

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet. Markery nowotworowe wykazują przydatność w wykrywaniu, rozpoznawaniu oraz określeniu stopnia zaawansowania raka piersi. Są ponadto skuteczne w monitorowaniu chemioterapii lub radioterapii. Choć w diagnostyce raka piersi znalazło zastosowanie wiele markerów, m.in. CA 15-3 i CEA, nadal poszukuje się nowych, które byłyby pomocne we wczesnej diagnostyce, monitorowaniu leczenia oraz wykrywaniu wznowy nowotworów gruczołu piersiowego. W niniejszej pracy omówiono przydatność takich molekularnych markerów kancerogenezy, jak onkogeny i ich receptory oraz geny supresorowe. Markery te odgrywają znaczącą rolę w wykrywaniu nowotworu. Aktywność genów supresorowych bądź onkogenów jest badana za pomocą technologii mikromacierzy DNA – metody, która pozwala na szybką analizę ekspresji wielu genów podczas jednego eksperymentu.

Słowa kluczowe: rak piersi, markery nowotworowe, molekularne markery kancerogenezy, onkogeny, geny supresorowe, mikromacierze DNA.

Molekularne markery kancerogenezy wykorzystywane w diagnostyce i planowaniu terapii nowotworu gruczołu piersiowego

Molecular markers of carcinogenesis employed in diagnosis and planning of therapy in breast cancer

Szymon Zmorzyński¹, Bożenna Karczmarek-Borowska², Agata Filip¹

¹ Zakład Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² Oddział Chemioterapii, Podkarpackie Centrum Onkologii w Rzeszowie

Wstęp

Dostępne metody diagnostyczne służące do wykrywania nowotworów nie zawsze pozwalają określić wczesne stadium rozwoju guza, co skłania badaczy do poszukiwania alternatywnych technik diagnostycznych. W przebiegu procesów nowotworowych bardzo często dochodzi do ekspresji genów, które w fizjologicznych warunkach są nieaktywne. Jeżeli produkty tych genów zostaną uwolnione z komórki nowotworowej do płynów ustrojowych, mogą stać się markerami przydatnymi w rozpoznawaniu i monitorowaniu choroby nowotworowej [1]. Markery nowotworowe to substancje wielkocząsteczkowe (najczęściej białko z komponentą węglowodanową lub lipidową albo glikolipid) obecne we krwi, moczu lub związane z powierzchnią komórek nowotworowych, albo zarówno w komórce nowotworowej, jak i prawidłowej, jeżeli tylko ich wytwarzanie w nowotworze jest znacząco wyższe od wytwarzania w komórce prawidłowej [2]. Identyfikacja i ocena są pomocne w diagnozowaniu oraz monitorowaniu leczenia. Systematyczne wykonywanie oznaczeń wybranego markera może nierzadko umożliwić wykrycie wznowy przed jej stwierdzeniem za pomocą rutynowych metod obrazowania, takich jak: zdjęcia radiologiczne, ultrasonografia, rezonans magnetyczny czy tomografia komputerowa [3].

Poszukiwanie nowych markerów ma ogromne znaczenie w diagnostyce m.in. raka piersi, który w Polsce jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet. W 2005 r. z powodu tej choroby zmarło 5112 kobiet, odnotowano 13 385 nowych zachorowań, a liczba ta z roku na rok wzrasta (dane uzyskane z Krajowego Rejestru Nowotworów). Najczęstszym typem histologicznym raka gruczołu piersiowego jest rak przewodowy (80%), drugim pod względem częstości rak zrazikowy (5–10%). Pozostałe postacie stanowią ok. 10% przypadków [4].

Choć zidentyfikowano wiele czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka piersi, u większości chorych (75–80%) nie stwierdza się żadnego czynnika mogącego mieć wpływ na zwiększenie ryzyka zachorowania. Do istotnych czynników ryzyka raka piersi należą: rodzinne predyspozycje (rak piersi u krewnych w I stopniu powinowactwa zwiększa ryzyko 3-krotnie), czynniki genetyczne (np. mutacje w obrębie genu *BRCA1* oraz *BRCA2* zwiększają ryzyko do 80%), łagodne przerosty piersi z proliferacją (np. z hiperplazją wewnątrzprzewodową), aktywność hormonalna (pierwsza miesiączka przed 12. rokiem życia lub menopauza powyżej 55. roku życia), egzogenne hormony płciowe, promieniowanie jonizujące, otyłość, alkohol oraz palenie tytoniu [5].

The most frequent cancer among women is breast cancer. Tumour markers may be helpful in the early diagnosis of breast cancer and the initial assessment of the extent of the disease, as well as in monitoring tumour growth or volume reduction and a recurrence of the cancer. They have also been used for monitoring the clinical course of chemotherapy and radiotherapy. Many tumour markers may be used in the diagnosis and monitoring of breast cancer, for example CA 15-3 or CEA. In this paper we focus on the role of molecular carcinogenesis markers such as oncogenes, their receptors and tumour suppressor genes in breast cancer diagnosis. The activity of genes in breast cancer may be investigated by DNA microarrays. This method allows the expression of many genes to be analyzed in a single experiment quickly and efficiently.

Key words: breast cancer, tumour markers, molecular markers of carcinogenesis, oncogenes, suppressor genes, DNA microarrays.

Wyniki leczenia zależą m.in. od stopnia zaawansowania raka piersi. Największe szanse na całkowite wyleczenie mają chore w I stopniu zaawansowania, najmniejsze w stopniu IV [6]. Wykrycie nowotworu, szczególnie we wczesnym stadium, jest jednym z najważniejszych zadań współczesnej diagnostyki onkologicznej [7].

W wykrywaniu nowotworu oprócz klasycznych metod obrazowania stosuje się metody alternatywne, np. połączenie pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) z tomografią komputerową (CT) wykonywanej przy użyciu (¹⁸F)-fluorodeoksyglukozy. Technika obrazowania PET/CT znajduje coraz szersze zastosowanie w rozpoznawaniu i monitorowaniu raka piersi oraz pozwala wykryć nawrót lub obecność przerzutów raka piersi we wczesnym stadium. W przypadku klinicznego podejrzenia wznowy w badaniu PET/CT stwierdza się cechy aktywnego procesu nowotworowego, podczas gdy inne wyniki wykonywanych równoległe badań konwencjonalnych są ujemne [8]. Zastosowanie fuzji obrazów PET/CT umożliwia znacznie wcześniejsze wykrycie przerzutów do kości w raku piersi niż w przypadku zastosowania wyłącznie PET [9].

Markery nowotworowe

W nowotworach złośliwych podjęcie wczesnego i właściwego postępowania terapeutycznego daje duże szanse całkowitego wyleczenia. Zastosowanie markerów nowotworowych może pozwolić na wcześniejsze niż dotychczas uchwycenie rozwoju procesu nowotworowego, a tym samym obniżyć wysoką śmiertelność chorych na raka piersi [10, 11].

Obecnie w diagnostyce raka piersi wykorzystuje się następujące markery nowotworowe: CA 15-3 (ang. *cancer antigen 15-3*) [12], CEA (ang. *carcinoembryonic antigen*) i katepsynę D [5]. Trwają intensywne badania nad wykorzystaniem innych markerów, m.in. TAG 12 (glikoproteina towarzysząca nowotworom 12, ang. *tumour associated glycoprotein 12*) [13], MSA (surowiczy antygen piersi, ang. *mammary serum antigen*) [14] oraz TPS (antygen tkankowo-specyficzny, ang. *tissue polypeptide – specific antigen*) [15]. Zwrócono również uwagę na cytokiny wydzielane przez komórki raka piersi, np. IL-6 (interleukina 6) [16], IL-11 (interleukina 11) [17], IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1, ang. *insulin-like growth factor 1*), IGF-1R (receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu) [18], TGF- β 1 (transformujący czynnik wzrostu β 1, ang. *transforming growth factor β 1*) [19], VEGF (naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, ang. *vascular endothelial growth factor*) [20] i EGF (naskórkowy czynnik wzrostu, ang. *epidermal growth factor*) [21]. Zaobserwowano ponadto ekspresję receptorów dla M-SCF (czynnika stymulującego kolonie makrofagowe, ang. *macrophage-colony stimulating factor*) oraz autokrynne wytwarzanie hematopoetycznych czynników wzrostu (HGFs, ang. *hematopoietic growth factors*) przez komórki nowotworowe raka piersi [2].

Molekularne markery kancerogenezy

Wymienione powyżej markery nowotworowe nie pozwalają na wykrycie mniejszych zmian ogniskowych raka piersi, dlatego duże nadzieje wiąże się z molekularnymi markerami kancerogenezy, dzięki którym można wykryć zmiany w funkcjonowaniu genów związanych z kontrolą cyklu komórkowego jeszcze przed stwierdzeniem w komórkach jakichkolwiek zmian histologicznych o charakterze nowotworowym. Szybki i niekontrolowany wzrost jest charakterystyczny dla cyklu rozwojowego komórek nowotworowych [22], a podstawę rozwoju większości nowotworów stanowi niestabilność genomu komórek inicjujących rozwój guza [3].

Onkogeny i ich receptory

Badania molekularne doprowadziły do wykrycia i zidentyfikowania ok. 150 genów związanych z kancerogenezą, większość z nich koduje białka regulujące cykl komórkowy, różnicowanie i apoptozę [23]. Wiele zmian molekularnych, głównie mutacji, może zaburzać funkcje onkogenów (protoonkogenów), czyli genów warunkujących prawidłowy wzrost komórki, prowadząc

do ich nadmiernej ekspresji [24]. W guzach nowotworowych piersi zaobserwowano zjawisko powstawania wielu kopii, czyli amplifikacji niektórych onkogenów lub nadmiernej ekspresji odpowiadającego im mRNA oraz produktów białkowych. Zjawisko to często wiąże się ze zwiększeniem złośliwości guza nowotworowego i tym samym ze złym rokowaniem [23]. Do najczęściej opisywanych onkogenów ulegających powtarzalnym zaburzeniom w raku piersi należą *C-MYC*, *N-MYC* i *C-ERB (HER2/neu)* [25].

Jednym z najlepiej poznanych onkogenów jest *C-ERB (HER2/neu)*. W nowotworach ludzkich obserwuje się zwiększoną ekspresję genów *C-ERBB1* i *C-ERBB2*. Onkogen *C-ERBB2* jest zlokalizowany na ramieniu dłuższym chromosomu 17 (17q21), a jego zwiększoną ekspresję stwierdza się w ok. 20–30% nowotworów piersi [26]. Istnieje zależność między aktywnością tego onkogenu a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, wczesnymi nawrotami i krótkim czasem przeżycia [27].

Jako markery prognostyczne oceniane w biopsjach raka piersi wykorzystuje się receptory HER1 i HER2 będące białkami kodowanymi przez geny z rodziny *EGFR*. HER1 i HER2 należą do receptorów kinazy tyrozynowej [28]. Onkogenne kinazy tyrozynowe (ang. *oncogenic tyrosine kinases* – OTK) uczestniczą w przesyłaniu sygnałów związanych z podstawowymi funkcjami komórki, w tym ze wzrostem, podziałem, migracją i apoptozą. Wskutek działania czynników genotoksycznych, w tym leków przeciwnowotworowych, powstają uszkodzenia DNA będące przyczyną zahamowania podziałów, a w konsekwencji śmierci komórek nowotworowych. Onkogenne kinazy tyrozynowe chronią komórki nowotworowe przed śmiercią [29]. Pobudzenie receptorów HER powoduje stymulację podziału komórki nowotworowej i często towarzyszy zwiększonej ilości VEGF jako głównego czynnika naczyniotworzenia w obrębie guza nowotworowego. Ekspresja receptorów HER, a szczególnie HER2, jest parametrem niezależnym od stopnia zaawansowania raka piersi. Zabłokowanie receptora HER2 – przez podanie przeciwciała blokującego ten receptor – u chorych z wysoką ekspresją skutkuje lepszym rokowaniem i dłuższym czasem przeżycia [6]. Nadexpresja HER2 może wiązać się również z opornością na terapię hormonalną [30].

W raku piersi rutynowo bada się obecność receptorów estrogenowych (ER) oraz progesteronowych (PgR). Obecność receptorów ER i/lub PgR zwiększa proliferację komórek nowotworowych raka piersi. Włączenie do leczenia antyestrogenów lub inhibitorów aromatazy prowadzi do obniżenia biologicznego wpływu estrogenów na nowotwór. Metaanaliza wykazała korzyści z leczenia uzupełniającego tamoksyfenem u chorych, u których stwierdzono obecność receptorów estrogenowych. Dotyczy to szczególnie starszych chorych, u których wprowadzenie tradycyjnej chemioterapii wiązałoby się z wieloma działaniami niepożądanymi [32]. U ok. 60% chorych na raka piersi stwierdza się obecność zarówno ER, jak i PgR. U 20% chorych obserwuje się występowanie jednego z receptorów, a u pozostałych 20% receptory te nie występują [5].

Zaburzenia mechanizmu apoptozy – fizjologicznie programowanej śmierci komórek – odgrywają istotną rolę w procesie inicjacji i postępie procesu nowotworzenia, jak również w odpowiedzi na leczenie. W wielu nowotworach regulujące procesy apoptozy geny z rodziny *BCL2* (ang. *B-cell leuke-*

mia/lymphoma 2) wykazują zmiany ekspresji, które mogą być interpretowane jako prognostyczny biomarker procesów złośliwych [33]. Rodzina protoonkogenów *BCL2* odgrywa dominującą rolę w kontroli ciągu wydarzeń prowadzących do powstania nowotworu [24]. Od czasu identyfikacji w 1984 r. genu *BCL2* zlokalizowanego na chromosomie 22 (q11), kodującego białko antyapoptotyczne BCL2 [22], opisano całą grupę genów homologiczną do *BCL2*, które mogą być także wykorzystywane jako potencjalne molekularne markery. Geny te kodują zarówno białka hamujące apoptozę (BCL2, BCL-XL, A1), jak i białka promujące lub przyspieszające apoptozę (BAX, BCL-XS, BAD, BAK, BIK/NBK, BID, BAG1). W stanie równowagi względny bilans aktywności między czynnikami pro- i antyapoptycznymi podlega ścisłej kontroli, m.in. przez białko TP53. Białka te wykazują specyficzny tkankowo poziom aktywności, indukujący lub hamujący apoptozę. Z ekspresją genu *BCL2* związana jest także możliwość przewidywania skutków terapii hormonalnej i/lub cytotoksycznej [34].

Istnieje liczna grupa innych onkogenów, którym przypisuje się rolę w wywoływaniu raka piersi. Około 16% źle rokujących nowotworów piersi wykazuje amplifikację genu *C-MYC* [35], zlokalizowanego na chromosomie 8 w pobliżu miejsca łamliwego (8q24). Gen ten koduje białko jądrowe (MYC) stymulujące podziały komórkowe oraz biorące udział w replikacji, różnicowaniu i apoptozie. Białko MYC wraz z białkiem MAX tworzą heterodimer, pełniący rolę czynnika transkrypcyjnego dla genów kontrolujących wzrost i różnicowanie komórki oraz apoptozę. Aktywacja onkogenu w raku piersi zachodzi w wyniku pęknięć chromosomu 8 w pozycji 8q24, co prowadzi do translokacji fragmentu chromosomu 8 na chromosom 14. Z kolei mutacja genu *N-MYC* odpowiedzialnego za wzrost komórki prowadzi do jego stałej aktywacji. Przy okazji omawiania molekularnych markerów należy wspomnieć o białku JAB1, które odpowiada za proliferację komórek w inwazyjnych nowotworach piersi [36].

Geny supresorowe

Geny chroniące komórkę przed przekształceniem w komórkę nowotworową noszą nazwę genów supresorowych (antyonkogenów). Do wzrostu aktywności onkogenów i rozwoju guza nowotworowego w niektórych przypadkach prowadzi utrata funkcji genów supresorowych, np. poprzez mutacje. W przeciwieństwie do onkogenów, geny supresorowe nie są genami dominującymi. Mogą ulegać mutacjom w komórkach rozrodczych i dlatego są związane z dziedzicznymi postaciami nowotworów [24].

Nowotwory uwarunkowane genetycznie różnią się od nowotworów sporadycznych m.in. przebiegiem klinicznym i odpowiedzią na zastosowane leczenie. Przedmiotem szczególnego zainteresowania klinicystów i biologów stały się geny supresorowe *BRCA1* i *BRCA2* związane z rozwojem raka piersi [37]. Białka kodowane przez te geny uczestniczą w procesach komórkowych, a w szczególności wpływają na naprawę DNA i regulację transkrypcji w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Białka *BRCA1* i *BRCA2* są niezbędne do zachowania stabilności chromosomów oraz oddziałują z wieloma proteinami uczestniczącymi w naprawie DNA (RAD51, RAD 52, PIR 54) i procesie apoptozy (BAX, BCL-2, P52) [38]. Gen *BRCA1* został zmapowany na chromosomie 17 (17q21) w 1990 r. jako

mający związek z dziedzicznym, wcześniej występującym rakiem piersi oraz z dziedzicznym rakiem jajnika. U chorych z mutacją w tym genie guz nowotworowy charakteryzuje się wysokim stopniem złośliwości histologicznej. Mutacje genu *BRCA1* obserwuje się u 75% rodzin, w których występują zarówno nowotwory piersi, jak i jajnika, oraz u 50% rodzin, w których występuje wyłącznie rak piersi. Wkrótce po zmapowaniu genu *BRCA1* odkryto lokalizację drugiego genu *BRCA2* na chromosomie 13 (13q12-q13). Mutacje *BRCA1* i *BRCA2* odpowiadają za ponad 60% wszystkich dziedzicznych raków piersi. Niestety, istnieje także relatywnie duży procent (10–15%) fałszywie ujemnych wyników badań mutacji *BRCA1*, utrudniający proces identyfikacji pacjentów z grupy ryzyka. Należy podkreślić, że negatywny wynik badania genetycznego w kierunku *BRCA1* nie wyklucza ryzyka istnienia mutacji w obrębie badanych genów. W Polsce najczęściej występujące mutacje *BRCA1* dotyczą egzonu 20 (5382insC), 5(C61G) i 11(4153delA) i te są badane rutynowo [39]. Mutacje w innym obszarze mogą pozostać niewykryte. U kobiet z mutacjami w obrębie *BRCA1* i *BRCA2* ryzyko wystąpienia nowotworu zwiększa się wraz z wiekiem. Jeżeli dojdzie do wykrycia raka w stadium I lub II, w przypadku nosiciela mutacji *BRCA1* zaleca się obustronną amputację piersi – mastektomię [37].

Genem supresorowym, który ulega najczęściej mutacjom w różnych nowotworach u człowieka, jest gen *TP53* umiejscowiony w chromosomie 17 (17p13) [21]. Gen ten zawiera 11 egzonów, z których pierwszy nie koduje sekwencji białka, a ok. 98% mutacji pojawia się między piątym a ósmym egzonom. Obecność mutacji genu *TP53* obserwuje się w ponad 50% raków piersi. Występowanie zaburzeń w obrębie tego genu wiąże się na ogół z brakiem receptorów estrogenowych i z gorszym rokowaniem. W około połowie tych przypadków stwierdza się jednocześnie amplifikację onkogenów *C-MYC*, *C-ERBB2* i/lub *INT2* [23]. Gen *TP53* odpowiada za kodowanie wielofunkcyjnego białka (*TP53*) wiążącego DNA, biorącego udział w hamowaniu cyklu komórkowego, procesach naprawczych DNA, a także różnicowaniu i apoptozie. W raku piersi wskaźnik mutacji *TP53* jest niższy niż w innych nowotworach nabłonkowych i łączony z bardziej agresywnymi postaciami choroby oraz ze skróceniem czasu przeżycia. Praktyczne wykorzystanie *TP53* jako markera prognostycznego jest jednak ograniczone ze względu na brak powtarzalności wyników uzyskiwanych za pomocą badań immunohistochemicznych (IH) w porównaniu z metodami molekularnymi. Ze względu na wysoki procent fałszywie dodatnich, jak i ujemnych wyników badań IH w porównaniu z oceną sekwencji genowych nie jest możliwe wprowadzenie testów IH do wiarygodnej identyfikacji mutacji *TP53* w raku piersi. Wadą badania IH jest brak standaryzacji i trudność w porównywaniu wyników w różnych pracowniach. W przypadku uzyskania za pomocą badania IH wybitnie dodatniego wyniku istnieje zgodność z wynikiem oznaczenia metodą molekularną, np. techniką FISH, która pozwala wykryć amplifikację badanego genu. Spośród chorych, u których za pomocą badania IH uzyskano wynik słabo dodatni, u dużej części wynik badania testem FISH jest ujemny. Z tego powodu za dodatni wynik badania IH uznawany jest wynik silnie dodatni (3+) [5].

Spośród trzech genów rodziny *RAS* (*rat-adenosarcoma*) odpowiedzialnych za transdukcję sygnału, gen *HRAS* (zlokalizowany na chromosomie 11p15) jest związany z progresją raka piersi [24]. Z kolei geny *C-FOS* (chromosom 14q21) i *C-JUN* (chromosom 22q13) – odpowiedzialne za aktywację białka AP-1 oraz genu *C-MYB* (chromosom 6q21) – wykazują wartość predykcyjną w ocenie nawrotowego raka piersi, reakcji na leczenie hormonalne i okresu przeżycia [40].

Jako molekularne markery kancerogenezy wykorzystywane są także inne geny supresorowe, takie jak *MDM2*, *RB* oraz *PTEN* [22]. Gen *MDM2* koduje białko, które wiąże się z genem *TP53*, doprowadzając do eliminacji *TP53* jako czynnika hamującego wzrost nowotworów. W raku piersi amplifikacja *MDM2* jest relatywnie rzadka i wynosi ok. 5,7%. Nadekspresję tego genu wiąże się ze złym rokowaniem zarówno u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i u chorych bez tych przerzutów. Zaburzenia ekspresji genu supresorowego RB (retinoblastoma) i odpowiadającego mu białka występują w ok. 10–20% pierwotnych nowotworów piersi. Marker ten nie wykazuje jednak wartości prognostycznej zarówno w odniesieniu do wznowy, jak i okresu przeżycia. Z kolei *PTEN* jest jednym z genów najczęściej ulegających mutacjom w nowotworach u ludzi. Jego mutacje w komórkach rozrodczych wiążą się z wrodzoną predyspozycją do raka piersi, a utrata aktywności tego genu w raku piersi wiąże się ze złym rokowaniem. Białko PTEN hamuje aktywność kinazy proteiny, ogranicza działanie genu *MDM2*, a wpływając promiennie na funkcjonowanie *TP53*, powoduje wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię [41].

Zastosowanie technologii mikromacierzy

W ludzkim genomie więcej niż 95% genów jest nieaktywnych transkrypcyjnie. W chorobach nowotworowych profile ekspresji genów mogą mieć odniesienie do funkcji komórki, typu procesów biochemicznych, aktywności proliferacyjnej i mechanizmów regulacyjnych [42]. Ekspresja określonych genów supresorowych lub onkogenów ma znaczący wpływ na wybór leczenia w przypadku konkretnych pacjentów. Ocena profili DNA, białek, a przede wszystkim mRNA w materiale biologicznym guzów i płynów ustrojowych stała się możliwa dzięki znacznemu postępowi w metodach genetyki molekularnej, czego wynikiem było powstanie techniki mikromacierzy. Może ona służyć do oceny ekspresji genów, tzn. do ilościowej oceny produktu pośredniego danego genu – mRNA.

Klasyczne metody badań molekularnych pozwalają na badanie ekspresji niewielkiej liczby genów. Wprowadzona stosunkowo niedawno technika mikromacierzy (*DNA chips*, *microarrays*) umożliwia określenie ekspresji dziesiątków tysięcy genów w trakcie pojedynczego testu. Pozwala to na prowadzenie analiz np. mRNA w krótkim czasie oraz z dużą dokładnością. Idea działania mikromacierzy jest prosta i wywodzi się bezpośrednio z tradycyjnych metod analizy ekspresji genów. Typowy eksperyment wykorzystujący mikromacierze obejmuje umieszczenie sond cDNA na podłożu, izolację materiału biologicznego, mRNA i jego wyznaczenie, syntezę cDNA na matrycy mRNA, hybrydyzację otrzymanego cDNA do sond cDNA znajdujących się na mikromacierzy oraz zebranie i analizę wyników [43].

Badania nowotworów piersi przy zastosowaniu mikromacierzy DNA zawierających ponad 8000 cDNA wykazały istnienie grup raka znacznie różniących się profilem nowotworowym [44]. Badania te doprowadziły do wyróżnienia w raku piersi podtypów luminalnego, bazalnego i HER2 z wyraźnymi różnicami w rokowaniu i odpowiedzią na leczenie.

Największą grupę stanowią nowotwory o profilu komórek warstwy wewnętrznej gruczołu piersiowego (typ luminalny – odzwierciedlający różnicowanie komórek warstwy wewnętrznej gruczołu piersiowego – *luminal cells*) wykazujące ekspresję genów dla komórek luminalnych: cytokreatyn 8/18 i receptorów estrogenowych. W badaniu klinicznym *Carolina Breast Cancer Study* raki luminalne stanowiły 67% guzów [45]. Badanie profili ekspresji genów wykazało, że wśród guzów estrogenozależnych można wyróżnić dwa podtypy, luminalny A i B, różniące się rokowaniem [46]. Mimo że typ luminalny należy do grupy o dobrym rokowaniu, to jednak podtyp B ma zwykle wyższy stopień złośliwości i wiąże się z gorszą prognozą. Guzy o niskim współczynniku wznowy należą do podtypu luminalnego A, a o wysokim współczynniku do podtypu luminalnego B. W związku z tym raki luminalne A mogą być skutecznie leczone hormonalnie, podczas gdy guzy luminalne B wymagają leczenia chemicznego i/lub w połączeniu z hormonoterapią. Chorzy z guzami luminalnymi B osiągają większą korzyść przy zastosowaniu inhibitorów aromatazy niż tamoksyfenu [46]. Ostatnio wykazano, że bewacizumab w połączeniu z paklitaksem zwiększa przeżycie w przerzutowym raku piersi [47]. Stwierdzono, że 60% chorych wykazywało ekspresję receptorów hormonalnych i u żadnej chorej nie zaobserwowano ekspresji HER2. Sugeruje to, że leczenie antyangiogenne w podtypach luminalnych może być skuteczne [44].

Druga, mniejsza grupa to nowotwory o profilu komórek warstwy podstawnej: cytokreatyn 5/6, cytokreatyny 17, integryny $\beta 4$ i lamininy. W podtypie podstawnopodobnym (*basal-like*) obserwuje się brak ekspresji ER oraz niską ekspresję HER2 i genu *BRCA1* [44]. Guzy podstawnopodobne charakteryzują się wyższym stopniem złośliwości histologicznej (G III) [46]. W badaniu Careya i wsp. guzy podstawnopodobne stanowiły 20% i występowały częściej u kobiet pochodzenia afroamerykańskiego przed menopauzą (39%) [48]. Badania potwierdziły, że ten podtyp związany jest ze złym rokowaniem [46]. W przypadku ujemnych 3 receptorów (ER, PR, HER2) rak piersi nie jest wrażliwy na leczenie hormonalne ani leczenie trastuzumabem. Oznacza to, że chemioterapia stanowi najlepszą formę leczenia. W dwóch niezależnych badaniach zaobserwowano lepszą odpowiedź na chemioterapię opartą na antracyklinach lub w połączeniu z taksanami [48, 49]. Badania przedkliniczne sugerują, że ten typ raka może być związany ze zwiększoną ekspresją receptora naskórkowego czynnika wzrostu [50]. Dotychczas żadna strategia terapeutyczna nie została jeszcze klinicznie potwierdzona [51].

Trzecia grupa nowotworów jest zbliżona do typu podstawnego i charakteryzuje się ekspresją HER2 i genów spokrewnionych. Przypisanie guza do podtypu HER2 na podstawie analizy mikromacierzy nie powinno być mylone z guzami HER2-dodatnimi ocenianymi metodą immunohistochemiczną lub za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* [51].

Większość guzów klasyfikowanych klinicznie jako HER2 należy jednak do podtypu HER2. Nie stwierdzono związku między podtypem HER2 a znanymi czynnikami ryzyka [48]. Guzy te należą do grupy nisko zróżnicowanych, o wyższym stopniu zaawansowania oraz nie wykazują ekspresji receptorów hormonalnych. Dwukrotnie częściej stwierdzono zajęcie węzłów chłonnych pachowych niż w guzach luminalnych A [48]. Badania wykazały, że mimo złego rokowania ten podtyp jest wrażliwy na leczenie antracyklinami i taksanami wspierane trastuzumabem [49]. Niestety, nie wszystkie przypadki HER2-dodatnie odpowiadają na trastuzumab. Utrata genu *PTEN*, jego wyłączenie oraz zwiększenie aktywności *CXCR4* wiąże się z opornością na trastuzumab [49].

Czwarta, a zarazem ostatnia, grupa nowotworów wykazuje profil zbliżony do prawidłowego gruczołu piersiowego [52]. Należy podkreślić, iż technika mikromacierzy DNA została użyta również do rozróżnienia guzów związanych z mutacjami w genach *BRCA1* i *BRCA2* oraz do określenia receptora estrogenowego i stanu węzłów chłonnych pachowych. Poznanie różnic we wzorze ekspresji setek genów może służyć jako narzędzie ułatwiające klasyfikację histologicznie niezróżnicowanych nowotworów, wykazujących jednak różnice w przebiegu klinicznym. Dzięki możliwości jednoczesnej analizy aktywności praktycznie wszystkich genów uzyskuje się obraz działania danego czynnika na organizm. W ten sposób można identyfikować nowe potencjalne kancerogeny oraz wyjaśniać mechanizmy ich działania [53].

O skuteczności metod diagnostycznych z wykorzystaniem mikromacierzy świadczyć mogą badania pacjentek z nowotworem piersi niewrażliwym na hormony. W badaniach tych zastosowano macierz zawierającą sondy cDNA dla ponad 25 tys. ludzkich genów. Przygotowano cDNA o długości od 200 do 1100 par zasad, wśród nich m.in. sondy specyficzne dla 32 genów o znanym, stałym poziomie ekspresji, by za ich pomocą znormalizować intensywność uzyskanych sygnałów. Z jednymi sondami cDNA hybrydyzowano próby pobrane ze zdrowej tkanki, a z innymi sondami cDNA próby z 20 zróżnicowanych nowotworów. Dziesięć próbek guzów pochodziło od pacjentek, które przeżyły bez nawrotu choroby przez ponad 5 lat (5y-S), dziesięć zaś od pacjentek, które zmarły w ciągu 5 lat po operacji (5y-D). W ten sposób zidentyfikowano 257 genów o podwyższonej i 378 genów o obniżonej ekspresji w tkance zdrowej w porównaniu z tkanką zmienioną nowotworowo. Przeanalizowano także różnice w ekspresji genów między grupami 5y-S i 5y-D. Ustalono, że próbki tkanki nowotworowej pobrane od pacjentek o odmiennym przebiegu choroby różniły się znacząco – znaleziono 71 genów o zdecydowanie większej ekspresji w grupie 5y-D oraz 15 genów o większej ekspresji w grupie 5y-S. U pacjentek z niepomyślnym przebiegiem choroby podwyższonej aktywności ulegały geny zaangażowane we wzrost i tworzenie przerzutów, obniżała się natomiast ekspresja genów związanych z naprawą materiału genetycznego i przekazywaniem sygnału w komórce. W celu sprawdzenia wiarygodności wyników porównano dodatkowo poziomy aktywności wybranych 18 genów innymi metodami stosowanymi w biologii molekularnej. Po uzyskaniu zgodnych rezultatów zidentyfikowane geny potraktowano jako markery pozwalające skonstruować macierz diagnostyczną. Jej zastosowanie podniosło trafność rokowań do 90% [54].

Obecnie nie wiadomo, czy technika mikromacierzy będzie miała charakter uniwersalny, przynoszący korzyść w doborze terapii dla wszystkich pacjentów. Badania te – jako testy prognostyczne – mogą jednak otworzyć drogę do zastąpienia taksonomią molekularną obecnie stosowanych klasyfikacji klinicznych opracowanych na podstawie cech fenotypowych guzów.

Podstawowym problemem, na jaki napotyka diagnozowanie i leczenie chorych z rakiem piersi, jest identyfikacja wczesnego stadium rozwoju tej choroby. Postęp, który nastąpił w ostatnim czasie w zakresie biologii molekularnej, stwarza realne możliwości opracowania wielu metod diagnostycznych służących przede wszystkim do wczesnego wykrywania raka piersi oraz diagnozowania pacjentów z minimalnym ryzykiem nawrotu choroby.

Piśmiennictwo

- Kulpa J. Diagnostyka biochemiczna chorób nowotworowych. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Dembińska-Kieć A i Naskalski JW (red.). Urban & Partner, Wrocław 2002; 853-83.
- Ławicki S, Mroczo B, Szmikowski S. Markery nowotworowe raka piersi. *Post Hig Med Dośw* 2004; 58: 292-300.
- Paduch R, Klatka J. Markery nowotworowe. *Onkol Pol* 2003; 2: 77-82.
- Sasco A. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? *APMIS* 2001; 109: 321-32.
- Onkologia kliniczna. Krzakowski M (red.). Tom II. Wyd. I. Borgis, Warszawa 2001; 87-139.
- Pieńkowski M. Rak piersi. W: *Onkologia kliniczna. Krzakowski M (red.). Tom II. Borgis, Warszawa 2001; 87-139.*
- Budner M, Ruhland F, Przybylski M, Spaczyński M. Diagnostyka wczesnych stanów przedrakowych oraz raka piersi. *Współcz Onkol* 2002; 6: 288-99.
- Ziółkowska E, Łożyńska-Podhrebela D, Zarzycka M, Małkowski B. Badanie PET/CT w kompleksowej ocenie pacjentki po leczeniu raka piersi – opis przypadku. *Współcz Onkol* 2007; 11: 89-91.
- Uematsu T, Yuen S, Yukisawa S. Comparison of FDG PET and SPECT for detection of bone metastases in breast cancer. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 1266-73.
- Rożnowski K, Litwiniuk M, Komarnicki M. Wykrywanie i znaczenie kliniczne mikroprzerzutów raka piersi do szpiku kostnego. *Współcz Onkol* 2002; 6: 374-82.
- Cheung KL, Evans AJ, Robertson JF. The use of blood tumor markers in the monitoring of metastatic breast cancer unassessable for response to systematic therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 67: 273-8.
- Canizares F, Sola J, Perez I, Tovar L, Salinas J, Penafiel R, Martinez P. Preoperative values of CA 15-3 and CEA as prognostic factors in breast cancer: a multivariate analysis. *Tumour Biol* 2001; 22: 273-81.
- Heinze T, Lichtenegger W. Tumor associated glycoprotein (TAG) 12: a new tumor markers in breast cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 5049-52.
- Heinze T, Schurenkamper P, Minguillon C, Lichtenegger W. Mammary serum antigen (MSA), CA 549, CA 15-3 and CEA in breast cancer: preoperative sensitivity and correlation to prognostic factors. *Anticancer Res* 1997; 17: 2953-54.
- Renehan AG, Jones J, Potten CS, Shalet SM, O'Dwyer ST. Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 1344-50.
- Zhang GJ, Adachi I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 1427-32.
- Lacroix M, Siwek B, Marie PJ, Body JJ. Production and regulation of interleukin-11 by breast cancer cells. *Cancer Lett* 1998; 127: 29-35.
- Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Andò S, Surmacz E. Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 6747-54.
- Sheen-Chen SM, Chen HS, Sheen CW, Eng HL, Chen WJ. Serum levels of transforming growth factor beta I in patients with breast cancer. *Archiv Surgery* 2001; 136: 937-40.
- Findeisen R, Albrecht S, Richter B, Deutschmann K, Zimmerman T, Distler W. Chemiluminometric determination of tissue polypeptide antigen (TPA), cancer antigen 15-3 (CA 15-3), carcinoembryonic antigen (CEA) in comparison with vascular endothelial growth factor (VEGF) in follow-up of breast cancer. *Luminescence* 2000; 15: 283-9.
- Price JT, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D, Thompson EW. Epidermal growth factor promotes MDW-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C – dependent mechanism. *Cancer Res* 1999; 59: 5475-8.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097-9.
- Będkowska GE, Ławicki S, Szmikowski M. Markery nowotworowe przydatne w diagnostyce i monitorowaniu raka endometrium i szyjki macicy. *Post Hig Med Dośw* 2007; 61: 122-8.
- Ślubowski T, Ślubowska M. Biomarkery w raku piersi. Część I: receptory, czynniki wzrostu, geny i onkogeny. *Współcz Onkol* 2007; 11: 167-74.
- Dimitrov SD, Matouskova E, Forejt J. Expression of BRCA1, NBR1 and NBR2 genes in human breast cancer cells. *Folia Biol* 2001; 47: 120-7.
- Zadrożny M, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kozłowska E, Kulig A. Amplifikacja genu c-erb2 (Her2/neu) u kobiet z rakiem sutka – badania wstępne. *Prz Menopauz* 2002; 1: 11-4.
- Revillon F, Bonneterre J, Peyrat JP. *ERBB2* oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998; 34: 791-808.
- Szacikowska E, Kozłowski W. Rola receptorów HER i heregulin w powstawaniu przerzutów raka piersi. *Współcz Onkol* 2002; 6: 312-21.
- Stupianek A, Pytel D, Majsterek I. Rola onkogennych kinaz tyrozynowych w odpowiedzi komórek na terapię przeciwnowotworową. *Post Hig Med Dośw* 2007; 61: 819-27.
- Kłosowska A, Skręt J, Chmaj K. Ekspresja białka HER2 u chorych na raka gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych. *Nowiny Lekarskie* 2001; 70: 150-9.
- Early Breast Cancer Collaborative Trialists Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 years survival on overview of the randomized trials. *Lancet* 2005; 365: 1657-1717.
- Jones SE. A new estrogen receptor antagonist – an overview of available data. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75 Suppl 1: S19-22.
- Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43: 1-67.
- Martinez-Arribas F, Núñez-Villar MJ, Lucas AR, Sánchez J, Tejerina A, Schneider J. Immunofluorometric study of Bcl-2 and Bax expression in clinical fresh tumor samples from breast cancer patients. *Anticancer Res* 2003; 23: 565-8.
- Naidu R, Wahab NA, Yadav M, Kuty MK. Protein expression and molecular analysis of c-myc gene in primary breast carcinomas using immunohistochemistry and differential polymerase chain reaction. *Int J Mol Med* 2002; 9: 189-96.
- Esteva FJ, Sahin AA, Rassidakis GZ, et al. Jun activation domain binding protein 1 expression is associated with low p27 (Kip1) levels in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5652-9.
- Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Kozłowska E, et al. Badanie genetyczne apoptozy i mutacji genu BRCA1 u kobiet obciążonych dziedzicznie rakiem piersi. *Prz Menopauz* 2004; 5: 19-23.
- Dubrowska A, Kanamoto T, Lomnytska M, Heldin CH, Volodka N, Souchelnytskyi S. TGF-beta1/Smad3 counteracts BRCA1-dependent repair of DNA damage. *Oncogene* 2005; 24: 2289-97.
- Lubiński J. Nowotwory dziedziczne 2002. Profilaktyka, diagnostyka, leczenie. Termedia, Poznań.
- Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI. Biological and clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. *Int J Cancer* 2000; 89: 177-186.
- Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor – oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 462-7.
- Kaklamani VG, Gradishar WJ. Gene expression in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2006; 7: 123-8.
- Kisiel A, Skąpska A, Markiewicz WT, Figlerowicz M. Mikromacierze DNA. *Kosmos – problemy nauk biologicznych* 2004; 53: 295-303.

44. Perou ChM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52.
45. Carey LA, Perou CM, Dressler LG, et al. Race and the poor prognosis basal-like breast cancer (BBC) phenotype in the population-based Carolina Breast Cancer Study. *J Clin Oncol* 2004 (suppl, abstr 9510).
46. 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.
47. Miller KD, Burstein HJ, Elias A, et al. Phase II study of SU 11248, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor (TKI), in patients (pts) with previously treated metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol* 2005 (suppl, abstr 563).
48. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of the basal-like breast cancer (BBC) phenotype. *San Antonio Breast Cancer Symposium*. San Antonio, Texas 2004 (1023).
49. Rouzier R, Anderson K, Hess KR, et al. Basal and luminal types of breast cancer defined by gene expression patterns respond differently to neoadjuvant chemotherapy. *San Antonio Breast Cancer Symposium*. San Antonio, Texas 2004 (abstr 1026).
50. Nielson TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-74.
51. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molekularna klasyfikacja a prognozowanie w raku piersi: jak daleko do zastosowań klinicznych? *J Clin Oncol (wyd. pol.)* 2006; 4: 305-16.
52. Kusińska R, Ptuciennik E, Bednarek A, Kordek R. Nowe molekularne czynniki prognostyczne u chorych na raka piersi. *Współcz Onkol* 2004; 8: 296-302.
53. Vrana KE, Freeman WM, Aschner M. Use of microarray technologies in toxicology research. *Neuro Toxicol* 2003; 24: 331-2.
54. Nagahata T, Onda M, Emi M, et al. Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray. *Cancer Sci* 2004; 9: 189-96.

Adres do korespondencji

dr med. **Agata Filip**
Zakład Genetyki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Radziwiłłowska 11
20-950 Lublin
tel. +48 81 528 84 36
e-mail: aafilip@hotmail.com