

W pracy przedstawiono molekularne techniki diagnostyczne, przyżyciowe obrazowanie procesów biologicznych oraz metody molekularno-obrazowe w raku piersi. Omówiono białkowe i genowe mapy molekularne służące do identyfikacji wczesnych stadiów nowotworów piersi, określania ich zaawansowania i leczenia celowanego na poziomie molekularnym. Zaprezentowano obrazowanie procesów biologicznych w *realnym czasie*, procesy fizjologiczne, takie jak przepływ krwi w tkance nowotworowej oraz metabolizm glukozy i utylizację tlenu, a także wzmocnienie sygnału, regulację cyklu komórkowego i oporność wielolekową. Autorzy opisali mapowanie przy pomocy znaczników emitujących sygnał charakterystyczny dla zmian złośliwych, mapowanie z użyciem znaczników molekularnych w połączeniu z tomografią pozytronową (ang. *positron emission tomography* – PET), emisji pojedynczego fotonu (ang. *single photon emission computed tomography* – SPECT), a także stosowanie substancji białkowych wykorzystywanych w rezonansie magnetycznym (ang. *magnetic resonance imaging* – MRI) do uwidaczniania powierzchni komórek, identyfikacji antygenów nowotworowych oraz białek apoptotycznych. Praca prezentuje również fotoobrazowanie wykonywane z zastosowaniem znaczników bioluminescencyjnych, fluorochromów bliskiej podczerwieni i fluorescencji białek o charakterze *red-shift*.

**Słowa kluczowe:** rak piersi, profile molekularne, mapowanie molekularne, obrazowanie biologiczne, obrazowanie metaboliczne.

## Diagnostyka biologiczna i molekularna w nowotworach piersi

### Część II. Profilowanie i obrazowanie procesów biologicznych

*Biological and molecular diagnostic methods in breast cancer  
Part II. Profiling and imaging of biological processing*

Tadeusz Ślubowski<sup>1</sup>, Małgorzata Ślubowska<sup>1</sup>, Marek Kujawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Amberheart Breast Cancer Foundation, Kanada

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

#### Wstęp

Rak piersi, najczęściej diagnozowany nowotwór u kobiet, wykazuje wysoką heterogenność kliniczną i komórkową. Dlatego badania nad identyfikacją znaczników molekularnych, które umożliwiłyby diagnozowanie wczesnych stadiów choroby oraz zindywidualizowane leczenie, są uważane za szczególnie istotne. W nowotworach gruczołu sutkowego dużą wagę przywiązuje się do oceny procesów biologicznych mających miejsce przy przechodzeniu tkanki prawidłowej w zmiany o typie *carcinoma in situ*. Odnosi się to m.in. do nadmiernej ekspresji genowej, prowadzącej do sekrecji lub nadprodukcji specyficznych białek, takich jak cytokiny i chemokiny, odpowiedzialnych za zaburzenia sygnalizacji na poziomie autokrynnym i parakrynnym [1].

Systemy identyfikacji znaczników molekularnych w raku piersi opierają się o szeroką gamę metodyczną. Seryjna analiza ekspresji genowej (ang. *serial analysis of gene expression* – SAGE) [2] pozwalająca na ilościową ocenę transkryptów mRNA syntetyzowanych na nici DNA, hybrydyzacja m-RNA *in situ* (ang. *m-RNA in situ hybridization*) oceniająca ekspresję genów w guzach litych o wysokiej heterogenności, a także hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization* – FISH) i chromogenna hybrydyzacja *in situ* (ang. *chromogenic in situ hybridization* – CISH), które służą do oceny receptorów błonowych, [3, 4] stanowią przykłady technik molekularnych.

Tendencja do wprowadzania technik identyfikacji nowych markerów molekularnych istnieje niezależnie od niepowodzeń związanych z uzyskaniem ich wysokiej czułości i specyficzności. Sądzi się, że osiągnięcie przełomu w tym zakresie umożliwi diagnozowanie nowotworów piersi przed ich klasycznym rozpoznaniem obrazowym, jak również leczenie stadiów preinwazyjnych.

#### Profile molekularne

Identyfikacja specyficznych wyznaczników molekularnych, izolowanych z osocza, wydaje się istotna zarówno w zakresie diagnostyki, jak i oceny postępu choroby. Napotyka ona, podobnie jak ocena mikromacierzy DNA i białek uzyskiwanych z materiału tkankowego, na wiele problemów natury technicznej. Należą do nich znalezienie weryfikowalnych zależności między profilami substancji biochemicznych a obrazem klinicznym oraz wypracowanie efektywnych pod względem kosztów metod [5]. W przypadku mikromacierzy DNA brak wiarygodności rezultatów jest wiązany z metodyką przygotowania i obróbką materiału, znakovaniem, trudnością lokalizacji sekwencji lub niedoskonałością sekwencjonowania. Niejednoznaczność mikromacierzy DNA została przedstawiona w pra-

This review describes molecular diagnostic techniques, real time in vivo imaging as well as markers for mixed molecular-imaging methods. It presents molecular mapping differentiating malignant changes on the basis of aberrant gene expression and/or changes in proteins, helping to identify early stages of the disease, its development and targeted treatment at the molecular level. It presents real time imaging of glucose metabolism, oxygen utilization and blood flow in cancer tissue. Signal amplification in cell cycle regulation, multidrug resistance, angiogenesis, apoptosis, mapping via cancer-specific signal emitters, functional imaging by molecular markers, along with positron emission tomography PET, as well as photon emission tomography and methods combining use of antibodies and the protein compounds for MRI to display cancer membrane antigens and apoptotic proteins are also described. Finally, it elucidates photoimaging utilizing bioluminescent and fluorochrome near-red markers, as well as fluorescent “red-shift” protein markers.

**Key words:** breast cancer, molecular profile, molecular mapping, biological imaging, metabolic imaging.

cach, w których oceny sekwencji oligonukleotydowych i cDNA wykazywały odmienne ekspresje profili genetycznych [6] oraz wątpliwości co do powtarzalności metody i ocen statystycznych [7].

Dlatego też coraz większą uwagę zwraca się na poprawę unifikacji danych z poszczególnych eksperymentów wykonywanych wg tej samej metody oraz analizujących te same profile ekspresji mikromacierzy. Wraz ze wzrostem liczby metod eksperymentalnych oraz uzyskiwanych profili nasuwają się wątpliwości co do obiektywnych porównań i wyboru najbardziej adekwatnej metody [8]. Uważa się, że nie ma jednej, najwłaściwszej drogi analizowania profili molekularnych, a istnieje tylko możliwość optymalizacji wyboru metody w odniesieniu do specyficznego analizowanego problemu [9].

Stosowanie profilowania molekularnego niesie ze sobą bardzo istotne ograniczenia. Wynika to z faktu, że jakkolwiek znacznik może sugerować obecność nowotworu lub komórek prenowotworowych, nie może lokalizować źródła pochodzenia sygnału. Powoduje to konieczność uzupełniania ocen molekularnych technikami obrazowymi lub badaniami biochemicznymi.

### Mapy molekularne

Obecnie większość raków piersi wykrywana jest przy pomocy klasycznej mammografii rentgenowskiej lub innych metod obrazowych, a także na podstawie oceny parametrów fizycznych, takich jak gęstość elektronowa, oddziaływanie akustyczne lub temperatura [10]. Jakkolwiek metody obrazowe mogą różnicować tkanki zmienione patologicznie, obrazowanie molekularne ma tę zaletę, że może identyfikować zmienioną ekspresję genu lub zmiany w charakterze białek, prowadzące do wystąpienia choroby. Perspektywa metod diagnostycznych i leczenia ukierunkowanego na procesy molekularne dawałaby możliwość identyfikacji wczesnych stadiów choroby, określenia jej zaawansowania i kontroli leczenia [11]. Z chwilą kiedy modyfikacje procesów biologicznych na poziomie komórkowym i subkomórkowym zaczną odgrywać rolę w leczeniu, możliwe będzie stosowanie terapii celowanej, prowadzącej do hamowania proliferacji komórek, a nie do ich śmierci [10, 12].

Z tego powodu jednak, że istnieje niewielka szansa, aby molekularna terapia celowana mogła być oceniana w parametrach obrazowych, np. zmiany wielkości guza [13] jedyną obiektywną metodą jej skuteczności będzie ocena na poziomie genotypowym [14].

Sądzi się, że mapowanie molekularne będzie mogło być stosowane w całym przebiegu leczenia nowotworów, poczynając od wykrywania zmian w ekspresji genu, przez wybór metody leczenia, jej ocenę lub korygowanie sposobu postępowania [14].

### Funkcjonalne obrazowanie procesów biologicznych

Obrazowanie molekularne można zaliczyć do wysoko specyficznych form mapowania funkcjonalnego, identyfikującego przyżyciowo tkankowe procesy fizjologiczne [10, 12]. Techniki te, oparte o ocenę odbywającego się w realnym czasie metabolizmu glukozy, utylizacji tlenu i wielkości przepływu krwi, umożliwiają ocenę procesów mających miejsce w tkance nowotworowej. Dotychczas tylko kilka metod uzyskało akceptację kliniczną w diagnozowaniu nowotworów. Należą do nich m.in. obrazowanie przy pomocy znakowanej izotopem promieniotwórczym fluorodeoksyglukozy, stosowane w pozytronowej tomografii emisyjnej (PET) oraz fotoobrazowanie z zastosowaniem absorpcji w bliskiej podczerwieni, zwane dyfuzyjną tomografią optyczną, która ocenia, jak poziom hemoglobiny koreluje z zaawansowaniem nowotworu [15]. Kolejna z technik – scyntymammografia – wykorzystuje promieniotwórczy technet ( $^{99m}\text{Tc}$  – Sestamibi), który podany dożylnie jest następnie identyfikowany przy pomocy gammakamery lub tomografii komputerowej opartej o emisję pojedynczego fotonu (SPECT). Chociaż scyntymammografia nie znalazła zastosowania w badaniach przesiewowych, służy do wykrywania komórek guza wykazujących oporność lekową i może być używana przy wyborze leczenia lub ocenie rokowania [16].

Szerszego wykorzystania ultrasonografii w diagnostyce raka piersi upatruje się w jej możliwościach oceny wielkości przepływu krwi i identyfikacji powierzchniowych receptorów komórkowych. Zastosowanie USG do oceny stopnia neoangiogenezy, jakkolwiek teoretycznie możliwe, wykazuje jednak niską selektywność w różnicowaniu przepływu pomiędzy zmianami łagodnymi a złośliwymi [17]. Więcej nadziei pokłada się w zastosowaniu USG w ocenie powierzchni komórek, dzięki zastosowaniu substancji dających wzmocnienie fali ultradźwiękowej [18].

### Molekularne procesy wzmocnienia sygnału

Szereg procesów biologicznych, takich jak transdukcja sygnału, regulacja cyklu komórkowego, oporność wielolekowa, angiogeneza, apoptoza i ekspresja telomerazy, mających kluczowe znaczenie w terapii nowotworów, może być identyfikowanych przy pomocy mapowania molekularnego.

Aby uwidocznić przebieg tych procesów, niezbędne jest stworzenie znaczników molekularnych, które penetrują bariery naczyniowe, tkankowe i komórkowe. W tym celu muszą one cechować się wysoką biokompatybilnością [13]. Wydaje się, że największą szansę powodzenia mają substancje testowe, które cechują się niskim ciężarem cząsteczkowym i działają w niskich stężeniach. Z tego powodu, że związki docelowe występują w stężeniach pikomolarnych lub niższych, znaczniki molekularne muszą być wysoce specyficzne. Dlatego też związki, takie jak przeciwciała lub białka rekombinowane rokują najlepsze efekty [10, 13]. Związki docelowe powinny występować w niskich stężeniach, aby znaczniki molekularne cechowały się wysoką siłą sygnału, lub aby po dołączeniu się do związku docelowego miały możliwość przyłączenia emitera sygnału [10, 19]. Taki sygnał może być emitowany w postaci promieniowania pochodzącego z radioizotopu, który byłby wykrywany w emisyjnej tomografii pozytronowej, miał atomy paramagnetyczne wykrywane przy pomocy rezonansu molekularnego

lub był substancją barwną uwidacznianą w obrazowaniu optycznym. Niektóre znaczniki niepromieniotwórcze wysyłają sygnał dopiero wtedy, kiedy zostaną biochemicznie *zaktywowane* po połączeniu się ze związkiem docelowym [19]. Takie aktywowane znaczniki obrazowe redukują poziom fałszywego odczytu, który jest zależny od niespecyficznego wiązania próbniaka. Znaczniki molekularne ujawniły różnorodność procesów występujących zarówno w nowotworach eksperymentalnych u zwierząt, jak i u ludzi. W raku piersi u ludzi, m.in. w raku piersi, umożliwiły identyfikację aktywności katepsyn B i H występujących w przestrzeniach pozakomórkowych, receptorów i fosfolipidów błonowych związanych z apoptozą białek oporności wielolekowej, a także onkogenów w jądrze komórkowym. Przykładowe metody obrazowania molekularnego procesów w raku piersi przedstawiono w tab. 1.

### Mapowanie procesów biologicznych

Poza istnieniem znaczników wiążących się ze związkami docelowymi i emitującymi specyficzny sygnał, techniki obrazowania molekularnego są w stanie odróżnić sygnał pochodzący ze znacznika od zakłóceń wynikających ze standardowej aktywności biologicznej tkanki lub narządu. Techniki te zostały przedstawione w tab. 2.

### Inne metody obrazowania

#### PET

Obrazowanie molekularne oparte o pozytronową tomografię emisyjną (PET) stosuje się w ocenie efektywności terapii w chorobach o podłożu molekularnym lub genetycznym. Technika ta wykorzystuje specyficzne znaczniki molekularne, które – oprócz zastosowania eksperymentalnego do śledzenia ekspresji genów u zwierząt – są używane do monitorowania terapii genetycznej u ludzi [10]. Podobnie jak PET, komputerowa tomografia emisji pojedyn-

**Tabela 1.** Obrazowanie molekularne procesów w raku piersi  
**Table 1.** Molecular imaging of processing in breast cancer

Akceptor lub proces docelowy	Znacznik diagnostyczny	Metoda obrazowa
nośnik glukozy (Glut 1) [20]	fluorodeoksyglukoza FDG	pozytronowa tomografia emisyjna – PET
heksokinaza 1 [20]	FDG	pozytronowa tomografia emisyjna – PET
oporność wielolekowa [21]	technet	tomografia emisyjna pojedynczego fotonu – SPECT
receptory estrogenowe (ERs) [22]	fluoroestradiol	pozytronowa tomografia emisyjna – PET
receptory wazoaktywnych peptydów jelitowych [23]	znakowane peptydy	SPECT/PET
kinaza tyrozyny MET [24]	HGF/SF	utlenowanie krwi/MRI
receptory Sigma 2 [25]	jodobenzamidyna	SPECT/PET
inhibitory EGFR [26]	izotop jodu	tomografia emisyjna pojedynczego fotonu – SPECT
glikoproteina mucyny 1 (MUC1) [27]	podjednostki przeciwciał	pozytronowa tomografia emisyjna – PET
aktywność proliferacyjna komórek [28]	fluorotymidyna (FLT)	pozytronowa tomografia emisyjna – PET
katepsyna D [29]	Cy-CDF-PGC	spektroskopia w bliskiej podczerwieni – NIRS
metaloproteinaza MMP2 [30]	C-PGC	spektroskopia w bliskiej podczerwieni – NIRS

**Tabela 2.** Obrazowanie molekularne w badaniach eksperymentalnych [10]\***Table 2.** Molecular imaging in experimental trials [10]\*

Technika obrazowania	Widmo	Rozdzielczość	Penetracja	Typ znacznika	Ilość znacznika	Koszt
pozytronowa tomografia emisyjna	wysoko-energetyczne promieniowanie gamma	5–8 mm	bez ograniczeń	radioizotop	nanogramy	++++
komputerowa tomografia emisji pojedynczego fotonu	niskoenergetyczne promieniowanie gamma	1–2 mm	bez ograniczeń	radioizotop	nanogramy	+++
bioluminescencja	światło widzialne	3–5 mm	1–2 cm	aktywowany	mikro-do miligramów	++
fluorescencja	światło widzialne lub bliska podczerwień	2–3 mm	<1 cm	aktywowany	mikro-do miligramów	+ – ++
rezonans magnetyczny	fale radiowe	25–100 $\mu$ m	bez ograniczeń	aktywowany	mikro-do miligramów	++++
tomografia komputerowa	promieniowanie RTG	50–200 $\mu$ m	bez ograniczeń	w badaniach	nie stosuje się	++
ultrasonografia	ultradźwięki	50–500 $\mu$ m	od mm do cm	ograniczenie aktywowany	mikro-do miligramów	++

\*Massoud TF, Gambhir SS – zmodyfikowana

czego fotonu (SPECT) jest techniką, która umożliwia funkcjonalną ocenę komórek, wykorzystując izotopy emitujące promieniowanie  $\gamma$  [31]. Uważa się, że PET jest bardziej użyteczna w obrazowaniu molekularnym, gdyż izotopy emitujące pozytrony stosowane w tym badaniu są łatwiej wbudowywane do znacznika. Znaczniki reagujące ze specyficznymi substancjami docelowymi stosowanymi w PET są łatwo syntetyzowane, modyfikowalne i markowane izotopowo [10]. Istnieją jednak ograniczenia wprowadzania obrazowania molekularnego PET do standardowego diagnozowania raka piersi, ze względu na wysoki koszt urządzeń, które cechują się relatywnie niską rozdzielczością i czułością. Tendencja do łączenia obrazowania molekularnego za pomocą PET z innymi metodami obrazowymi umożliwiającymi identyfikację anatomii rejonu, do którego został podany znacznik, zaczyna powoli przecierać drogę w procedurach diagnostycznych [32]. W ramach prób poprawy czułości i specyficzności metod prowadzone są także prace nad łączeniem różnorodnych technik w złożone zespoły wielofunkcyjne, np. PET z MRI, MRI z CT oraz technik optycznych z technikami radiologicznymi [15, 33].

### Rezonans magnetyczny

Obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI) zostało wprowadzone do diagnostyki obrazowej w latach 70., ale w raku piersi zaczęło być stosowane powszechnie w późnych latach 90. [34]. Mimo że znacznie mniej czułe niż PET lub techniki fotoobrazowania, było ono w stanie zyskać więcej zwolenników, z uwagi na większą rozdzielczość przestrzenną i równoczesne uwidocznienie zmian na poziomie molekularnym i anatomicznym [10, 13]. Znaczniki stosowane w MRI, oparte o przeciwciała lub inne substancje białkowe, są używane do uwidaczniania molekuł znajdujących się

na powierzchni komórek, włączając w to antygeny nowotworowe oraz białka apoptotyczne [26, 35, 36]. Znaczną innowacją w technice MRI było wprowadzenie znaczników zawierających gadolinium, paramagnetyku, który umożliwia uzyskanie lepszej jakości obrazów zmian nowotworowych oraz śledzenie dystrybucji znakowanych leków [34]. Aktywowane środki kontrastowe stosowane w MRI są używane do uwidocznienia procesów wewnątrzkomórkowych. Niestety, na obecnym etapie znaczniki te są używane jedynie w związkach docelowych o wysokiej masie cząsteczkowej. Istnieje nadzieja, że wkrótce zostaną one zastąpione przez związki łatwiej penetrujące błony komórkowe [13].

### Fotoobrazowanie

Fotoobrazowanie w czasie rzeczywistym, wykonywane z zastosowaniem różnorodnych znaczników, umożliwia monitorowanie procesów molekularnych zachodzących przyżyciowo. Najbardziej powszechne są techniki wykorzystujące znaczniki bioluminescencyjne, fluorochromy bliskiej podczerwieni i fluorescencyjne znaczniki białkowe o charakterze *red-shift* [10]. Zaletą znaczników bioluminescencyjnych emitujących wolne od tła światło jest możliwość ich wykrywania przy bardzo niewielkim natężeniu, ich wadą natomiast konieczność podawania dużej ilości znacznika, np. D-lucyferyny.

Chociaż znaczniki fluorescencyjne mają wyższy poziom zakłócającego tła, cechuje je możliwość stosowania zarówno przyżyciowo, jak i w materiale utrwalonym oraz uzyskiwanie obrazów bez znacznika [37].

Znaczniki fluorescencyjne, emitujące promieniowanie w bliskiej podczerwieni, mają najlepszą penetrowalność tkankową i najmniejszy poziom tła fluorescencyjnego [10]. Aktywowane znaczniki bliskiej podczerwieni są stosowane

*in vivo* do monitorowania katepsyny D – proteazy zewnątrzkomórkowej, która wykazuje podwyższoną aktywność w wielu guzach [10, 11]. Tomografia wykorzystująca fluorescencję jest ciągle we wczesnej fazie rozwoju, ale uważa się, że jeśli uzyska zdolności techniczne, będzie mogła dać lepsze rezultaty niż istniejące metody w bliskiej podczerwieni [10, 38]. Obecnie eksperymentuje się także z urządzeniami złożonymi łączącymi w sobie zdolności fluorescencyjne i bioluminescencyjne. Istnieje opinia, że w niedalekiej przyszłości obrazowanie optyczne na poziomie komórkowym, a zwłaszcza identyfikacja zmian w ekspresji genów, zostanie wprowadzone do diagnostyki i wyprze inne metody [13].

## Podsumowanie

W nowotworach piersi sukces terapeutyczny jest zależny od właściwej oceny zagrożenia chorobą, ryzyka nawrotu oraz wyboru postępowania leczniczego. Wykorzystanie biomarkerów w połączeniu ze wskaźnikami prognostycznymi, wyróżnionymi na podstawie badań histopatologicznych i doświadczeń klinicznych wydaje się racjonalnym sposobem osiągnięcia tego celu. Jakkolwiek rozmiar guza, stopień zaangażowania węzłów chłonnych, stopień zaawansowania, ocena histopatologiczna, hormonalna i receptorowa są akceptowanymi wykładnikami klasyfikacyjnymi, nie są one w stanie przyczynić się do wyboru optymalnej terapii ani przewidzieć skutków jej stosowania. Dążenie do wprowadzenia obiektywnych kryteriów prognostycznych i predykcyjnych jest i będzie motorem do tworzenia nowych technik molekularnych, prób identyfikacji oraz wykorzystania biomarkerów [39, 40].

Wdrożenie do praktyki klinicznej wyników badań eksperymentalnych w zakresie biomarkerów, obrazowania molekularnego oraz innych zaawansowanych technik badawczych wymaga jednak spełnienia określonych warunków [41]:

- wiarygodnej i powtarzalnej molekularnej oceny procesów patologicznych,
- stworzenia metodyki molekularnej dla procesów komórkowych *in vivo*, ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji genów oraz reakcji zachodzących między białkami,
- monitorowania procesów molekularnych występujących kaskadowo lub jednocześnie,
- identyfikacji komórek docelowych i ich migracji,
- odniesienia ingerencji farmakologicznej i genetycznej do obrazu molekularnego i komórkowego.

Do przewyciężenia pozostaje także wiele problemów natury technicznej i metodycznej, takich jak biokompatybilność, trudności w podawaniu substancji aktywnych i znaczników oraz wiarygodność identyfikacji wzmocnienia sygnału [42]. Pod względem nakładów finansowych, główne wysiłki są skoncentrowane obecnie na selekcji komórek docelowych oraz elementów subkomórkowych, wytwarzających nanomolarne lub pikomolarne ilości związków odpowiedzialnych za przekazywanie i wzmocnianie sygnału, na tworzeniu map szlaków molekularnych oraz na rozwoju systemu obrazowania umożliwiającego ich identyfikację [12]. Uważa się, że postęp w tych dziedzinach powinien zaowocować odkryciem nowych, celowanych na wewnątrzkomórkowe procesy molekularne leków, które w połącze-

niu z technikami obrazowych i immunologicznymi powinny umożliwić terapię adekwatną do podtypu nowotworu oraz eliminację toksyczności, jaką cechują się chemioterapeutyki [43]. Panuje opinia, że osiągnięcie tych zamierzeń będzie możliwe dzięki multidyscyplinarnym działaniom biologów molekularnych, specjalistów w dziedzinie obrazowania, specjalistów od nanotechnologii i onkologów, unifikujących wielodyscyplinarne pola działania w specjalizację kliniczną zwaną medycyną molekularną [8, 44].

## Piśmiennictwo

1. Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 31-6.
2. Porter DA, Krop IE, Nasser S, Sgroi D, Kaelin CM, Marks JR, Riggins G, Polyak K. A SAGE (serial analysis of gene expression) view of breast tumor progression. *Cancer Res* 2001; 61: 5697-702.
3. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 362-75.
4. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern Pathology* 2005; 18: 1027-33.
5. Petricoin EF 3rd, Hackett JL, Lesko LJ, et al. Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nat Genet* 2002; 32 Suppl: 474-9.
6. Kuo WP, Jenssen TK, Butte AJ, Ohno-Machado L, Kohane IS. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 2002; 18: 405-12.
7. Ahmed AA, Brenton JD. Microarrays and breast cancer clinical studies: forgetting what we have not yet learnt. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 96-9.
8. Ślubowski T, Ślubowska M, Wojciechowski A. Techniki diagnostyczne w raku piersi. Część III: Nowe metody biologiczne i genetyczne. *Ginek Pol* 2007; 78: 554-9.
9. Tilstone C. DNA microarrays: vital statistics. *Nature* 2003; 424: 610-12.
10. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003; 17: 545-80.
11. Tempny CM, McNeil BJ. Advances in biomedical imaging. *JAMA* 2001; 285: 562-7.
12. Weissleder RM. Molecular imaging: exploring the next frontier. *Radiology* 1999; 212: 609-14.
13. Brice J. Molecular imaging transports diagnosis to the next level. *Diagnostic Imaging Special Edition* 2001 (July): 8-15.
14. Rennstam K, Hedenfalk I. High-throughput genomic technology in research and clinical management of breast cancer. Molecular signatures of progression from benign epithelium to metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8: 213.
15. Ntziachristos V, Chance B. Probing physiology and molecular function using optical imaging: applications to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 41-6.
16. Kim IJ, Bae YT, Kim SJ, Kim YK, Kim DS, Lee JS. Determination and prediction of P-glycoprotein and multidrug-resistance-related protein expression in breast cancer with double-phase technetium-99m sestamibi scintimammography. Visual and quantitative analyses. *Oncology* 2006; 70: 403-10.
17. Esserman LJ. New approaches to the imaging, diagnosis, and biopsy of breast lesions. *Cancer J* 2002; 8 Suppl 1: S1-S14.
18. Lanza GM, Wickline SA. Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 2001; 44: 13-31.
19. Weissleder RM. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 1-8.
20. Buck AK, Schirrmeyer H, Mattfeldt T, Reske SN. Biological characterisation of breast cancer by means of PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31 Suppl 1: 80-7.

21. Chen WS, Luker KE, Dahlheimer JL, Pica CM, Luker GD, Piwnica-Worms D. Effects of MDR1 and MDR3 P-glycoproteins, MRP1, and BCRP/MXR/ABCP on the transport of (99m) Tc-tetrofosmin. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 413-26.
22. Linden HM, Stekhova SA, Link JM, et al. Quantitative fluoroestradiol positron emission tomography imaging predicts response to endocrine treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2793-9.
23. Thakur ML, Aruva MR, Garipey J, Acton P, Rattan S, Prasad S, Wickstrom E, Alavi A. PET imaging of oncogene overexpression using <sup>64</sup>Cu-vasoactive intestinal peptide (VIP) analog: comparison with <sup>99m</sup>Tc-VIP analog. *J Nucl Med* 2004; 45: 1381-9.
24. Shaharabany M, Abramovitch R, Kushnir T, et al. In vivo molecular imaging of met tyrosine kinase growth factor receptor activity in normal organs and breast tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 4873-8.
25. Tu Z, Dence CS, Ponde DE, Jones L, Wheeler KT, Welch MJ, Mach RH. Carbon-11 labeled sigma2 receptor ligands for imaging breast cancer. *Nucl Med Biol* 2005; 32: 423-30.
26. Fernandes C, Oliveira C, Gano L, Bourkoula A, Pirmettis I, Santos I. Radioiodination of new EGFR inhibitors as potential SPECT agents for molecular imaging of breast cancer. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 3974-80.
27. Schuhmacher J, Kaul S, Klivenyi G, et al. Immunoscintigraphy with positron emission tomography: gallium-68 chelate imaging of breast cancer pretargeted with bispecific anti-MUC1/anti-Ga chelate antibodies. *Cancer Res* 2001; 61: 3712-7.
28. Pio BS, Park CK, Pietras R, et al. Usefulness of 3-[F-18] fluoro-3-deoxythymidine with positron emission tomography in predicting breast cancer response to therapy. *Mol Imaging Biol* 2006; 8: 36-42.
29. Tung CH, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R. Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging. *Bioconjug Chem* 1999; 10: 892-6.
30. Weissleder RM, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A Jr. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 375-8.
31. Benard F, Turcotte E. Imaging in breast cancer: Single-photon computed tomography and positron-emission tomography. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 153-62.
32. Townsend DW, Cherry SR. Combining anatomy and function: the path to true image fusion. *Eur Radiol* 2001; 11: 1968-74.
33. Josephson L, Kircher MF, Mahmood U et al. Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes. *Bioconjug Chem* 2002; 13: 554-60.
34. Esserman L, Wolverton D, Hylton N. Magnetic resonance imaging for primary breast cancer management: current role and new applications. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 141-53.
35. Kang HW, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R, Bogdanov A Jr. Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjug Chem* 2002; 13: 122-7.
36. Remsen LG, McCormick CI, Roman-Goldstein S, et al. MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocrystalline iron oxide nanoparticles: the potential for noninvasive diagnosis. *Am J Neuroradiol* 1996; 17: 411-8.
37. Spergel DJ, Kruth U, Shimshek DR, Sprengel R, Seeburg PH. Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 673-86.
38. Hawrysz DJ, Sevcik-Muraca EM. Developments toward diagnostic breast cancer imaging using near-infrared optical measurements and fluorescent contrast agents. *Neoplasia* 2000; 2: 388-417.
39. Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 147-59.
40. Ślubowski T, Ślubowska M. Biomarkery w raku piersi. Część I. Receptory, czynniki wzrostu, geny i onkogeny. *Współcz Onkol* 2007; 11: 167-74.
41. 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.
42. Mahmood U, Weissleder R. Some tools for molecular imaging. *Acad Radiol* 2002; 9: 629-31.
43. Ślubowski T, Ślubowska M. Biomarkery w raku piersi. Część II. Markery białkowe, DNA, adhezji komórkowej i oporności lekowej. *Współcz Onkol* 2007; 11: 240-6.
44. Murphy N, Millar E, Lee CS. Gene expression profiling in breast cancer: towards individualising patient management. *Pathology* 2005; 37: 271-7.

#### 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