjtahedi H, Dehaghani AS, Pezeshki AM, Thomas H, Ghaderi A. Serum level of Her-2 extracellular domain in Iranian patients with breast cancer: A follow-up study. Iran J Immunol 2005; 2: 191-200.
15. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulias V, Mavroudis D. 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: 2593-600.

www.SID.ir