

W niniejszej pracy przedstawiono współczesny stan wiedzy na temat biologicznych metod diagnostycznych oraz znaczników jakościowych i ilościowych oznaczanych w komórkach nowotworowych lub płynach ustrojowych pacjentów z rakiem piersi. Zaprezentowano geny i odpowiadające im białka oraz substancje markerowe, oceniane za pomocą technik ilościowych, pozwalających na równoczesną ocenę tysięcy parametrów biologicznych i biochemicznych. Omówiono aberracje cyklu komórkowego, przeżywalności i wzrostu komórek, a także zmiany w apoptozie, adhezji, angiogenezie oraz nieprawidłowości ekspresji genowej. Tematyka pracy obejmuje także rolę procesów reparycyjnych DNA, amplifikację genów, utratę lub przetłumaczenie chromosomów prowadzące do zwiększenia ryzyka zachorowania i/lub bardziej agresywnego przebiegu choroby. Zamieszczono również informacje o sygnalizacji wewnątrzkomórkowej odpowiedzialnej za wzrost, różnicowanie, przeżywalność oraz obumieranie komórek, jak również markerów osocza, takich jak białko CA15-3, antygen kanceroembrionalny (CEA) i cytokeratyny (TPA, TPS i Cyfra 21.1).

Słowa kluczowe: rak piersi, znaczniki biologiczne, diagnostyka molekularna, diagnostyka genetyczna.

Diagnostyka biologiczna i molekularna w nowotworach piersi

Część I. Markery, genotypy i białkotypy

*Biological and molecular diagnostic methods in breast cancer
Part I. Markers, genomics and proteomics*

Tadeusz Ślubowski¹, Małgorzata Ślubowska¹, Marek Kujawa²

¹Amberheart Breast Cancer Foundation, Kanada

²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

Wstęp

Rak piersi jest nowotworem heterogennym zarówno pod względem klinicznym, jak i histopatologicznym. Z tego powodu podejmowane są próby identyfikacji specyficznych procesów biologicznych i znaczników molekularnych, mających przyczynić się do ujednoczenia kryteriów klasyfikowania stadiów choroby, jej diagnozowania i leczenia [1]. Zrozumienie szlaków molekularnych odgrywających rolę w osobniczej predyspozycji do nowotworzenia, przekształcaniu się wczesnych stadiów w zmiany o charakterze inwazyjnym oraz różnicujących podtypy nowotworów, uznawane jest za najbardziej obiecujące dla diagnozowania i chemioprewencji [2]. Ogromną wagę przywiązuje się do oceny tych procesów w komórkach macierzystych – w prawidłowym rozwoju gruczołu sutkowego, jak i jego patologii [3]. Uważa się, że identyfikacja szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i międzykomórkowej w kancerogenezie i apoptozie przyczyni się do stworzenia leczenia celowanego [4]. Sądzi się, że substancje uznane za markery biologiczne, w związku z osiągnięciami w genetyce molekularnej, mogą zrewolucjonizować rozpoznawanie i leczenie raka piersi, podobnie jak to miało miejsce w przypadku odkrycia onkogenów oraz badań nad aktywnością hormonów steroidowych i ich receptorów, które umożliwiły rozwój hormonalnych środków terapeutycznych [5]. Niezależnie od postępu w badaniach nad interakcją komórek nabłonkowych z podścieliskiem [6], obecnie szczególną uwagę zwraca się na ocenę interakcji genów oraz ilościową ocenę komórkowych i molekularnych markerów pośrednich (ang. *surrogate/intermediate endpoint markers*). Pozwalają one na interpretację wielostopniowych procesów biochemicznych oraz identyfikację czynników ryzyka. Oznaczane na etapach pośrednich między inicjalizacją procesu nowotworowego a pełnoobjawowym stadium klinicznym, lub między podaniem leku a uzyskaniem ostatecznego efektu jego działania, mogą determinować kierunek rozwoju procesu lub skuteczność leczenia [7].

Uważa się, że markery biologiczne używane w przypadku lekowej terapii antynowotworowej lub chemioprewencji u kobiet z wysokim poziomem ryzyka, umożliwiłyby nie tylko uzupełnienie diagnostyki obrazowej, ale dałyby również szansę na stworzenie pełniejszego obrazu klinicznego w oparciu o interpretację fenotypów komórek nowotworowych, zahamowania proliferacji lub odwrócenia aberracji genowych [8].

Stwierdzenie, że proces nowotworowy może rozwijać się jako sekwencja działania wielu kooperujących genów, doprowadziło do zogniskowania prac nad biomarkerami na identyfikacji genów i ich produktów białkowych oraz poszukiwaniu wzorców ekspresji genowej, rzutującej na ryzyko wystąpienia

The review on breast cancer biological and molecular diagnostics discusses up-to-date knowledge on quantitative and qualitative biological markers, identifiable either in cells and/or in bodily fluids. It deals with identification of genes and corresponding proteins as well as compounds that might be recognized through laboratory techniques following for same time evaluation of thousands of biological and chemical traits displaying potential as breast cancer markers. It also overviews changes in cell growth, cell cycle disturbances, apoptosis, cell adhesion and mobility as well as an improper gene expression. It also describes cancer cell genome markers related to DNA repairing leading to loss or breakage of chromosomes, gene amplification thus increasing risk and/or a high level of malignancy. It also outlines information on intracellular signaling networks playing an important role in growth, differentiation and cell death as well as serum biomarkers such as: CA15-3, protein, carcinoembryonic antigen (CEA), cytokeratins (TPA, TPS a Cyfra 21.1).

Key words: breast cancer, biomarker, molecular diagnostics, genetic diagnostics.

i przebieg choroby [9]. Dążeniem obu linii działania jest stworzenie profili molekularnych, identyfikowanych z płynów ustrojowych, które charakteryzowałyby typ lub podtyp nowotworu, stopień heterogenności oraz osobniczą predyspozycję do przekształcania się wczesnych stadiów nowotworów w zmiany o charakterze inwazyjnym [10].

Postęp w zakresie tworzenia wiarygodnych znaczników biologicznych napotyka jednak na wiele problemów techniczno-metodycznych. Należą do nich m.in. niskie stężenia białek nowotworowych, nieznaczne różnice ich struktury w porównaniu z białkami występującymi u ludzi zdrowych oraz brak specyficzności markera dla tkanki lub narządu, który jest niezbędny do identyfikacji pierwotnego miejsca wyjścia nowotworu [11].

Identyfikacja znaczników biologicznych

Prace nad identyfikacją nowotworów koncentrują się na próbach wykrycia molekularnego lub chemicznego znacznika jakościowego lub ilościowego wytwarzanego specyficznie przez komórki przednowotworowe lub nowotworowe, który występuje w płynach ustrojowych lub materiale tkankowym, w stężeniach umożliwiających jego wykrycie.

Idealny marker biologiczny powinien [12]:

- być obecny u wszystkich pacjentów ze specyficznym typem nowotworu,
 - wykazywać zmiany ilościowe w miarę progresji lub regresji nowotworu,
 - nie istnieć lub nie być wykrywany u ludzi zdrowych,
 - być wykrywany relatywnie prostymi i niekosztownymi metodami.
- W raku piersi musi on spełniać dodatkowo następujące warunki [12]:
- korelować z technikami obrazowymi – niezbędnymi do lokalizacji guza,
 - uwzględniać różnice osobnicze i różnice zależne od typów lub podtypów raka,
 - pozwalać na zastosowanie w badaniach przesiewowych,
 - wykazywać czułość i specyficzność potwierdzoną metodami statystycznymi.

Uważa się, że największy potencjał wykorzystania biomarkerów leży w badaniach przesiewowych, ocenie ryzyka, wczesnej diagnostyce oraz lokalizacji guzów, niezbędnych do stosowania leczenia celowanego.

Mimo nadziei, jakie niesie ze sobą identyfikacja mutacji genowych związanych z podwyższonym ryzykiem zachorowania, ich stwierdzenie nie jest równoznaczne z wystąpieniem lub obecnością choroby. Z tego powodu większość prac koncentruje się obecnie nie tylko na znalezieniu obecności zmutowanych genów, ale także na ocenach związanych z nimi profili białkowych [13].

Pomimo identyfikacji białek, takich jak np. CA15-3, rokujących nadzieje diagnostyczne ze względu na ich występowanie w zaawansowanych stadiach, uważa się je za markery przerzutów [14]. Niestety, białka markerowe są rzadko specyficzne wyłącznie dla raka piersi, a ich podwyższony poziom może występować w nowotworach płuc, okrężnicy, jajnika i trzustki oraz w chorobach nienowotworowych [15]. Tylko nielicznym biomarkerom, takim jak np. antygen specyficzny dla prostaty (PSA), przypisuje się specyfikę relatywną do narządu i typu nowotworu. Jednak doniesienia o występowaniu PSA w płynie aspiracyjnym z brodawki, cystach oraz w materiale tkankowym w nowotworach piersi zdają się podważać tę specyficzność [16].

Należy podkreślić, że postawa co do stosowania i powszechnego wdrażania biomarkerów w raku piersi jest ambiwalentna. Z jednej strony istnieją obawy, że ich przedwczesne wprowadzenie do badań przesiewowych w populacji o normalnym rozkładzie poziomu ryzyka pociągnie za sobą znaczną liczbę rozpoznań fałszywie dodatnich, z drugiej istnieją przesłanki na temat potencjalnych korzyści stosowania markerów w skryningu grup wysokiego ryzyka. Odnosiłoby się to szczególnie do identyfikacji przypadków niejednoznacznych, wykazujących graniczną patologię komórkową, w których istniałaby możliwość potwierdzenia zmian przednowotworowych oraz wczesnych stadiów nowotworów. Postęp prac oraz problemy dotyczące wdrożenia znaczników biologicznych w praktyce klinicznej przedstawiono w tab. 1.

Jakkolwiek uważa się, że w przyszłości markery biologiczne będą pomocne także w podejmowaniu decyzji co do wykonywania biopsji, to istnieją wąt-

Tabela 1. Znaczniki biologiczne w raku piersi
Table 1. Biomarkers in breast cancer

Proces	Zastosowanie	Aktualny postęp	Ograniczenia
mutacje genetyczne [17]	ocena ryzyka	testy dla BRCA1 i BRCA2	obecność w 10% nowotworów
polimorfizm genetyczny [17, 18]	ocena ryzyka	mapy pojedynczych polimorficznych nukleotydów	trudna ocena w grupach etnicznych i potrzeba ocen mnogich map
mutacje somatyczne [18]	ocena ryzyka, skryning, diagnostyka, rokowanie	utrata heterozygotyczności w stanach przednowotworowych oraz wczesnych i późnych stadiach nowotworów piersi	brak precyzyjnego określenia oceny inwazyjności lub procesu rozsiewu związanego z utratą heterozygotyczności
zmiany epigenetyczne w komórkach nowotworowych [19, 20]	ocena ryzyka, skryning, diagnostyka, rokowanie, leczenie celowane	badania korelujące procesy metylacji z obecnością lub stadiem nowotworu piersi	wymaga potwierdzenia w masowych badaniach populacji i stworzenia odpowiedniego rejestru
zmieniona ekspresja genów [2, 18]	skryning, diagnostyka, rokowanie, wybór i kontrola leczenia	ocena ekspresji genów oraz receptorów steroidowych, przewidująca wynik terapii antyestrogenowej	wymagają potwierdzenia w masowych badaniach populacji i stworzenia rejestrów genetycznych
zmiany w szlakach sygnalizacji białkowej [15]	skryning, diagnostyka, rokowanie, ocena leczenia	stosowane w ocenie klinicznej przed, w czasie i po leczeniu	niska czułość, brak standaryzacji ze względu na heterogenność populacji
markery osoczowe [2]	skryning, diagnostyka, rokowanie, ocena leczenia	mucyna CA15-3, stosowana w identyfikacji raka nawrotowego	niska czułość we wczesnych zmianach złośliwych, brak specyficzności narządowej i jednolicie podwyższonego poziomu
zmiany profili białek lub peptydów osocza [15]	skryning, diagnoza, rokowanie, wybór i kontrola leczenia	zwiększenie trafności diagnozowania raka jajnika	niska czułość i specyficzność, heterogenność w populacji
angiogeneza [19, 21]	ocena ryzyka, rokowanie, wybór leczenia	heterogenność w populacji receptory angiogenezy oceniane w celu wypracowania leczenia	wymaga dalszych prac badawczych; badania zorientowane na rozwój leków
inwazyjność i proces rozsiewu [2, 14, 15]	rokowanie	ocena proteaz i ich inhibitorów – aktywatora urokinazy plazminogenu – u pacjentów bez zajęcia węzłów chłonnych	brak efektywności dla rozlanego procesu nowotworowego

pliwości, czy będą one w stanie całkowicie zastąpić ocenę histopatologiczną.

Uważa się, że znaczne przyspieszenie wdrażania biomarkerów nastąpi wtedy, kiedy będą mogły być stosowane w identyfikacji ryzyka zachorowania lub wczesnego procesu nowotworowego. Do tego czasu ich rola w diagnozowaniu i ocenie leczenia raka piersi będzie miała charakter pomocniczy i będzie odnosić się głównie do:

- identyfikacji, różnicowania i rokowania w nowotworach przewodowych *in situ*,
- wyboru i oceny wyników leczenia,

- monitorowania postępu choroby lub wznowy procesu po zakończeniu leczenia.

Oceny poziomu tkankowych receptorów estrogenowych i progesteronowych, a także receptora Her2, stosowane obecnie przy wyborze leczenia, są przykładem pomocniczej roli biomarkerów [2].

Mimo osiągnięcia czułości i specyficzności markerów biologicznych wystarczającej do identyfikacji różnic osobniczych i oceny populacji komórkowych pochodzących z tego samego guza [6], warunkami ich stosowania w zestawach diagnostycznych są:

1. Stworzenie testów umożliwiających mało inwazyjne pobranie tkanek i płynów ustrojowych, łatwe opracowanie laboratoryjne i przechowywanie materiału.
2. Weryfikowalność procedur – standardy kalibracji, powtarzalność niezależna od wieku, stanu hormonalnego, czynników ryzyka itd.
3. Potwierdzona w badaniach populacyjnych użyteczność w skryningu w kontekście redukcji umieralności i wydłużenia przeżywalności.
4. Zdefiniowanie kryteriów kwalifikacji pacjentów i oceny statystycznej – w porównaniu z istniejącymi metodami [8].
5. Zmiany administracyjno-prawne – reforma rejestrów nowotworów i procedur legislacyjnych dotyczących ochrony danych osobowych pacjentów.

Ocena genów i białek

Poszukiwania biologicznych znaczników nowotworowych, były prowadzone do wczesnych lat 90. ubiegłego wieku, głównie za pomocą prób identyfikacji poszczególnych genów i związanych z nimi białek. Rozwój nowych technik laboratoryjnych, umożliwiających jednoczesną ocenę tysięcy genów i odpowiadających im białek, stworzył podstawy do bardziej efektywnej oceny różnic między komórkami prawidłowymi i zmienionymi nowotworowo. Metody te spowodowały, że więcej substancji biologicznych i związków chemicznych zaczęła być branych pod uwagę jako potencjalne markery nowotworowe [7]. Ocena mikromacierzy wykonywana na tysiącach oligonukleotydów oraz na komplementarnym DNA (cDNA) umożliwiła identyfikację kwasów nukleinowych pochodzących z nowotworów. Dało to z kolei szansę identyfikacji zmian aktywności genowej w komórkach oraz ujawniło różnice ilościowe i jakościowe w DNA nowotworowym. Metody identyfikujące zmiany szlaków białkowych w kancerogenezie dostarczyły informacji na temat interakcji komórek nowotworowych, a także relacji nowotworu w stosunku do gospodarza [22]. Techniki te umożliwiły również identyfikację proteomów stanowiących białkowe ekwiwalenty genów, które wykazują potencjał jako biomarkery nowotworowe, zarówno na poziomie komórkowym, jak i tkankowym. Zastosowanie mikromacierzy białek, analogiczne do mikromacierzy DNA, dało możliwość równoczesnej oceny dużej liczby białek zarówno pod względem ich funkcji, jak i procesów amplifikacji sygnału [17]. Profilowanie proteomów osoczowych, charakterystycznych dla przebiegu choroby, ujawniło specyficzne cechy, które mogą być pomocne w wykrywaniu nowotworów, doborze terapii celowanej i śledzeniu odpowiedzi na leczenie [23].

Ekspresja profili genetycznych

Zaburzenia wzrostu i przeżywalności komórek występują jako kompleksowy proces obejmujący zarówno zmiany genetyczne, jak i epigenetyczne [24]. W guzach sutka, oprócz cech charakterystycznych dla zmian złośliwych, takich jak zaburzenia cyklu komórkowego, nieprawidłowości w apoptozie, adhezji, ruchomości komórek czy angiogenezie, obserwuje się specyficzne dla każdego guza wzorce ekspresji genowej [25]. Systematyzacja guzów piersi na podstawie profili ekspresji genetycznej rokuje nadzieje na wprowadzenie klasyfikacji umożliwiającej przewidywanie reakcji na le-

czenie i indywidualizowane rokowanie u poszczególnych pacjentów [20]. Uważa się, że ocena zmian jakościowych lub ilościowych kopii genów, które są charakterystyczne dla procesu nowotworowego, może ułatwić identyfikację nieprawidłowości dotyczących regulacji podziałów komórkowych, ruchu komórek oraz apoptozy [26].

Zastosowanie mikromacierzy ułatwia analizę poziomu ekspresji genu w pojedynczej próbce materiału oraz porównanie ekspresji tysięcy genów między dwoma różniącymi się typami komórek lub tkanek, podobnie jak w przypadku porównania tkanki zmienionej nowotworowo z normalną tkanką gruczołową piersi. Jakkolwiek technologia ta jest ciągle na wczesnym etapie rozwoju, klasyfikacja guza na podstawie analizy ekspresji genów, włączając w to nowotwory piersi, już dziś stała się rzeczywistością [20, 27]. Zidentyfikowano m.in. 5 różniących się podtypów nowotworu sutka u pacjentów z naciekającym rakiem przewodowym [28]. Tego typu podejście, identyfikujące stadium guza, na podstawie pierwotnego podobieństwa charakteru ekspresji genu znane jest jako analiza kontrolowana. Istnieje również tzw. analiza kontrolowana, która w sposób bezpośredni ocenia relacje między ekspresją profili genetycznych a determinantami klinicznymi, takimi jak rokowanie. Za pomocą oligonukleotydowych mikromacierzy 25 000 genów [29] określono m.in. ekspresję profili genetycznych w 98 pierwotnych guzach gruczołu sutkowego u pacjentek, bez zajętych węzłów chłonnych, w wieku poniżej 55. roku życia. Na podstawie tych badań i porównania oceny klinicznej zidentyfikowano u badanych kobiet zestaw 70 genów, które w miarę precyzyjnie umożliwiły rokowanie. Złe rokowanie było związane ze wzrostem ekspresji genów kontrolujących cykl komórkowy, inwazyjność, angiogenezę i transdukcję sygnału. Badania testujące zestaw istotnych prognostycznie 70 genów, przeprowadzone u pacjentek poniżej 53. roku życia, bez zajętych węzłów chłonnych potwierdziło poprzednie wyniki. W tej grupie chorych rokowanie przy pomocy oceny profilu genetycznego było dokładniejsze niż rokowanie na podstawie wieku, rozmiaru guza, oceny histopatologicznej i przerzutów do pachowych węzłów chłonnych [30]. Logiczną konsekwencją tego typu badań powinno być przeprowadzenie ocen w reprezentatywnych grupach pacjentek z rakiem sutka w celu stwierdzenia użyteczności w praktyce klinicznej [31]. Mimo braku jednoznacznych dowodów co do użyteczności, wynikających z prospektywnych badań klinicznych, test o nazwie Oncotype DX dostępny jest w USA i w Holandii. Zestaw testowy został wprowadzony na rynek jako test laboratoryjny, a nie test diagnostyczny [32]. Jakkolwiek profilowanie przy użyciu mikromacierzy wykazuje cechy markerów diagnostycznych i rokowniczych, technika ta nie jest przystosowana do używania w codziennej praktyce klinicznej [20]. Jest to spowodowane m.in. wysokim kosztem i trudnością uzyskania RNA z preparatów biopsyjnych, które rutynowo w celu oceny histologicznej utrwalane są formaliną i zatapiane w parafinie [33]. Wydaje się, że z chwilą, kiedy mikromacierze umożliwią identyfikację klinicznie jednoznacznych genów o wysokiej ekspresji, bardziej dostępne, szybsze i mniej kosztowne technologie będą mogły być zastosowane w testach diagnostycznych u pacjentów z rakiem sutka. Dotych-

czas z grupy genów wyłonił na bazie hipermetylacji udało się zidentyfikować 35 podejrzanych genów supresyjnych, a następnie zespół 3 genów o wysokiej korelacji w stosunku do wczesnych stadiów raka piersi. Markery te zostały zidentyfikowane przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) w komórkach wyptukanych z przewodów gruczołu sutkowego [34]. Prowadzone obecnie badania kliniczne (ang. *clinical trials*) koncentrują się na ocenie biomarkerów wczesnych stadiów raka piersi u kobiet bezobjawowych oraz u tych, które są obciążone wysokim ryzykiem pierwotnych lub nawrotowych raków piersi [35].

Identyfikatory genomu nowotworowego

Procesy reparacyjne DNA odpowiedzialne za działanie antymutagenne prowadzą często do utraty chromosomów, ich przełamania lub amplifikacji genowej [36]. Liczba i lokalizacja tego rodzaju uszkodzeń genomu w istotny sposób zwiększa indywidualne ryzyko wystąpienia raka, a w przypadku zaistnienia procesu nowotworowego – jego agresywność. Technika zwana porównawczymi mikromacierzami hybrydyzacji genowej (ang. *comparative genomic hybridization* – CGH), wykrywająca i mapująca zmiany w liczbie kopii DNA komórek nowotworowych, ma potencjalne perspektywy co do rokowania przebiegu choroby. Ocena przy pomocy mikromacierzy CGH jest dokonywana przez hybrydyzację dużych fragmentów DNA genowego, w porównaniu z sekwencją DNA istniejącego w znanych punktach chromosomu. Różnice w hybrydyzacji między normalnymi komórkami nabłonkowymi przewodów a komórkami uzyskanymi z biopsji guza mogą wskazywać na istotne rejony uszkodzenia chromosomu związane z rozwojem guzów. W przeciwieństwie do analizy opartej o ekspresję RNA, mikromacierze CGH mogą być oceniane na utrwalonych w formalinie preparatach, pochodzących z uprzednio wykonanych biopsji, dzięki czemu wydają się one bardziej użyteczne w rutynowej technice histopatologicznej [24]. Często technika mikromacierzy CGH stosowana w nowotworach piersi identyfikuje utratę całości lub części ramion chromosomów, amplifikację genów oraz uszkodzenie końców chromosomów. Cechy te mogą być wykorzystane jako markery prognostyczne [19].

Ponieważ amplifikacja genu *ErbB2* koreluje z jego wzmożoną ekspresją, poziom odpowiadającego mu białka, oceniany immunohistochemicznie w materiale biopsyjnym, może być wykładnikiem pozytywnej reakcji na leczenie herceptyną. Istnieją dowody, że ocena liczby kopii *ErbB2* może okazać się prostym i czułym wskaźnikiem wrażliwości na trastuzumab [19, 37].

Identyfikacja innych anomalii genowych występujących w rakach piersi powinna umożliwić planowanie celowanej terapii genowej, jak również identyfikację guzów opornych na leczenie, jak to ma miejsce w przypadku zależnej od naprawy DNA oporności w stosunku do cisplatyny [19].

Mikromacierze mogą być także stosowane do oceny występowania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP) lub utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity* – LOH) [38]. Oba procesy występujące we wczesnych stadiach nowotworów, podobnie jak w przypadku aberracji w liczbie kopii DNA, mogą

być wykorzystane w celach prognostycznych oraz leczeniu celowanym.

Stwierdzono, że w raku piersi ok. 12% wszystkich anomalii ekspresji genów stwierdzanych jest bezpośrednio zależnych od zmian w liczbie kopii genów, co może prowadzić do uogólnionej deregulacji ekspresji genów odpowiedzialnej za powstanie lub rozwój choroby [17].

Transdukcja sygnału

Przekazywanie sygnału na poziomie molekularnym polega na przenoszeniu informacji za pośrednictwem regulacyjnych substancji biochemicznych. Dotyczy to takich procesów, jak wzrost, różnicowanie, przeżywalność oraz obumieranie komórek. Poszczególne składowe odgrywające rolę w przekazie informacji mają charakter sieci sygnalizacji biochemicznej. W przypadku zaburzeń jakiegokolwiek z elementów sieci informacyjnej, jak ma to miejsce w większości nowotworów, może dochodzić do zwiększenia potencjału proliferacyjnego, pobudzenia angiogenezy, zwiększonej inwazyjności prowadzącej do przerzutów czy zahamowania apoptozy. Uważa się, że najistotniejszą rolę w powstaniu procesu nowotworowego pełnią zmiany szlaku białek. Proces ten może zachodzić na poziomie ekspresji genów, procesów posttranslacyjnych lub modyfikacji białek funkcjonalnych [16, 17]. Stosowanie mikromacierzy białek, za pomocą których można równocześnie mierzyć stężenie i stan fosforylacji tysięcy indywidualnych białek, stało się procedurą używaną do oceny zaburzeń w przekazie informacji białkowej. W przypadku tzw. mikromacierzy odwróconej fazy, na szkieletu pokrytym nitrocelulozą umieszcza się białka guza i bada w odniesieniu do przeciwciał przeciwko ufosforylowanym białkom, których rola w przekazywaniu sygnału jest dobrze znana [16]. Kompleksy, do których przyłączono przeciwciała, mogą być identyfikowane i ocenione ilościowo przy pomocy chemiluminescencji, fluorescencji lub metod kolorymetrycznych.

Zmiany białek odnoszące się do okresu posttranslacyjnego pełnią szczególnie istotną rolę w przekazie informacji. Proces posttranslacyjny odnosi się do modyfikacji w strukturze chemicznej białek, które zostały zsyntetyzowane i uległy translacji, co z kolei wpływa na zmianę wyspecjalizowanej funkcji tych białek. Przykładem takiego procesu może być glikolizacja – dodanie grupy glikozylowej, acetylacja – grupy acetylowej, jak również fosforylacja polegająca na przyłączeniu do białek grup fosforylowych (PO₄). Wiele białek pozostaje nieaktywnych, dopóki nie zostaną one ufosforylowane, co powoduje, że proces ten jest istotnym elementem w kontroli funkcji komórki. Porównanie stanu fosforylacji w białkach sygnalizacyjnych, zaangażowanych w proces wzrostu i apoptozę w komórkach nabłonkowych gruczołu piersiowego wykazało, że przeżywalność pacjentów koreluje z fosforylacją dwóch kluczowych białek sygnalizacyjnych [15]. Jakkolwiek proces z udziałem białek sygnalizacyjnych określanych u indywidualnych pacjentów jest na tyle unikalny, że nie da się go porównać międzyosobniczo, to rejestracja jego zmian u tego samego pacjenta może być istotna dla oceny prowadzonego leczenia. Nadzieja na powszechne stosowanie mikromacierzy białek pokładana jest w ich potencjalnych możliwościach identyfikowania

anomalii osobniczych oraz zmienionych białek informacyjnych pojawiających się w procesie nowotworzenia lub w danym guzie. Jest to szczególnie istotne w rozpoznawaniu patologii sygnalizacji białkowej we wczesnych stadiach nowotworów, zanim zostaną wykryte standardowymi metodami diagnostycznymi.

Jakkolwiek większość białek sygnalizacyjnych nie została jeszcze zidentyfikowana, a ich rola w procesie wzrostu i obumierania komórek należycie scharakteryzowana, to wydaje się, że stosowanie mikromacierzy w wykrywaniu i leczeniu nowotworów stworzy podstawy do molekularnej interpretacji procesu nowotworowego. Obecny stan rozwoju mikromacierzy białek umożliwi identyfikację mniej niż 10% ogólnego garnituru białkowego, zwanego proteomem [24]. Uważa się, że wraz z identyfikacją kluczowych białek diagnostycznych i nowych markerów prognostycznych, liczba specyficznych białek niezbędnych do postawienia rozpoznania może ulec redukcji. W chwili obecnej dodatkową trudnością stosowania mikromacierzy białek w praktyce klinicznej jest naturalna niestabilność białek oraz brak możliwości uzyskania statycznych, powtarzalnych wyników ich wiązania [16].

Sądzi się także, że leki ukierunkowane na indywidualne procesy molekularne wykazywałyby przewagę w hamowaniu proliferacji komórek w stosunku do leczenia chemicznego, wywołującego destrukcję zarówno komórek guza, jak i komórek niezmiennych patologicznie. Prowadzone są próby stworzenia środków terapeutycznych, które w sposób celowany ingerowałyby w procesy przyczyniające się do wypaczenia przekazu informacji. Przykładem może być klasa ErbB receptorów kinazy tyrozynowej oraz szlak związany z regulacją poziomu białka komórkowego p21 w kompleksach 2 i 4 związanych z kinazą zależną od Cykliny (Cdk) [39]. Poza dostępnym na rynku przeciwciałem monoklonalnym przeciw receptorowi ErbB2 – trastuzumabem – stosowanym w leczeniu rozlanego raka piersi, w którym występuje nadekspresja receptora ErbB2 (HER2), potencjalną wartością terapeutyczną rokują także rapamycyna i jej pochodne [40].

Nowotworowe sygnatury osoczowe

Spośród markerów identyfikowanych w płynach ustrojowych pacjentów z rakiem piersi, tylko 3 grupy, tzn. białko CA15-3, antygen kanceroembrionalny (CEA) i cytokeratyny (TPA, TPS i Cyfra 21.1) są stosowane mniej lub bardziej powszechnie w diagnostyce. Z tego powodu, iż w większości przypadków świadczą one o zaawansowanej chorobie, a nie o jej inicyjnym stadium, są bardziej użyteczne w przypadkach wznowy niż w zmianach o charakterze pierwotnym [41].

Białka, fragmenty ich łańcuchów i metabolity pochodzące z tkanek, przez które przepływa krew, mają tendencję do pojawiania się w osoczu. Niektóre z nich, jeżeli pochodzą z guza lub narządu, w którym rozwija się nowotwór, mogą być użyte jako markery transformacji nowotworowej lub interakcji pomiędzy guzem a narządem macierzystym [16]. Często tego typu analiz dokonuje się przy użyciu systemów posiadających sztuczną inteligencję, zapewniających oszacowanie ogromnej liczby danych, ponieważ typowy profil białkowy może posiadać 15 000 lub więcej

punktów informacyjnych. Profile białek osocza, użyte jako potencjalne markery biologiczne, mogą być stosowane zarówno w diagnozowaniu nowotworów, jak i monitorowaniu wyników leczenia [15]. Jeżeli procedury te zostaną upowszechnione i będą łatwiej dostępne, mogą służyć weryfikowaniu zmian po ich identyfikacji na mammogramie bądź jako badanie zastępujące lub uzupełniające biopsję. Jakkolwiek profilowanie białek lub ich fragmentów może prezentować indywidualizowane wzorce i w konsekwencji doprowadzić do opracowania systemu odniesienia do objawów klinicznych [42], to istnieją wątpliwości czy *prorokowanie* z fragmentów białkowych nie ma charakteru oceny artefaktów związanych z pozaustrojowym rozkładem enzymatycznym białek osoczowych [43]. Wyniki niektórych prac sugerują, że możliwość zastosowania biomarkerów osoczowych jako metody zastępującej biopsję, w połączeniu z technikami obrazowymi, takimi jak mammografia, USG czy rezonans magnetyczny, będzie mogło mieć miejsce dopiero wtedy, kiedy zostanie dokonany znaczny postęp w dokładności oceny profili białkowych [15].

Piśmiennictwo

- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Fekairi S, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F. How to best classify breast cancer: conventional and novel classifications (review). *Int J Oncol* 2005; 27: 1307-13.
- Reis-Filho JS, Simpson PT, Gale T, Lakhani SR. The molecular genetics of breast cancer: the contribution of comparative genomic hybridization. *Pathol Res Pract* 2005; 201: 713-25.
- Petersen OW, Gudjonsson T, Villadsen R, Bissell MJ, Ronnov-Jessen L. Epithelial progenitor cell lines as models of normal breast morphogenesis and neoplasia. *Cell Prolif* 2003; 36 Suppl 1: 33-44.
- Lévy D, Plu-Bureau G, Decroix Y, Hugol D, Rosténe W, Kimchi A, Gompel A. Death-associated protein kinase loss of expression is a new marker for breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3124-30.
- Dowsett M, Folkard E, Doody D, Haynes B. The biology of steroid hormones and endocrine treatment of breast cancer. *Breast* 2005; 14: 452-7.
- Bild AH, Yao G, Chang JT, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; 439: 353-7.
- Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 221-36.
- Stearns V, Gallagher A, Kleer CG, et al. A pilot study to establish a clinical model to perform phase II studies of breast cancer chemopreventive agents in women at high risk with biomarkers as surrogate endpoints for activity. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8332-40.
- Ślubowski T, Ślubowska M. Biomarkery w raku piersi. Część I. receptory, czynniki wzrostu, geny i onkogeny. *Współcz Onkol* 2007; 11: 167-74.
- Lumachi F, Basso SM. Serum tumor markers in patients with breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004; 4: 921-31.
- Henry NL, Hayes DF. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. *Oncologist* 2006; 11: 541-52.
- Zolg JW, Langen H. How industry is approaching the search for new diagnostic markers and biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 345-54.
- Schulte PA. The use of biomarkers in surveillance, medical screening, and intervention. *Mutat Res* 2005; 592: 155-63.
- Alix-Panabières, Brouillet JP, Fabbro M, Yssel H, Rousset T, Maudelonde T, Choquet-Kastylevsky G, Vendrell JP. Characterization and enumeration of cells secreting tumor markers in the peripheral blood of breast cancer patients. *J Immunol Methods* 2005; 299: 177-88.

15. Walach N, Gur Y. Leukocyte alkaline phosphatase, CA15-3, CA125, and CEA in cancer patients. *Tumori* 1998; 84: 360-3.
16. Black MH, Diamandis EP. The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 1-14.
17. Wilson CA, Dering J. Recent translational research: microarray expression profiling of breast cancer – beyond classification and prognostic markers? *Breast Cancer Res* 2004; 6: 192-200.
18. Grubberger S, Ringner M, Chen Y, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 2001; 61: 5979-84.
19. Beenken SW, Bland KI. Biomarkers for breast cancer. *Minerva Chir* 2002; 57: 437-48.
20. Ransohoff DF. Cancer. Developing molecular biomarkers for cancer. *Science* 2003; 299: 1679-80.
21. Fabian CJ, Kamel S, Zalles C, Kimler BF. Identification of a chemoprevention cohort from a population of women at high risk for breast cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1996; 25: 112-22.
22. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-9.
23. Ślubowski T, Ślubowska M, Wojciechowski A. Techniki diagnostyczne w raku piersi. Część III: Nowe metody biologiczne i genetyczne. *Ginekol Pol* 2007; 78: 554-9.
24. Tlsty TD, Crawford YG, Holst CR, Fordyce CA, Zhang J, McDermott K, Kozakiewicz K, Gauthier ML. Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9: 263-74.
25. Chung EJ, Sung YK, Farooq M, et al. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 2002; 14: 382-7.
26. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12963-8.
27. Ahr A, Holtrich U, Solbach C, Scharl A, Strebhardt K, Karn T, Kaufmann M. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol* 2001; 195: 312-20.
28. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52.
29. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernards R, Friend SH. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 5: 57-8.
30. van de 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.
31. Kallioniemi A. Molecular signatures of breast cancer – predicting the future. *N Engl J Med* 2002; 347: 2067-8.
32. Garber K. Genomic medicine. Gene expression tests foretell breast cancer's future. *Science* 2004; 303: 1754-5.
33. Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 151-7.
34. Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 4442-52.
35. Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, et al. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet* 2001; 357: 1335-6.
36. Ślubowski T, Ślubowska M. Biomarkery w raku piersi. Część II: markery białkowe, DNA, adhezji komórkowej i oporności lekowej. *Współcz Onkol* 2007; 11: 240-6.
37. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996; 13: 63-72.
38. Lin M, Wei LJ, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C. dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics* 2004; 20: 1233-40.
39. Law M, Forrester E, Chytil A, et al. Rapamycin Disrupts Cyclin/Cyclin-Dependent Kinase/p21/Proliferating Cell Nuclear Antigen Complexes and Cyclin D1 Reverses Rapamycin Action by Stabilizing These Complexes. *Cancer Res* 2006; 66: 1070-80.
40. Kaklamani V, O'Regan RM. New targeted therapies in breast cancer. *Semin Oncol* 2004; 2 Suppl 4: 20-5.
41. Ławicki S, Mroczko B, Szmitowski M. Markery nowotworowe raka piersi. *Postępy Hig Med Dosw* 2004; 58: 292-300.
42. Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 2006; 116: 271-84.
43. Liotta LA, Petricoin EF. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *J Clin Invest* 2006; 116: 26-30.

Adres do korespondencji

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