

Druga część pracy poglądowej na temat postępów w diagnostyce i leczeniu raka piersi, integralnie związanych z wynikami badań naukowych w dziedzinie biologii molekularnej i biologii komórki, dotyczy aktualnego stanu wiedzy, dominujących tendencji i problemów związanych z identyfikacją biomarkerów w odniesieniu do nowotworów piersi. Główny nacisk został położony na markery białkowe, takie jak cykliny i proteazy inwazyjności, repleracje DNA związane z zaburzeniami metylacji, markery adhezji komórkowej – E-kadheryna/katenina, CD44 oraz integryny. Praca omawia także inne biomarkery, takie jak CHEK2 kodujący kinazę fazy G2, która odgrywa kluczową rolę w repleracji uszkodzonego DNA, polimorficzne mucyny nabłonkowe MUC1 i MUC2 oraz markery oporności lekowej. Odnosi się do problemów techniczno-metodycznych, jakie napotyka się przy tworzeniu niezawodnych znaczników biologicznych, takich jak niskie stężenia białek nowotworowych, nieznaczne różnice ich struktury w porównaniu z białkami występującymi u ludzi zdrowych oraz brak specyficzności markerów dla tkanki lub narządu, niezbędny do identyfikacji pierwotnego miejsca wyjścia nowotworu.

Słowa kluczowe: rak piersi, biomarkery, markery białkowe, markery DNA, adhezyny.

Biomarkery w raku piersi

Część II: markery białkowe, DNA, adhezji komórkowej i oporności lekowej

Biomarkers in breast cancer

Part II: protein, DNA, cell adhesion and drug resistance markers

Tadeusz Ślubowski, Małgorzata Ślubowska

Amberheart Breast Cancer Foundation

Wstęp

Celem niniejszego opracowania jest przekazanie klinicyście uaktualnionej informacji na temat rozwoju wiedzy w dziedzinie biomarkerów raka piersi, jak również ich klinicznego wykorzystania jako wykładników prognostycznych i predykcyjnych. Markery te, bardziej lub mniej użyteczne klinicznie, klasyfikowane są jako wyróżniki anomalii komórek nowotworowych i odnoszą się do wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacji białkowej, braku reakcji na substancje hamujące wzrost, apoptozy, nieograniczonej replikacji komórek, niekontrolowanej angiogenezy, naciekania tkanek i przerzutów.

Mimo identyfikacji wielu domniemyanych markerów, tylko kilka z nich jest użytecznych w prognozowaniu wystąpienia choroby, jej nawrotu czy identyfikacji źle rokujących pacjentów, którzy nie reagują na leczenie. Jakkolwiek w chwili obecnej nie istnieje pojedynczy biomarker różnicujący dobrze i źle rokujących pacjentów lub tych, którzy w sposób oczekiwany odpowiedzą na leczenie, badanie ekspresji genów ze stworzeniem wzorców wieloelementowych anomalii molekularnych może stanowić narzędzie pomocne w klinicznej ocenie prognozowania i doboru leczenia.

Markery białkowe

Cykliny

Szereg białek wewnątrzkomórkowych o charakterze biomarkerów łączonych jest z rokowaniem co do postępu choroby. Stwierdzono, że cykliny typu D i E – białka, które w normalnych warunkach kontrolują przechodzenie od fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego pełnią kluczową rolę w komórkach nabłonkowych nowotworów gruczołu sutkowego, indukowanych hormonami sterydowymi i czynnikami wzrostu [1].

U ludzi cyklina D1 jest uważana za czynnik patogenetyczny zarówno w raku piersi, jak i w innych nowotworach. Jakkolwiek dokładny mechanizm, przez który jej nadekspresja może prowadzić do nowotworzenia nie jest dokładnie znany, istnieją podejrzenia, że poza funkcją regulatora cyklu komórkowego pełni ona rolę modyfikatora szlaków metabolicznych, różnicowania komórek tłuszczowych i migracji komórek [2]. Amplifikacja lub nadekspresja cykliny D1 istnieje w 20% potwierdzonych klinicznie raków piersi [2]. Koreluje ona z ekspresją receptora estrogenowego [4] oraz przechodzeniem raka *in situ* w inwazyjnego raka wewnątrzprzewodowego [5]. Stwierdzono, że obecność niskocząsteczkowych typów cykliny E, wykazuje korelację z obniżoną przeżywalnością, a jej podwyższony poziom, wysoki stopień korelacji ze złym rokowaniem [6].

Aberracja ekspresji białka Thep21 (p21/WAF1/Cip1), które jest inhibitorem cyklinozależnej kinazy (CDK) biorącej udział w procesie wzrostu komórek [7], łączona jest ze złym rokowaniem, chociaż podejście to jest kwestionowane

The second part of the two-part review on breast cancer biomarkers, will consider information on new developments in diagnosis and treatment of breast cancer, which are inherently related to the results of scientific achievements in molecular and cell biology. This overview describes current knowledge, dominant trends and problems related to biomarkers in breast cancer. It stresses the importance of protein markers: cyclins, proteins of invasiveness i.e. aspartate, serine, cysteine and metalloproteinase, DNA repairing processes related to methylation; as well as adhesive proteins: E-cadherine/catenine complex, CD44, and integrines. Other biomarkers such as CHEK2, encoding phase G2 kinase – playing role in DNA repairing – and polymorphic epithelial mucines MUC1 and MUC2, as well as drug resistance markers are also described. The overview deals with problems related to the development of verifiable biological markers due to technical and methodological obstacles and, amongst other low concentrations of cancer proteins, negligible structural differences between cancerous and healthy subject proteins, and lack of tissue and organ marker specificity, required for primary cancer site identification.

Key words: breast cancer, biomarkers, protein markers, DNA markers, adhesion markers.

[8]. Białko p27 (KIP1) wiążące i inaktywujące CDK, łączone jest z regulacją cyklu komórkowego [9], a w przypadku niskiej ekspresji, szczególnie u pacjentów z niewielkimi guzami pierwotnymi, koreluje ze złym rokowaniem [10]. Białko SKP2, będące kinazą związaną z fazą S, niezbędne jest do ubikwitynozelnej degradacji białek [10], w tym także białka p27 inhibitora CDK [11]. Wykazuje ono ekspresję odwrotnie proporcjonalną do aktywności p27.

Proteazy inwazyjności

Proteazy (proteinyzy) to enzymy hydrolizujące wiązania peptydowe, znane również pod nazwą peptydazy. W zależności od ich funkcji możemy podzielić je na:

- endopeptydazy – działające na wiązania wewnątrz łańcucha peptydowego,
- egzopeptydazy – odcinające aminokwasy z jego końców.

Wśród proteaz możemy wyróżnić cztery grupy:

- aspartylowe,
- serynowe,
- cysteinowe,
- metaloproteazy.

Proteazy aspartylowe

Katepsyna D jest zależną od estrogenów proteazą aspartylową, związaną z lizosomami, kodowaną przez gen zlokalizowany na chromosomie 11. Uważa się, że jest ona odpowiedzialna za migracje komórek i stymulowanie naciekania podścieliska przez trawienie błony podstawnej i zrębu tkanki łącznej [12]. Liczne badania prowadzone przy pomocy metod immunologicznych w latach 90. ubiegłego wieku wykazały, że obserwowany w cytosolu izolowanym z raków piersi podwyższony poziom katepsyny D był niezależnym czynnikiem prognozującym okres przeżycia [13]. Brak powodzenia w stworzeniu wiarygodnej metody immunocytochemicznej opartej o te badania spowodował, że poziom zainteresowania katepsyną D jako potencjalnym markerem oceniającym leczenie zdecydowanie się zmniejszył [14].

Proteazy seryny

W destrukcji lub przebudowie macierzy pozakomórkowej (ECM) bierze udział duża grupa enzymów proteolitycznych odpowiedzialnych za proces naciekania nowotworu lub jego rozsiew w postaci przerzutów. Dwie grupy enzymów, mające znaczenie w tym procesie to proteazy seryny i metaloproteazy macierzy pozakomórkowej (MMPs). W raku piersi, spośród proteaz serynowych, największą uwagę zwraca się na urokinazopodobny aktywator plazminogenu (uPA) i jego receptor (uPAR), a także na czynnik hamujący aktywację plazminogenu 1 (PAI-1). Działając na plazminogen, uPA doprowadza do wytworzenia plazminy. Jest on odpowiedzialny za degradację macierzy pozakomórkowej, hamowany jest zaś przez specyficzny inhibitor PAI-1. Istnieją doniesienia, że uPA i jego inhibitor u pacjentek z nowotworami piersi mają – istniejącą niezależnie od innych wskaźników – wartość prognostyczną co do okresu przeżycia [15].

Podwyższone poziomy uPA i PAI-1 oceniane w ekstraktach z tkanki nowotworowej i w cytosolu wykazywały korelację z nawrotem choroby i krótkim okresem przeżycia [16]. Proteazy plazminogenu były także stosowane jako marker predykcyjny odpowiedzi na chemioterapię [17]. Niestety, jak dotychczas nie powiodło się zastosowanie metod oceny immunologicznej PA/PAI-1 do interpretacji materiału na skrawkach. Stanowi to znaczne utrudnienie ze względu na niewielkie szanse uzyskiwania nieutralowanego materiału do analizy białek. Markery uPA i uPAR były oceniane również w płynie aspiracyjnym z brodawki. Ocena ta korelowała z wynikami uzyskanymi z materiału tkankowego co do postępu choroby i rokowania [18]. Jakkolwiek uważane za wskaźnik o wysokiej znamienności prognostycznej i predykcyjnej, opisane proteazy plazminogenu nie należą do powszechnie stosowanych markerów.

Metaloproteazy

Metaloproteazy (metaloproteinazy) macierzy (MMPs) stanowią grupę co najmniej 19 endopeptydaz, zawierających cynk, które wydzielane są jako proenzymy i wykazują znaczące podobieństwo budowy. Ich podstawową rolą jest rozkład białek macierzy pozakomórkowej. W oparciu o powinowactwo do substratu oraz organizacji przestrzennej można podzielić je na cztery główne grupy:

- kolagenazy,
- gelatynazy,
- stromelizyny,
- metaloproteazy, które są zaangażowane w inicjację procesu nowotworzenia, inwazyjność i tworzenie przerzutów [19].

Metaloproteazy macierzy (MMP) mogą być hamowane przez związki chelatujące i specyficzne inhibitory tkankowe metaloproteaz (TIMPs) [19]. W raku piersi podwyższony poziom metaloproteazy 2, 9 i 11 koreluje ze złym rokowaniem [19, 20].

Metaloproteaza MMP-2 (kolagenaza typu IV) odpowiedzialna jest za destrukcję błon podstawnych i penetrację naczyń krwionośnych [19, 20]. Wytwarzanie przez fibroblasty zrębu tkankowego, kolagenazy typu IV, w odpowiedzi na naciekanie przez komórki raka piersi, może być wyznacznikiem agresywności procesu nowotworowego [21]. W oparciu o badania immunocytochemiczne stwierdzono, że nadmierna aktywność MMP-2 wiąże się ze złym rokowaniem [22].

Wyniki badań nad metaloproteazą MMP-9 u pacjentów z rakiem piersi są niejednoznaczne. Niektórzy autorzy wiążą nadmierną ekspresję tego enzymu z niekorzystnym rokowaniem [23], podczas gdy inni twierdzą, że jest ona zjawiskiem pozytywnym [24]. Zdolność komórek nowotworowych do aktywacji enzymów odpowiedzialnych za destrukcję macierzy pozakomórkowej (ECM) uważana jest za dominujący atrybut inwazyjności nowotworów. Nadmierna aktywność metaloproteazy MMP-11 (stromelizyna 3) w raku piersi jest wiązana ze złym rokowaniem [25].

Nieustające zainteresowanie metaloproteazami i tkankowymi inhibitorami metaloproteaz wiąże się z potencjalną możliwością zastosowania w raku piersi leczenia opartego o zastosowanie blokerów metaloproteaz [26].

Markery DNA

Telomeraza

U eukariotów chromosomy zakończone są strukturą zwaną telomerem. U ludzi składa się on z powtarzającej się sekwencji nukleotydowej (TTAGGG) i szeregu związanych z nią białek. Aby zapobiec, związanemu z wiekiem i/lub wielokrotnymi podziałami, skracaniu telomerów, enzym telomeraza powoduje ich wydłużanie, co prowadzi do utrzymania integralności genomu. Enzym ten zbudowany jest z odwrotnej transkryptazy telomerazy (TERT), RNA telomerazy (TERC), oraz elementów regulujących katalityczną aktywność. Odwrotna transkryptaza telomerazy (TERT), która jest obecna prawie we wszystkich nowotworach, stanowi katalizującą domenę telomerazy. Uważa się, że w raku piersi TERT może stanowić marker diagnostyczny i prognostyczny, a także element predykcyjny odpowiedzi na leczenie [27]. Z tego powodu, że telomeraza nie występuje w normalnej tkance gruczołowej, a jest obecna w dominującej grupie raków piersi

[28], spełnia jedną z podstawowych cech biomarkera. Jakkolwiek wczesne badania nad telomerazą poddawały w wątpliwość jej znaczenie prognostyczne [29], to późniejsze prace wydają się potwierdzać jej znaczenie jako markera predykcyjnego [30].

Reperacja DNA i niestabilność mikrosatelitów

Niestabilność mikrosatelitów (MSI) związana jest z procesem mutacyjnym, w którym następuje wbudowywanie lub eliminacja powtórzeń sekwencji nukleotydowych mikrosatelitów. Jest ona uważana za czuły wskaźnik niestabilności genomu, odpowiedzialny za zwiększenie ryzyka rozwoju nowotworu [31]. W porównaniu z innymi nowotworami, np. rakiem jelita grubego, w raku piersi MSI występuje rzadko [32]. Część doniesień łączy ją jednak ze złym rokowaniem [33].

Metylacja DNA

Jedną z najbardziej powszechnych anomalii molekularnych w ludzkich nowotworach są zaburzenia w metylacji DNA, przejawiające się hypermetylacją lub demetylacją występującą w odpowiednich fragmentach genomu. Jakkolwiek w raku piersi istnieje szereg anomalii genowych wiodących do hypermetylacji, trudno jest jednak określić, w jakim stopniu korelują one z różnymi odmianami genotypowymi nowotworów [34].

Demetylacja DNA, pomimo że nie wykazuje charakterystycznych różnic adekwatnych do typu nowotworu, korelacji ze zmianami w chromosomach, stanem receptorów estrogenowych i typem histopatologicznym wydaje się być cechą bardziej jednolitą [35], chociaż jej wartość prognostyczna jest także dyskutowana [36].

Inne biomarkery

Gen *CHEK2* koduje kinazę fazy G2, która odgrywa kluczową rolę w reperacji uszkodzonego DNA. Niektóre mutacje tego genu współistnieją ze zwiększonym ryzykiem raka piersi, jednak ich kliniczne znaczenie jest ciągle niejasne [37]. Mutacje te zostały pierwotnie zidentyfikowane u kobiety z nowotworem piersi współistniejącym z rodzinnym występowaniem zespołu Li-Fraumeni [38]. Niska występowalność oraz nieokreślony poziom ryzyka, jakie niesie za sobą występowanie mutacji *CHEK2*, implikuje niewielkie znaczenie tej anomalii w rodzinie występującym raku piersi [39].

Potencjalną szansę na wykorzystanie jako biomarkery mają także polimorficzne mucyny nabłonkowe MUC1 i MUC2 oceniane zarówno w materiale tkankowym, jak i w osoczu [40]. Podobnie, nadmierna ekspresja enzymu cyklooksyzogenazy 2 (COX2), odpowiadającego za przemianę fosfolipidowe w błonach komórkowych oraz tworzenie prostacyklin i tromboksanów, przedstawiana jest w niektórych publikacjach jako mająca znaczenie prognostyczne [41]. Odnosi się to także do raka przewodowego *in situ* (DCIS – *ductal carcinoma in situ*) ze względu na jej silnie zaznaczoną ekspresję, rolę w rozwoju nowotworu i relację do innych wyróżników nowotworzenia [42].

Białko macierzy jądra (*nuclear matrix protein-nmp-66*) obecne w osoczu, zostało ostatnio zidentyfikowane jako marker, który może być użyty do identyfikacji wczesnego

raka piersi. Jego wartość prognostyczna musi jednak zostać potwierdzona w szeroko zakrojonych badaniach [43].

Podjęmowane są również próby zastosowania jako markerów innych antygenów rozpoznawanych przez układ HLA. Należą do nich antygen specyficzny dla raka jądra, antygen E czerniaka (*MAGE – melanoma antigen gene*) i antygeny kodowane przez geny *GAGE* [44]. W odniesieniu do raka piersi podejmowane były próby oceny genów *MAGE* w odniesieniu do rokowania [45] oraz jako markera wczesnych stadiów choroby i wznowy [46].

Ocena transkrypcji

W ludzkim genomie >95% genów nie wykazuje aktywności. Represja tych genów kontrolowana jest na poziomie transkrypcji, tzn. procesu syntezy RNA odbywającego się na matrycy DNA, a katalizowanego przez enzym polimerazę RNA lub na poziomie translacji, tzn. procesu syntezy łańcucha polipeptydowego na matrycy informacyjnej m-RNA. W chorobach nowotworowych, profile ekspresji genów mogą mieć odniesienie do funkcji komórki, typu procesów biochemicznych, aktywności proliferacyjnej i mechanizmów regulacyjnych. Z reguły profile te porównuje się do kontroli uzyskanej od ludzi zdrowych i mogą one służyć do oceny rozwoju choroby, rokowania lub identyfikacji szlaków do leczenia celowanego [47]. Profilowanie genomu, w odniesieniu do transkrypcji, jest używane do oceny rokowania w raku piersi [48–51]. Do opisanego zestawu transkrybowanych genów ocenianych w kontekście mRNA wprowadzono pojęcie transkryptomu, które odnosi się do białek mogących określać specyficzny typ nowotworu lub opisywać go u poszczególnych pacjentów [47, 52–54]. Ocena pierwotnych nowotworów piersi, wykonana przy pomocy mikromacierzy DNA, w celu określenia złego rokowania zależnego od sygnatury genowej, nieprawidłowej ekspresji genów regulujących cykl komórkowy, inwazyjności procesu, tendencji do tworzenia przerzutów i angiogenezy wykazała, że ocena profilu genowego miała daleko bardziej istotną wartość rokowniczą niż parametry kliniczne, takie jak zaangażowanie węzłów chłonnych, czy przewidywanie przerzutów odległych [55].

Markery adhezji komórkowej

Glikoproteiny transbłonowe, odpowiedzialne za wzajemne przyleganie komórek, jak również za przyleganie do macierzy pozakomórkowej zwane są adhezynami. Odgrywają one ważną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak migracja komórek, różnicowanie, proliferacja i apoptoza. W ciągu ostatnich lat nasiliło się zainteresowanie tymi związkami, ze względu na ich potencjalne zastosowanie jako biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych w nowotworach, ponieważ stwierdzono, że utrata ich ekspresji może świadczyć o wysokim stopniu złośliwości lub zaawansowanym stadium nowotworu. Z kompleksami tymi wiąże się również nadzieję, co do ich potencjalnej roli jako biomarkerów świadczących o inicjacji procesu nowotworowego, różnicowaniu, postępie choroby i powstawaniu przerzutów [56, 57].

Kompleks E-kadheryna/katenina

Wzrost poziomu kateniny uważany jest za główny przejaw ekspresji genu działającego przez szlak sygnału Wnt [58, 59]. Kompleks E-kadheryna/katenina wiązany jest z rozwojem zmian złośliwych, w tym także raka piersi [60]. Jakkolwiek większość autorów podkreśla, że w raku piersi utrata aktywności E-kadheryny wiąże się ze złym rokowaniem [61, 62], istnieją doniesienia mówiące o zachowaniu jej aktywności pomimo rozwoju choroby [63]. Utrata aktywności E-kadheryny przypisywana jest utracie aktywności genu na skutek hypermetylacji wysp CpG w rejonie promotora i brak wytwarzania mRNA [64]. Utrata aktywności E-kadheryny w raku piersi jest bardziej charakterystyczna dla naciekającego raka pęcherzykowego niż naciekającego raka wewnątrzprzewodowego [65]. Wzrost ekspresji E-kadheryny opisany został w raku zapalnym piersi [66]. Niezależnie od obserwowanych zmian E-kadheryna nie jest markerem, który miałby charakter predykcyjny co do reakcji na wdrożone leczenie.

CD44

Glikoproteina CD44 jest polimorficzną adhezyną błonową, związaną z macierzą komórkową, aktywacją limfocytów, recyrkulacją i zasiedlaniem. Przypisuje się jej rolę w rozwoju agresywnych form nowotworów oraz powstawaniu przerzutów zarówno w guzach litych, jak i nowotworach typu hemopoetycznego [56, 57]. W raku piersi aktywność CD44 jest wiązana z inicjacją i postępowaniem procesu nowotworowego [67]. Zaburzeniom funkcji CD44 przypisuje się rolę prognostyczną co do rozwoju nowotworu [68–70], a nadmiernej ekspresji, jednego z jej wariantów – V6, znaczenie co do niekorzystnego rokowania [70, 71], chociaż zdania na ten temat są podzielone [72]. Badania CD44 w osoczu zarówno w formie podstawowej [73], jak i w odmianie V6 [74] nie przyniosły przekonujących wyników co do możliwości zastosowania tego markera w postępowaniu klinicznym.

Integryny

Integryny są glikoproteinami zaliczanymi do białek odpowiedzialnych za przyleganie komórek (adhezyny). Współdziałając z innymi receptorami błonowymi umożliwiają agregację komórek. W raku piersi zaburzenia ekspresji integryn AV [75] i A6 [76, 77] są łączone z rokowaniem co do przebiegu choroby. Uważa się, że receptory dla integryn oraz dla laminin (glikoprotein błon podstawnych) odpowiedzialnych za adhezję i migrację komórek, procesy wzrostu, różnicowania oraz tworzenie przerzutów, mogą pełnić w raku piersi rolę markerów [78]. Istnieją jednak podzielone zdania na temat receptora lamininy, którą niektórzy autorzy uważają za samodzielny czynnik rokowniczy [75, 79], podczas gdy inni negują jego możliwości w tym zakresie [80].

Inne markery adhezyjne

W raku piersi białkiem adhezyjnym budzącym największe zainteresowanie jest adhezyna komórek nabłonkowych (EpCAM), którą łączy się z oceną okresu przeżycia [81]. Ma zastosowanie jako identyfikator mikroprzerzutów ocenianych we krwi obwodowej i szpiku [82], a także jako potencjalny cel dla leczenia [83].

Markery oporności lekowej

Gen oporności wielolekowej (*MDR1*) koduje białko błonowe – glikoproteinę P (Pgp), która odpowiedzialna jest za funkcjonowanie energozależnej pompy regulującej. Jej rolą jest usuwanie z komórki niektórych leków, w tym także chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu raka piersi. Białko to może być identyfikowane przy pomocy rozmaitych technik, m.in. łańcuchowej reakcji polimerazy (*PCR*), *Southern Blotting*, hybrydyzacji *in situ* i immunocytochemii [84]. Przeprowadzona metaanaliza wykazała, że ekspresja *MDR1* koreluje w znaczący sposób z opornością na chemioterapię i złym rokowaniem [85]. Należy wspomnieć, że nie wszystkie leki antynowotworowe stanowią substraty dla Pgp. Zależne od działania Pgp są antracykliny, pochodne topoizomerazy II, alkaloidy *vinca rosea* i taksany. Gen odpowiedzialny za kodowanie transferazy glutationowej S (*GSTp*) (chromosom 11q13) koreluje z aktywnością Pgp, wzmacniając detoksyfikację wewnątrzkomórkową kojarzoną w raku piersi z opornością wielolekową [86]. Z powodu powiązania aktywności *GSTp* z opornością na środki alkilujące, postulowano, aby używać tego markera do wyboru najbardziej adekwatnego protokołu chemioterapii.

Z obecnością Pgp łączy się także niewielkie indukowane przez estrogeny białko, zwane pS2, które uznawane jest przez niektórych jako marker receptora estrogenowego [87]. Potencjał wykorzystania pS2 jako markera wiązałby się z oceną postępu choroby i odpowiedzią na leczenie hormonalne.

Białka szoku termicznego i białka reakcji na stres HSP27, HSP70 i HSP90 są grupą związków związanych z odpowiedzią tkankową na wysoką temperaturę, toksyny, toksyny, metale ciężkie, zmiany pH, niektóre hormony, leki i niedotlenienie [88]. W raku piersi aktywność HSP27 i HSP70 uważana jest za czynnik predykcyjny co do nawrotu choroby i przewidywania wyleczenia [88–91].

Farmakogenetyka

Ponad milion markerów genetycznych, zwanych polimorfantami pojedynczych nukleotydów (SNP), dostępnych jest do badań genotypowych i fenotypowych [92]. Wykorzystanie SNP do sekwencjonowania genów doprowadziło do odkrycia jednego lub wieloczynnikowych zespołów predyspozycji rodzinnych [93]. Odkrycie alternatywnych szlaków metabolizmu leków, a także genetycznie zależnych enzymów alternatywnych doprowadziło do lepszego poznania niektórych z nich, np. systemu cytochromów [94]. Farmakogenetyka znalazła zastosowanie w zmniejszeniu toksyczności niektórych leków antynowotworowych, takich jak amonafid, 5-fluorouracyl (5-FU), 6-merkaptopuryna, irinotekan, epirubicyna i flawopirydol [95]. Stosowanie genotypowania w celu oceny terapii antynowotworowej pojawiło się ostatnio w bardzo wielu doniesieniach [96]. Niektóre publikacje odnoszące się do raka piersi sugerowały, że nadmierna aktywność syntetazy tymidylowej związana jest z opornością na 5-fluorouracyl i jego pochodne [97].

Quo vadis

Podstawowymi problemami, na jakie napotyka diagnozowanie i prowadzenie pacjentów z rakiem piersi, jest identyfikacja pacjentów z minimalnym ryzykiem nawrotu

choroby, u których nie jest konieczne stosowanie adjuwantowej terapii hormonalnej oraz stworzenie zasad postępowania leczniczego dla pacjentek, które narażone są na wysokie ryzyko nawrotu choroby.

Wraz z postępem prac nad mapowaniem genomu i ekspresją białek związanych z poszczególnymi genami, otwierają się nowe możliwości stosowania farmakogenetyki do przewidywania wrażliwości lub oporności na leczenie jedno- lub wielolekowe. Wraz z rozwojem technik mikromacierzy, które stwarzają potencjalne możliwości jednoczesnej oceny wszystkich genów lub białek zawartych w pobranym preparacie biologicznym, bardziej realna staje się szansa na śledzenie postępu leczenia. Techniki hierarchicznego grupowania zbiorów oraz analiza baz danych uzyskanych z profili transkrypcji od pacjentów, którzy reagują pozytywnie na leczenie lub wykazują oporność lekową na leki antynowotworowe, została wprowadzona jako wzorzec dla leczenia raka piersi i innych nowotworów [98, 99]. Zastosowanie profilowania transkrypcji potwierdziło korzystny efekt przedoperacyjnego leczenia przy pomocy paklitakselu, 5-FU, doksorubicyny i cyklofosfamidu u 81% pacjentek z rakiem piersi [97–100]. Wyniki innych badań z użyciem komercyjnie dostępnych oligonukleotydów użytych w mikromacierzach mRNA z materiału uzyskanego z biopsji gruboigłowej od pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi, potwierdziły, że wzorce ekspresji genów korelują ze stosowaniem docetakselu [101].

Piśmiennictwo

- Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 95-104.
- Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4215-24.
- Wolman SR, Pauley RJ, Mohamed AN, Dawson PJ, Visscher DW, Sarkar FH. Genetic markers as prognostic indicators in breast cancer. *Cancer* 1992; 70: 1765-74.
- Steeg PS, Zhou Q. Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* 1998; 52: 17-28.
- Weinstat-Saslow D, Merino MJ, Manrow RE, et al. Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nature Med* 1995; 1: 1257-60.
- Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, et al. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1566-75.
- Pellikainen MJ, Pekola TT, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. *J Clin Pathol* 2003; 56: 214-20.
- Gohring UJ, Bersch A, Becker M, Neuhaus W, Schondorf T. p21 (waf) correlates with DNA replication but not with prognosis in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54: 866-70.
- Lau R, Grimson R, Sansome C, Tornos C, Mou UM. Low levels of cell cycle inhibitor p27kip1 combined with high levels of Ki-67 predict shortened disease-free survival in T1 and T2 invasive breast carcinomas. *Int J Oncol* 2001; 18: 17-23.
- Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 67-80.
- Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest* 2002; 110: 633-41.
- Schwartzberg LS. Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 40: 17-24.

13. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirguin JH, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 297-302.
14. Kute TE, Shao ZM, Sugg NK, Long RT, Russeu GB, Case LD. Cathepsin D as a prognostic indicator for node-negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assays. *Cancer Res* 1992; 52: 5198-203.
15. Ławicki S, Mroczko S, Szmítowski M. Markery nowotworowe raka piersi. *Postępy Hig Med Dośw* 2004; 58: 292-300.
16. Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 2002; 48: 1194-7.
17. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1000-7.
18. Qin W, Zhu W, Wagner-Mann C. Nipple aspirate fluid expression of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator receptor predicts breast cancer diagnosis and advanced disease. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 948-53.
19. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 161-74.
20. Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 50: 97-116.
21. Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, Kubista E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 72: 69-77.
22. Talvensaaari -Mattila A, Pääkkö P, Höyhty M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 1153-62.
23. Pacheco MM, Nishimoto IN, Mourão Neto M, Mantovani EB, Brentani MM. Prognostic significance of the combined expression of matrix metalloproteinase-9, urokinase type plasminogen activator and its receptor in breast cancer as measured by northern blot analysis. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 62-8.
24. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, Talieri M. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001; 84: 1488-96.
25. Chenard MP, O'Siorain L, Shering S, et al. High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 69: 448-51.
26. Rasmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* 1997; 75: 69-75.
27. Hines WC, Fajardo AM, Joste NE, Bisoffi M, Griffith JK. Quantitative and spatial measurements of telomerase reverse transcriptase expression within normal and malignant human breast tissues. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 503-9.
28. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 146-9.
29. Carey LA, Kim NW, Goodman S, et al. Telomerase activity and prognosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3075-81.
30. Poremba C, Heine B, Diallo R, et al. Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *J Pathol* 2002; 198: 181-9.
31. Andrew SE, Peters AC. DNA instability and human disease. *Am J Pharmacogenomics* 2001; 1: 21-8.
32. Ozer E, Yuksel E, Kizildag S, Sercan O, Ozen E, Canda T, Sakizli M. Microsatellite instability in early-onset breast cancer. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 525-30.
33. Tomita S, Deguchi S, Miyaguni T, Muto Y, Tamamoto T, Toda T. Analyses of microsatellite instability and the transforming growth factor- β receptor Type II gene mutation in sporadic breast cancer and their correlation with clinicopathological features. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53: 33-9.
34. Bae YK, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler MJ, Sukumar S, Herman JG, Gabrielson E. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5998-6005.
35. Jackson K, Yu MC, Arakawa K, et al. DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 1225-31.
36. Bernardino J, Roux C, Almeida A, et al. DNA hypomethylation in breast cancer: an independent parameter of tumor progression? *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 97: 83-9.
37. Bogdanova N, Enssen-Dubrowskaja N, Feshchenko S, et al. Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer. *Int J Cancer* 2005; 116: 263-6.
38. Bell DW, Varley JM, Szydló TE, et al. Heterozygous germ line hCHEK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286: 2528-31.
39. Dufault MR, Betz B, Wappenschmidt B, et al. Limited relevance of the CHEK2 gene in hereditary breast cancer. *Int J Cancer* 2004; 110: 320-5.
40. Xu Y, Kimura N, Yoshida R, Lin H, Yoshinaga K. Immunohistochemical study of Muc1, Muc2 and human gastric mucin in breast carcinoma: relationship with prognostic factors. *Oncol Rep* 2001; 8: 1177-82.
41. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 632-5.
42. Perrone G, Santini D, Vincenzi B, et al. COX-2 expression in DCIS: correlation with VEGF, HER-2/neu, prognostic molecular markers and clinicopathological features. *Histopathology* 2005; 46: 561-8.
43. Luftner K, Possinger K. Nuclear matrix proteins as biomarkers for breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2: 23-31.
44. Kavalari R, Sarcevic B, Spagnoli GC, Separovic V, Samija M, Terracciano L, Heberer M, Juretic A. Expression of MAGE tumour-associated antigens is inversely correlated with tumour differentiation in invasive ductal breast cancers: an immunohistochemical study. *Virchows Arch* 2001; 439: 127-31.
45. Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Löning T, Jänicke F, Pantel K. MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 6682-7.
46. Miyashiro I, Kuo C, Huynh K, Iida A, Morton D, Bilchik A, Giuliano A, Hoon DS. Molecular strategy for detecting metastatic cancers with use of multiple tumor-specific MAGE-A genes. *Clin Chem* 2001; 47: 505-12.
47. Kaklamani VG, Gradishar WJ. Gene expression in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2006; 7: 123-8.
48. Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2981-91.
49. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-74.
50. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-6.
51. van de Vijver M. Gene-expression profiling and the future of adjuvant therapy. *Oncologist* 2005; 10 Suppl 2: 30-4.
52. West M, Blanchette C, Dressman H, et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 11462-7.
53. Nevins JR, Huang ES, Dressman H, Pittman J, Huang AT, West M. Towards integrated clinico-genomic models for personalized medicine: combining gene expression signatures and clinical factors in breast cancer outcomes prediction. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 153-7.
54. Huang E, Cheng SH, Dressman H, et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003; 361: 1590-6.
55. Ade Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009.
56. Ohene-Abuakwa Y, Pignatelli M. Adhesion molecules in cancer biology. *Adv Exp Med Biol* 2000; 465: 115-26.
57. Skubitz AP. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res* 2002; 107: 305-29.
58. Bex G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 289-93.
59. Barker N, Clevers H. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioassays* 2000; 22: 961-5.

60. Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1607-20.
61. Parker C, Rampaul RS, Pinder SE, Bell JA, Wencyk PM, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JF. E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1958-63.
62. Yoshida R, Kimura N, Harada Y, Ohuchi N. The loss of E-cadherin, α - and β -catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 513-20.
63. Gillett CE, Miles DW, Ryder K, et al. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2001; 193: 433-41.
64. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, Shen CY. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 2001; 20: 3814-23.
65. Reis-Filho JS, Cancela Paredes J, Milanezi F, Schmitt FC. Clinicopathologic implications of E-cadherin reactivity in patients with lobular carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 2002; 94: 2114-5.
66. Kleer CG, van Golen KL, Braun T, Merajver SD. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol* 2001; 14: 458-64.
67. Burguignon LY. CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 287-97.
68. Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1993; 143: 866-74.
69. Foekens JA, Dall P, Klijn JG, et al. Prognostic value of CD44 variant expression in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 84: 209-15.
70. Guriec N, Gairard B, Marcellin L, Wilk A, Calderoli H, Renaud R, Bergerat JP, Oberling F. CD44 isoforms with exon v6 and metastasis of primary NOMO breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44: 261-8.
71. Morris SF, O'Hanlon DM, McLaughlin R, McHale T, Connolly GE, Given HF. The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in Stage II breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 527-31.
72. Jansen RH, Joosten-Achjanie SR, Arends JW, Volovics A, Hupperets PS, Schouten HC, Hillen HE. CD44v6 is not a prognostic factor in primary breast cancer. *Ann Oncol* 1998; 9: 109-11.
73. Sheen-Chen SM, Chen WJ, Eng HL, Sheen CC, Chou FF, Cheng YF. Evaluation of the prognostic value of serum soluble CD44 in patients with breast cancer. *Cancer Invest* 1999; 17: 581-5.
74. Kopp R, Classen S, Wolf H, Gholam P, Possinger K, Wilmanns W. Predictive relevance of soluble CD44v6 serum levels for the responsiveness to second line hormone- or chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 2995-3000.
75. D'Errico A, Garbisa S, Liotta LA, Castronovo V, Stetler-Stevenson WG, Grigioni WF. Augmentation of Type IV collagenase laminin receptor and ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric and breast carcinoma progression. *Mod Pathol* 1991; 4: 239-46.
76. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, et al. Vascular integrin α (v) β 3, a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2625-34.
77. Tagliabue E, Ghirelli C, Squicciarini P, Aiello P, Colnaghi MI, Ménard S. Prognostic value of a β 4 integrin expression in breast carcinomas is affected by laminin production from tumor cells. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 407-10.
78. Ivaska J, Heino J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 16-24.
79. Marques LA, Franco ELF, Torloni H, Brentani MM, da Silva-Neto JB, Brentani RR. Independent prognostic value on laminin receptor expression in breast cancer survival. *Cancer Res* 1990; 50: 1479-83.
80. Daidone MG, Silvestrini R, D'Errico A, et al. Laminin receptors, collagenase IV and prognosis in node-negative breast cancers. *Int J Cancer* 1991; 48: 529-32.
81. Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. High expression level of a β 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* 1995; 55: 901-6.
82. Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dunser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet* 2000; 356: 1981-82.
83. Braun S, Pantel K. Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 201-16.
84. Decker DA, Morris LW, Levine AJ. Multi-drug resistance phenotype: a potential marker of chemotherapy resistance in breast cancer. *Lab Med* 1993; 24: 574-8.
85. Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multi-drug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 917-31.
86. Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Katki AG, Myers CE, Cowan KH. Overexpression of a novel and an ionic glutathionyl transferase in multi-drug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 15544-9.
87. Ardavanis A, Gerakini F, Amanatidou A, et al. Relationships between cathepsin-D, pS2 protein and hormonal receptors in breast cancer cytosols: inconsistency with their established prognostic significance. *Anticancer Res* 1997; 17: 3665-9.
88. Fuqua SA, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Von Hoff DD, Eckardt J, Osborne CK. Heat shock proteins and drug resistance. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32: 67-71.
89. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 570-4.
90. Tătu B, Brisson J, Landry J, Huot J. Prognostic significance of heat-shock protein-27 in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 93-7.
91. Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Ciocca DR, Allred DC, Clark GM, Chamness GC, Osborne CK, Fuqua SA. The small heat shock protein HSP27 is not an independent prognostic marker in axillary lymph node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1199-206.
92. Taylor JG. Using genetic variation to study human disease. *Trends Mol Med* 2001; 7: 507-12.
93. Weber W, Estoppey J, Stoll H. Familial cancer diagnosis. *Anticancer Res* 2001; 21: 3631-5.
94. Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 11-9.
95. Innocenti F, Ratain MJ. Update on pharmacogenetics in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 2002; 38: 639-44.
96. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 99-108.
97. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, et al. Thymidylate synthase levels as a therapeutic and prognostic predictor in breast cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 5621-6.
98. Lymberis SC, Parhar PK, Katsoulakis E, Formenti SC. Pharmacogenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 31-55.
99. Slonim DK. Transcriptional profiling in cancer: the path to clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2001; 2: 123-36.
100. Ayers M, Symmans WF, Stec J, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2284-93.
101. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003; 362: 362-9.

Adres do korespondencji

dr Tadeusz Ślubowski
 dr Małgorzata Ślubowska
 Amberheart Breast Cancer Foundation
 #206-2571 Shaughnessy Street
 Port Coquitlam, BC
 Canada, V3C 3G3
 tel. 1 604 942 35 69, tel. w Polsce +48 22 219 57 22
 faks 1 604 942 3087
 e-mail: info@amberheart.net