

Molekularne wyznaczniki raka piersi Progresja i nowi kandydaci – część II

Katarzyna Janik-Papis, Janusz Błasiak

Rak piersi jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym u kobiet, a duża umieralność z powodu tej choroby spowodowana jest m.in. tym, że bardzo często diagnozowane są nowotwory w stadium zaawansowanym. Około dwóch trzecich przypadków raka piersi w momencie diagnozy jest związane z przerzutami w okolicznych węzłach chłonnych, a w wielu przypadkach występują już mikroprzerzuty w narządach odległych. Dla życia pacjentki decydujące znaczenie ma określenie ryzyka nawrotu i decyzja o rodzaju leczenia uzupełniającego, które jest ustalane na podstawie wyznaczników klinicznych oraz wyznaczników (markerów) molekularnych. Markery te są substancjami syntetyzowanymi przez sam nowotwór i można je ogólnie podzielić na trzy grupy: diagnostyczne, prognostyczne i predykcyjne. Korelacja profilu i poziomu ekspresji markerów molekularnych z rutynowo oznaczanymi parametrami klinicznymi pozwala ocenić ryzyko nawrotu choroby oraz oszacować szansę przeżycia kobiet chorych na raka piersi.

W pracy zostały opisane markery kluczowe dla inwazji i metastazy w raku piersi. W procesie inwazji zmiany w poziomie ekspresji cytokeratyn i białek z rodziny MUC1 (markery CA 15.3 i CA 27.29) świadczą o destabilizacji cytoszkieletu. Z kolei zaburzenie prawidłowej ekspresji adhezyn, w tym antygeny CD44 i E-kadheryny, powoduje odrywanie się komórek nowotworowych od masy guza i ponowną adhezję w odległym organie. Oba te procesy są możliwe dzięki lokalnej proteolizie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, przeprowadzonej przez metaloproteazy macierzowe, przede wszystkim MMP-1 i MMP-9, które z kolei współdziałają ze składnikami urokinazowego układu aktywacji plazminogenu: uPA, uPAR, PAI-1 i PAI-2. Badania nad markerami pozwalają na identyfikowanie nowych białek, które mogą być pomocne w wyborze uzupełniającego leczenia, określeniu rokowania i w monitorowaniu skuteczności terapii. Do takich markerów należą: mammaglobina, cyklooksygenaza 2, presenilina 2, galektyna-3, telomeraza, lipofilina B i lipokalina 2. Zaproponowano też nowe wyznaczniki nowotworowe, stanowiące obiecujące cele przeciwnowotworowego leczenia, takie jak: niektóre białkowe kinazy serynowo-treoninowe, supresor nowotworów Cap43, jądrowe białko YB-1, koaktywator receptora estrogenowego AIB1, czy topoizomeraza II. Nowotwory piersi o fenotypie ER α (-)/PR(-)/HER-2(-) (nowotwory „potrójnie negatywne”) stanowią poważny problem pod względem wyboru metody leczenia, dlatego też w przypadku takich nowotworów markery molekularne tego typu mogą odgrywać poważną rolę.

W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat markerów raka piersi, z uwzględnieniem znaczenia ich zmienności genetycznej, poddano ocenie ich wartość prognostyczną oraz przedyskutowano ich praktyczne wykorzystanie jako cele leczenia przeciwnowotworowego.

Breast cancer markers. Part II: Progression and new candidates

Breast cancer is the most common malignancy affecting women worldwide while the high rate of mortality due to this disease is the consequence of late diagnosis. About two-thirds of breast cancer cases are likely to have nodal metastases and many of them already have distant micrometastases. Therefore, assessing of the risk of metastases and choosing the appropriate adjuvant therapy is crucial in the management of breast cancer patients. Molecular markers, i.e. substances produced by tumor cells, can be divided into three groups, namely diagnostic, prognostic and predictive markers. The correlation of the profile and the expression level of tumor markers with the typical clinical parameters allows to estimate recurrence or metastasis risk and evaluate overall and disease-free survival time.

This paper describes the key proteins in breast cancer invasion and dissemination. Changes in the expression of cytokeratins and of the MUC1 protein family (CA 15.3 and CA 27.29 markers), causing cytoskeletal destabilization, are characteristic for cancer invasion. Changes in expression of adhesins, such as the CD44 antigen and E-kadherin, cause loss of cell adhesion between metastatic cells and the tumor mass, and thus contribute to distant metastasising. These processes are facilitated by

local proteolysis of the extracellular matrix by matrix metalloproteases, including MMP-1 and MMP-9, which cooperate with the components of the urokinase-type plasminogen activator system: uPA, uPAR, PAI-1 and PAI-2.

A variety of proteins have been investigated as potential tumor markers, including mammaglobin, cyclooxygenase 2, presenilin 2, galectin-3, telomerase, lipophilin B and lipocalin 2. We suggest that some of the serine/threonine protein kinases, Cap43 tumor suppressor, YB-1 nuclear factor, AIB1 coactivator of ER α or topoisomerase II could be considered potential targets in breast cancer therapy.

Słowa kluczowe: rak piersi, wyznaczniki prognostyczne, terapia przeciwnowotworowa

Key word: breast cancer, prognostic markers, anticancer therapy

Wprowadzenie

Progresja jest wieloetapowym procesem, w którym następuje nowotworowa inwazja sąsiednich tkanek i powstawanie przerzutów nowotworowych w odległych narządach. Mutacje zachodzące na tym etapie powodują destabilizację cytoszkieletu i utratę zdolności adhezji do sąsiednich komórek. Następuje oderwanie się komórki nowotworowej od masy guza, migracja naczyniami krwionośnymi, adhezja do elementów macierzy komórkowej i zewnątrzkomórkowej (ECM) organów docelowych, lokalna proteoliza białek macierzowych i proliferacja komórkowa, dająca w konsekwencji wtórne ognisko nowotworowe.

Wyznacznikami molekularnymi progresji raka piersi obecnie oznaczanymi są: marker CA 15.3 (*cancer antigen*), marker CA 27.29, TPS (*tissue polypeptide-specific antigen*), TPA (*tissue polypeptide antigen*) oraz Cyfra 21.1. Jednakże w inwazji i adhezji komórek nowotworowych bierze udział wiele białek: m.in. adhezyny, integryny, katepsyny, kolagenazy, metaloproteazy oraz białka urokinazowego układu aktywacji plazminogenu, wśród których poszukuje się nowych markerów progresji raka piersi.

Markery biorące udział w progresji raka piersi

Cytokeratyny (CKs)

Cytokeratyny (CKs) stanowią grupę białek, która razem z mikrotubulami i mikrofilamentami tworzy cytoszkielet większości komórek eukariotycznych. Grupę cytoke-ratyn dzieli się na 7 klas, wśród których odnajduje się molekularne wyznaczniki nowotworów. Do grupy CKs wchodzi w sumie 20 polipeptydów, wykazujących dużą wzajemną homologię. Na podstawie tej homologii wyodrębniono dwa typy: typ I obejmujący kwasowe CKs 9-20 i typ II obejmujący CKs 1-8, które są obojętne lub zasadowe. CKs wykazują ekspresję specyficzną tkankowo w komórkach nabłonkowych, zależną od cyklu komórkowego i łączą się w dimery i polimery z monomerów przedstawiających różne typy. Kombinacja ta również jest specyficzna tkankowo oraz zależna od fazy cyklu komórkowego. W polimerze występuje równa ilość monomerów I i II. W prawidłowych komórkach nabłonkowych wielu narządów najczęstszymi kombinacjami są CK8/CK18 i CK8/CK19. Pary te występują również w komórkach raka piersi.

Znajomość sekwencji, budowy oraz kombinacji CKs stworzyła możliwość opracowania wielu testów immunologicznych, specyficznie wykrywających poszczególne kombinacje i określających poziom ich ekspresji. Testy z użyciem IgG w celu poszukiwania markerów nowotworowych wykrywają poszczególne epitopy na CK8, CK18 i CK19. Dziś oznacza się TPA, TPS i Cyfra 21.1. Test TPA rozpoznaje wszystkie trzy cytokeratyny, TPS – CK8 i CK18, a Cyfra 21.1 wykrywa CK8 i CK19.

Podwyższenie poziomu Cyfra 21.1 w surowicy powyżej 3,5 ng/ml wiąże się ze znacznym skróceniem czasu przeżycia chorych na raka piersi, w porównaniu z chorymi, u których poziom tego markera jest niższy. Wyniki są na tyle istotne statystycznie, że można uznać ten marker za bardzo użyteczny w określeniu rokowania [1]. Jednakże konieczne są dalsze badania, połączone z korelacją z innymi markerami z rodziny cytokeratyn. Analiza poziomu ekspresji mRNA CK19 w komórkach nowotworowych CTC (*circulating tumor cells*) raka piersi, krążących w układzie krwionośnym, wykazała związek wysokiej ekspresji mRNA CK19 z krótszym czasem całkowitego okresu przeżycia (*overall survival – OS*), a w połączeniu z nadekspresją mRNA receptora HER-2 i mammaglobiny, z krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby (*disease-free survival – DFS*). Podwyższony poziom ekspresji CK19 u chorych na raka piersi przed chemioterapią adiuwantową wiąże się z obniżeniem prawdopodobieństwa przeżycia [2].

Antygen TPS jest kolejnym markerem nowotworowym, oznaczanym również w przypadku raka piersi. Podwyższony poziom TPS, jak i również TPA w surowicy, występuje także w innych chorobach, takich jak np. zapalenie wywołane HBV lub marskość wątroby, a nawet może być podwyższony u zdrowych kobiet w okresie okołouwulacyjnym, co obniża jego swoistość i wartość diagnostyczną. W związku z tym, prognozą stężenia antygenu TPS, od którego można podejrzewać istnienie choroby nowotworowej, jest około 90 U/l [3].

Markery TPS i TPA mogą być rozważane jako użyteczne wyznaczniki przebiegu i skuteczności chemioterapii niektórych nowotworów, szczególnie wtedy, gdy są oznaczane razem z innymi markerami (np. z CA 15.3 w raku piersi). Wykazano związek pomiędzy podwyższonym stężeniem TPS w surowicy w przypadku nowotworów silnie proliferujących. Badanie poziomu TPS u osób po operacji lub w okresie remisji po chemioterapii umożliwiło wykrycie wznowy we wczesnym jej stadium. Obecnie TPS wykorzystuje się do monitorowania che-

mioteraapii chorych, u których doszło już do przerzutów w odległych narządach. Przy oznaczaniu CA 15.3 razem z TPS czułość wykrywania przerzutów do kości i płuc przekracza 75%, a przy monitoringu przebiegu leczenia spadek poziomu TPS jest korzystnym wskaźnikiem rokowniczym [3].

Rodzina białek MUC1 (markery CA 15.3 i CA 27.29)

Gen kodujący mucynę 1 zawiera w swoim *locus* (1q21) szereg powtórzeń tandemowych VNTR (*variable number tandem repeat*). W wyniku rekombinacji niehomologicznej, analogicznej do występującej w różnicowaniu przeciwciał, różne kombinacje łączenia poszczególnych fragmentów dają w wyniku ekspresji białka charakteryzujące się wysokim stopniem heterogeniczności. Białka CA 15.3, CA 27.29, CA 549, MCA (*mucin-like associated antigen*) wykorzystywane są jako markery nowotworowe, ponieważ zauważono podwyższenie ich ekspresji w niektórych nowotworach. Testy z użyciem IgG wykrywają charakterystyczne epitopy produktu genu *MUC1*, a z powodu dużej heterogeniczności różniące się od siebie mucyny nabłonkowe nazwane są ogólnie PEM (*polymorphic epithelial mucin*).

Mucyny są dużymi (od 250 do 1000 kDa) glikoproteinami, zbudowanymi z białkowego rdzenia (apomucyna) i wielu węglowodorowych łańcuchów, połączonych z apomucyną poprzez seryny i treoniny wiązaniami O-glikozydowymi. Strukturalnie mucyny są zbudowane z trzech domen: dużej, wysokoglikozydowanej zewnątrzkomórkowej domeny, zbudowanej z 1000-2000 aminokwasów, krótkiego transbłonowego odcinka i 69-aminokwasowego cytoplazmatycznego „ogonka”. Mucyny PEM są glikoproteinami, obecnymi w dużych stężeniach, wykazujących polaryzacyjne ułożenie na wierzchołkach komórek nabłonkowych wielu narządów (żołądka, trzustki, pęcherza moczowego, elementów układu oddechowego i piersi) [4]. W związku z tym w przypadku nowotworów tych narządów charakterystyczne kombinacje mucyn są oznaczane w surowicy krwi jako markery nowotworowe. W prawidłowym gruczole piersiowym gen *MUC1* ulega ekspresji w częściach przewodowych i gruczołowych, skąd mucyny są wydzielane do mleka w formie rozpuszczalnej lub związanej z lipidami. Podczas transformacji nowotworowej, związanej ze zniszczeniem normalnej polaryzacji nabłonka, mucyny przedostają się do krwi, gdzie mogą być oznaczane, a ich poziom jest dodatnio skorelowany ze stopniem zaawansowania nowotworu.

Używane w testach monoklonalne IgG rozpoznają zmienną, zewnątrzkomórkową domenę, zbudowaną z 20-aminokwasowych powtórzeń, kodowanych przez określone powtórzenia VNTR. Fakt, że zewnątrzkomórkowa, domena jest uwypuklona o wiele bardziej niż inne elementy zewnątrzkomórkowe, sugeruje, że mucyny odgrywają rolę antyadhezyjną, a ich nadekspresja pozwala komórce nowotworowej utracić kontakt z prawidłowymi komórkami, rozpoczynając proces powstawania przerzutów, oraz ukryć się przed komórkami i innymi

składnikami układu immunologicznego, takimi jak przeciwciała lub dopełniacz. To tłumaczy negatywne rokowanie u chorych na raka piersi z nadekspresją genu *MUC1* [5]. Całość negatywnego charakteru *MUC1* jako czynnika prognostycznego metastazy nowotworu dopełnia zdolność mucyn do aktywacji błonowych receptorów dla czynników wzrostu, redukcji adhezji komórkowej zależnej od E-kadheryny i promowania migracji komórkowej [6]. Niestety obecność mucyn w osoczu stwierdza się również u osób niecierpiących na nowotwory, nawet w wyższych stężeniach, a heterogeniczność *MUC1*, spowodowana polimorfizmem domen VNTR, jeszcze bardziej komplikuje wykorzystanie mucyn jako markerów nowotworowych. Jednak mucyny ulegające ekspresji w nowotworach mają krótsze i mniej rozgałęzione łańcuchy polisacharydowe, w porównaniu z prawidłowymi mucynami, a różnice te można wykryć używając specyficznych monoklonalnych IgG. Na tej podstawie opracowano specyficzne testy, wykorzystywane w raku piersi: CA 15.3, CA 27.29, MCA, CA 549, BCM (*breast cancer mucin*), EMCA, M26 i M29.

CA 15.3 jest markerem wykrywanym z użyciem IgG 115D8, skierowanym przeciwko powierzchniowym epitopom liposomów w mleku i IgG DF3, a także wielu epitopom powierzchniowym komórek raka piersi. CA 15.3 jest markerem najczęściej oznaczanym w raku piersi, obok ER α , PR i HER-2, ale wskazana jest ostrożność w analizie wyników, ponieważ podwyższony poziom CA 15.3 wykrywa się również w nienowotworowych i nowotworowych chorobach wątroby, raku jajnika i raku płuc [7]. Jednak CA 15.3 może być cennym czynnikiem prognostycznym: chorzy na raka piersi z wysokim poziomem CA 15.3, mierzonym przed operacją, wykazywali o wiele niższe wskaźniki przeżycia zarówno DFS, jak i OS. Dodatkowo podwyższony poziom CA 15.3 (powyżej 10 U/ml) był związany z większym ryzykiem wznowy nowotworu i zwiększoną śmiertelnością [8]. Poziom CA 15.3, oznaczany razem z CEA (*carcinoembryonic antigen*), jest dobrym markerem monitorującym skuteczność chemioterapii. Sprawdza się również w przewidywaniu przeżywalności chorych na raka piersi, u których podjęto już leczenie [9].

Od 1998 roku CA 27.29 jest markerem oznaczanym w II i III stopniu zaawansowania raka piersi i jest wartościowym markerem prognostycznym. Do badania poziomu ekspresji CA 27.29 używa się monoklonalnych IgG B27.29, a czułość testu jest większa niż w przypadku markera CA 15.3. W I stopniu zaawansowania nowotworu czułość tego testu wynosi 10-15%, w II 20-25%, a w III 30-45%. Jednak trzeba pamiętać, że podwyższony poziom CA 27.29 obserwuje się także w innych chorobach, takich jak łagodne zmiany w piersiach, przewlekłe zapalenia wątroby i choroby o podłożu immunologicznym [10]. Przy obecności przerzutów w odległych narządach czułość testu CA 27.29 jest dość duża, jednak zależna od miejsca docelowego i wielkości ogniska wtórnego (90% w przypadku przerzutów do wątroby, 50% w przypadku przerzutów do kości i płuc) [11]. Jednocześnie wykazano normalny poziom CA 27.29 u większości chorych, u któ-

rych nastąpiła wznowa nowotworu piersi. Niestety, marker CA 27.29 nie nadaje się do badań przesiewowych, do oceny ryzyka i wczesnego rozpoznania raka piersi, ponieważ jego wykrywalny poziom pojawia się dopiero w III stopniu zaawansowania nowotworu [12].

Adhezyny (antygen CD44 i E-kadheryna)

Adhezyny są glikoproteinami transbłonowymi, biorącymi udział w przyleganiu do siebie komórek w tkance oraz odpowiedzialnymi za kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową. Częsteczki te odgrywają rolę w migracji komórek, różnicowaniu, proliferacji i apoptozie. Połączenie adhezyn ze swoimi ligandami przekazuje komórce informacje ze środowiska zewnątrzkomórkowego oraz od innych komórek. Dzięki adhezynom elementy immunologicznego układu człowieka kontrolują prawidłowość komórek. Zaburzenia ekspresji, wszelkie nieprawidłowości w budowie, a szczególnie utrata ekspresji adhezyn na powierzchni komórek, pociągają za sobą poważne konsekwencje. Przykładem jest utrata adhezyn lub zaburzona ich struktura na komórkach nowotworowych, będąca jedną z przyczyn powstawania przerzutów. Komórki nowotworowe potrafią zmniejszyć ekspresję adhezyn po to, by się oddzielić od masy guza, a później ponownie ją zwiększyć w celu ponownej adhezji, dając wtórne ognisko nowotworu. Cały mechanizm zmiany ekspresji adhezyn przez komórki nowotworowe jest jeszcze nie do końca poznany, dlatego adhezyny są poddawane wnikliwym badaniom. Szuka się wśród nich biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych, informujących o poziomie postępu choroby nowotworowej, skali utraty specjalizacji tkankowej i powstawaniu przerzutów.

Polimorficzna glikoproteina CD44 (zwana również ECMRII) jest adhezyną błonową, odgrywającą ważną rolę we wzajemnej adhezji komórek i komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej. Jej ligandem są hialuroniony. CD44 bierze udział w limfopoezie i aktywacji limfocytów, odgrywa rolę w progresji i metastazie nowotworów złośliwych [13], a także w inicjacji i rozwoju raka piersi [14]. Z tego względu rozpatruje się wykorzystanie CD44 jako czynnika prognostycznego. CD44 posiada kilka wariantów polimorficznych, a jeden z nich – V6, w przypadku zwiększonej amplifikacji może źle rokować [15]. Rola prognostyczna CD44 uwalnianej do krwi jest wciąż przedmiotem badań.

Gen *CDHI* (*locus* 16q22.1) koduje adhezyną częsteczkę E-kadherynę. E-kadheryna tworzy kompleks E-kadheryna/katenina, który jest związany z rozwojem nowotworów złośliwych, w tym również raka piersi [16]. W sporadycznych zrazikowych rakach piersi E-kadheryna uważana jest za supresor inwazji nowotworu. W przypadku mutacji inaktywujących E-kadherynę łatwiej dochodzi do utraty adhezji komórek nowotworowych w guzie pierwotnym, co prowadzi do powstania przerzutów [17]. E-kadheryna, jako częsteczka adhezyjna, w fazie promocji i progresji jest czynnikiem dobrze rokującym, ponieważ to właśnie utrata kontaktu z komórkami masy guza jest jednym z warunków utworzenia odległego przerzutu.

Jednakże w przypadku utraty kontaktu przez komórki nowotworową i jej przemieszczeniu do miejsca adhezji i utworzeniu wtórnego ogniska nowotworowego, wzmożona ekspresja częsteczek adhezyjnych, w tym E-kadheryny, może jej to ułatwić, wobec czego nadmierna ekspresja E-kadheryny w tym etapie rozwoju nowotworu jest czynnikiem źle rokującym. Z tego względu zdania, co do znaczenia zaburzonej ekspresji genu *CDHI*, są podzielone, ale większość badaczy uważa, że w raku piersi utrata aktywności E-kadheryny wiąże się ze złym rokowaniem [18]. Istnieją również wyniki badań pokazujące brak spadku aktywności E-kadheryny podczas rozwoju choroby nowotworowej [19]. Utrata aktywności E-kadheryny przypisywana jest hipermetylacji wysp CpG w rejonie promotora, co powoduje wyciszenie genu *CDHI* [20]. Utratę ekspresji *CDHI* częściej obserwuje się w raku pęcherzykowym naciekającym, niż raku wewnątrzprzewodowym, również naciekającym [21]. W nietypowych postaciach nowotworów obserwuje się wzrost ekspresji E-kadheryny, np. w raku zapalnym piersi [22].

Brak jest jednoznacznego określenia rokowniczego znaczenia E-kadheryny i konieczne są dalsze badania zmierzające do rozstrzygnięcia tego problemu, jednakże nie można wykluczyć jej podwójnej roli w transformacji nowotworowej.

Urokinazowy układ aktywacji plazminogenu

Inwazja sąsiednich tkanek, dokonywana przez komórki nowotworowe, wymaga degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej ECM, przeprowadzanej przez wiele białek urokinazowego układu plazminogenu, w skład którego zalicza się: aktywator plazminogenu typu urokinazowego – uPA (*urokinase-type plasminogen activator*), jego receptor – uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*) i inhibitory: PAI-1 i PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor*). W immunohistochemicznych badaniach fragmentów guzów złośliwych stwierdzono obecność składników urokinazowego układu aktywacji plazminogenu na powierzchni komórek biorących bezpośredni udział w inwazji guza oraz na komórkach podściółki guza [23].

Kluczowym białkiem biorącym udział w degradacji ECM jest uPA, wydzielany w formie nieaktywnego prekursora pro-uPA i konwertowany do formy aktywnej, po związaniu się ze swoim receptorem uPAR. U kobiet z rozpoznaniem raka piersi uPA wydaje się promować naciekanie sąsiednich tkanek przez komórki nowotworowe i występowanie przerzutów [24] poprzez degradację ECM, stymulację angiogenezy [25], regulację migracji komórek i ich adhezji oraz przez zahamowanie procesów apoptozy [26].

Komórki nowotworowe, szczególnie te w obwodowych częściach guza, charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji uPAR, co ma związek z większą ilością aktywnych enzymów proteolitycznych na powierzchni guza. Pozwala to na trawienie i penetrację sąsiednich tkanek przez komórki nowotworowe, prowadząc do naciekania nowotworu i jego progresji [27]. W przypadku uPAR

progresja nowotworów może zależeć od jego lokalizacji. W przypadku inwazyjnych guzów piersi stwierdzono umiejscowienie uPAR w komórkach rakowych lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie [28].

Oprócz podwyższonej ekspresji uPAR w obwodowych obszarach guzów, obserwuje się także podwyższoną ekspresję samego uPA, biorącego czynny udział w progresji, dlatego ilość uPA jest dodatnio skorelowana z inwazyjnością nowotworu oraz krótszym czasem przeżycia chorych na raka piersi [29]. uPA jest dobrym markerem nowotworowym, szczególnie u chorych z ekspresją receptorów estrogenowych, zarówno bez przerzutów, jak i z przerzutami w węzłach chłonnych. Jednak najnowsze prace wskazują, że nadekspresja uPA, szczególnie w połączeniu z obniżeniem ekspresji PAI-1, może towarzyszyć nowotworom o wolniejszym przebiegu [30].

Dla progresji i występowania przerzutów nowotworu ważny jest także PAI-1, który hamuje zarówno wolny uPA, jak i uPA, związany z uPAR. Jednakże rola PAI-1 w progresji nowotworów jest niejasna, gdyż wyniki niektórych badań sugerują, że PAI-1 może chronić komórki guza przed degradacją proteolityczną, a w innych badaniach zaobserwowano hamowanie inwazji nowotworów przez PAI-1. Tempo uwalniania PAI-1 zwiększają cytokiny uwalniane przez same komórki nowotworowe, a wysoki poziom PAI-1 obserwowano w różnych nowotworach, m.in. w raku sutka. Poziom PAI-1, oznaczany w ekstraktach komórek pierwotnego raka piersi, stanowi bardzo użyteczny marker prognostyczny – uważa się, że wysoki poziom PAI-1 w guzie wiąże się ze złym rokowaniem chorych na raka piersi [31]. Dodatkowo poziom ekspresji PAI-1 może wynikać nie tylko z zaburzonej regulacji genu *PAI-1* w trakcie procesu nowotworowego, ale również z wysokiej zmienności genetycznej *PAI-1*. Przebadano kilka polimorfizmów pod kątem ich związku z poziomem agresywności i wystąpieniem przerzutów raka piersi. Nie stwierdzono różnic w częstościach genotypów i rozkładzie alleli polimorfizmu ins5G/del4G (4G/5G), występującego w promotorze tego genu, między osobami chorymi na raka piersi bez przerzutów lub z przerzutami w okolicznych węzłach chłonnych [32].

Stwierdzono zwiększoną ekspresję PAI-1, uPA oraz TIMP-1 (*tissue metalloproteinase inhibitor type 1*) w komórkach raka piersi, w porównaniu z komórkami tkanek prawidłowych. Podwyższenie ekspresji tych markerów jest związane z gorszym prognozowaniem [33]. Podobnie można wykorzystać proteazy plazminogenu jako wyznacznik przebiegu i skuteczności chemioterapii, a spadek poziomu ich ekspresji dobrze rokuje [34].

Składniki układu aktywacji plazminogenu stanowią użyteczne markery, świadczące o progresji raka piersi, a uPA i uPAR stanowią dobre cele terapii antynowotworowej.

Metaloproteazy macierzowe i ich inhibitory

Metaloproteazy macierzowe MMPs (*matrix metalloproteinases*) są sekrecyjnymi endopeptyzami, rozkładajacy-

mi białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Dzieli się je na cztery grupy: kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny i metaloproteazy. Metaloproteazy odgrywają ważną rolę w progresji nowotworów, a w raku piersi podwyższony poziom metaloproteaz 2 (kolagenaza typu IV), 9 i 11 (stromelizyna 3) koreluje ze złym rokowaniem [35]. Oprócz układu aktywacji plazminogenu również metaloproteazy macierzowe (MMPs) odgrywają kluczową rolę w degradacji błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, w remodelowaniu tkanek, inwazji komórek nowotworowych i metastazie.

Wykazano znacząco podwyższony poziom MMP-1 i MMP-9 w komórkach nowotworowych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi [36]. Nie bez znaczenia są polimorfizmy w promotorach genów kodujących MMP-1 i MMP-9, mające wpływ na poziom ekspresji tych białek. Polimorfizm 1G/2G, polegający na insercji G w pozycji -1607 promotora genu *MMP-1*, tworzy miejsce wiązania się czynnika transkrypcyjnego ETS (*E26 transforming sequence*), który w przypadku genu *MMP-1* aktywuje transkrypcję, powodując zwiększenie MMP-1 w komórce. Większa częstość allelu 2G w grupie chorych na przerzutującego raka piersi, w porównaniu z chorymi na raka piersi, u których nie stwierdzono przerzutów, wskazuje, że allel 2G znacząco wpływa na agresywność tego typu nowotworu i podnosi ryzyko wystąpienia przerzutów [37]. Inny polimorfizm, mianowicie substytucja C>T w promotorze *MMP-9*, powoduje zwiększenie ekspresji MMP-9, ponieważ pojawienie się allelu T znosi miejsce wiązania się represora tego genu, predysponując do rozwijania się bardziej agresywnych, szybko przerzutujących nowotworów [36].

W grupie tkankowych inhibitorów metaloproteaz tylko TIMP-1 okazuje się mieć znaczenie w raku piersi. TIMP-1 hamuje inwazję nowotworu, indukowaną przez MMP. Jednak TIMP-1 ulega nadekspresji w wielu nowotworach złośliwych, co jest związane ze złym rokowaniem. Mechanizmy, dzięki którym TIMP-1 promuje inwazję nowotworu, będąc inhibitorem kluczowych enzymów proteolitycznych, promujących przerzutowanie, są wciąż nieznanne. Zmniejszenie ekspresji mRNA TIMP-1, za pomocą shRNA, u transgenicznych myszy SCID cierpiących na raka sutka nie spowodowało żadnych fizjologicznych zmian na poziomie komórki, ani nie spowodowało zmian w rozmiarze guza. Jednak nadekspresja TIMP-1 w liniach komórkowych raka piersi MDA-MB-231 spowodowała wzrost inwazyjności komórek rakowych i wzmożoną fosforylację *in vitro* takich białek jak p38, kinaz MAPK i AKT. Analiza cDNA za pomocą mikro-macierzy wykazała, że nadekspresja TIMP-1 zwiększa ekspresję prawie 200 genów, m.in. zaangażowanych w progresję nowotworu np.: kinazy DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*), receptora dla czynnika wzrostu fibroblastów FGFR4 (*fibroblast growth factor receptor 4*), kinazy MAPK13 (*mitogen-activated protein kinase 13*), metaloproteaz MMP1 i MMP13, białek wiążących wapń S100A14 i S100P. Natomiast *in vivo* nadekspresja TIMP-1 stymulowała wzrost nowotworu i procesy angiogeniczne [38]. Dodatkowo, TIMP-1 hamuje procesy apoptotycz-

ne, sprzyjając immortalizacji komórek raka piersi [39], a oznaczany w osoczu chorych na raka piersi świadczy o nawrocie choroby [40].

TIMP-1 może być dobrym markerem, świadczącym o stopniu agresywności, obecności przerzutów i wznowy raka piersi.

Kandydaci na molekularne wyznaczniki raka piersi

Mammaglobina (MGB1)

Mammaglobina B jest białkiem należącym do rodziny genowej kodującej uteroglobiny. Gen *MGB1* (*locus* 11q12.3-q13.1) ulega ekspresji wyłącznie w tkankach piersi. Od 10 lat mammaglobina jest badana, jako kandydat na molekularny wyznacznik raka piersi, ponieważ zauważono nadekspresję genu *MGB1* w nowotworach piersi, a obecność białka w surowicy krwi, spowodowana zniszczeniem struktury tkanek przez zmiany nowotworowe, może być wykrywana testami immunochemicznymi. Wysoki poziom mRNA *MGB1* może świadczyć o obecności mikroprzerzutów do okolicznych węzłów chłonnych, a wysoka ekspresja mRNA *MMB1* w komórkach CTC wykazała związek z krótszym czasem całkowitego przeżycia [2].

Cyklooksygenaza 2 (COX2)

Cyklooksygenaza 2 jest enzymem biorącym udział w utrzymaniu równowagi fosfolipidowej błon komórkowych. Uczestniczy ona także w wielu procesach fizjologicznych w komórce, kluczowych dla progresji nowotworów, takich jak apoptoza, proliferacja, angiogeneza i inwazja. COX2 może upośledzać odpowiedź immunologiczną gospodarza, co skutkuje dalszą ekspansją komórek nowotworowych [41]. Stwierdzono nadekspresję tego enzymu w guzach litych, w przewodowym raku piersi *in situ* (*carcinoma ductale in situ*, DCIS) [42] oraz w innych typach raków piersi [43]. Doniesienia te przedstawiają COX2 w roli kandydata na molekularny wyznacznik raka piersi, a także sugerują potrzebę wprowadzenia inhibitorów COX2 jako chemoprewencji nowotworów piersi.

Presenilina 2 (pS2)

Presenilina 2 (pS2), zwana też TFF1 (*trefoil factor 1*) bądź BCEI (*breast cancer estrogen-inducible*), kodowana jest przez gen znajdujący się w *locus* 21q22.3. Jest to 40-aminokwasowy polipeptyd sekrecyjny, którego obecność stwierdza się w 50% nowotworów złośliwych piersi. Ekspresja pS2 jest indukowana przez estrogeny, stąd też pomysł zastosowania pS2 jako wyznacznika określającego prawidłowe działanie ER α . Poziom pS2 może być wykorzystany jako czynnik monitorujący skuteczność hormonoterapii chorych z nowotworami piersi ER α (+), a jego nadekspresja sugeruje dużą szansę na remisję po zastosowaniu hormonoterapii [44].

Galektyna-3

Następnym kandydatem na wyznacznik raka piersi jest galektyna-3 (*LGALS3* – *lectin, galactoside-binding, soluble 3, locus 14q21-q22*) – rozpuszczalna lektyna, wiążąca galaktozyd. Niedawno odkryto, że galektyna-3 ulega ekspresji tylko na powierzchni komórek nowotworów piersi, a poziom jej ekspresji wykazuje dodatnią korelację ze stopniem złośliwości [45]. Nie stwierdzono ekspresji galektyny-3 w prawidłowych tkankach piersi, w przeciwieństwie do komórek nowotworowych. Zarówno komórki nowotworu pierwotnego, jak i wtórnego, powstałego z przerzutu do mózgu, wykazywały zwiększoną ekspresję galektyny-3, co skłania do przyjęcia galektyny-3 jako kandydata na wyznacznik świadczący o stopniu zaawansowania i metastazie raka piersi, szczególnie do mózgu [46]. Istnieje również polimorfizm zmiany sensu P64H (rs4644), zwiększający ryzyko zachorowania na raka piersi i wzmagający oporność komórek nowotworowych na leki indukujące apoptozę nowotworu [47].

Telomeraza

Prawidłowe komórki, po osiągnięciu limitu Hayflicka, wchodzi w stan senescencji, podczas której trwają w fazie spoczynkowej G0 i nie dzielą się dalej, aż do momentu włączenia programu apoptozy. W takim stanie jest większość komórek somatycznych człowieka. Komórki nowotworowe posiadają zdolność do niekończącej się liczby podziałów, m.in. dlatego, że mają zdolność zapobiegania skracaniu się telomerów na końcach chromosomów po każdej rundzie replikacyjnej. Najczęściej wykorzystują telomerazę, enzym, który na swojej własnej matrycy RNA, stanowiącej jego integralną część, syntetyzuje telomery dzięki swojej jednostce katalitycznej, mającej aktywność odwrotnej transkryptazy (TERT). Telomeraza jest nieaktywna w prawidłowych komórkach somatycznych, z wyjątkiem komórek macierzystych. Aktywna odwrotna transkryptaza telomerazy (TERT) jest obecna prawie we wszystkich nowotworach. Zwiększona ekspresja podjednostki katalitycznej hTERT i wzmożona aktywność telomerazy są dobrymi diagnostycznymi markerami nowotworów [48].

Telomeraza może być dobrym celem terapii antynowotworowej. Przykładem jest koniugat selenitu z diaminoplatyną [(NH₃)₂Pt(SeO₃)₂], który, hamując aktywność telomerazy w komórkach nowotworowych (raka endometrium), znosi ich nieśmiertelność [49]. Telomeraza może być aktywna w raku piersi, a poziom jej ekspresji może stanowić marker diagnostyczny i prognostyczny, a także predykcyjny odpowiedzi na leczenie [50].

Lipofilina B

Białko BU101 (lipofilina B) jest kandydatem na molekularny wyznacznik raka piersi, ponieważ ulega podwyższonej ekspresji na powierzchni komórek tego nowotworu. Lipofilina B należy do rodziny uteroglobiny sekrecyjnej i bierze udział w transdukcji sygnałów, odpowiedzi im-

munologicznej i chemotaksji. Jej podwyższone stężenie zostało zaobserwowane w nowotworach piersi i zaprojektowano test, który może służyć do rutynowego oznaczania tego markera u chorych osób [51].

Lipokalina 2 (NGAL)

Gen *NGAL* (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, locus 9q34) koduje lipokalinę 2 – neutrofilową lipokalinę, zasocjowaną z żelatynazą. Lipokaliny należą do rodziny małych białek sekrecyjnych, wiążących substancje hydrofobowe. Mogą one także wiązać zarówno cząsteczki zewnątrzkomórkowe, jak i receptory błonowe, tworząc z nich większe agregaty. Główną ich funkcją jest transport substancji lipofilnych, immunomodulacja i synteza prostaglandyn.

NGAL jest niewielką glikoproteiną o 25 kDa, odgrywającą rolę w proliferacji komórek, przeżywalności i morfogenezie. NGAL ulega ekspresji w różnych typach nowotworów, również w raku piersi i jest jednym z białek ostrej fazy, wydzielanym przez neutrofile, a jej ekspresja jest indukowana prozapalnymi cytokinami. Lipokalina 2 jest również syntetyzowana przez komórki nabłonkowe, zarówno prawidłowe, jak i nowotworowe, różnych narządów. W komórkach nabłonkowych piersi ekspresja NGAL jest pobudzana przez estrogeny, a jej poziom wzrasta podczas mitogenezy. Rola NGAL, m.in. w raku piersi, polega na tym, że tworzy ona z MMP-9 kompleks, zwiększający jej aktywność proteazową, sprzyjającą trawieniu i naciekaniu komórek nowotworowych na sąsiednie tkanki. W związku z tym wzrost poziomu NGAL jest skorelowany z bardziej agresywnymi nowotworami. Po zbadaniu związku pomiędzy NGAL a wybranymi prognostycznymi markerami objawów klinicznych raka piersi wykazano u 33% przebadanych raków piersi cytoplazmatyczną ekspresję NGAL, która silnie korelowała z brakiem ekspresji ER α , nadekspresją HER-2, utratą zróżnicowania tkankowego komórek nowotworowych, obecnością przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych, wysokim indeksem proliferacyjnym, mierzonym poziomem antygenu Ki-67 i krótkimi okresami przeżycia. Wykazano, że poziom NGAL może stanowić niezależny marker prognostyczny, służący do oszacowania czasu przeżycia zarówno chorych z nowotworami ER α (+), jak i ER α (-) [52].

Nowe markery diagnostyczne – nowe cele terapeutyczne

Obecnie celem hormonoterapii jest receptor ER α , ponieważ większość nowotworów złośliwych u kobiet, szczególnie po menopauzie, jest indukowana i pobudzana do progresji przez estrogeny. Uznane i rozważane wyznaczniki molekularne raka piersi pomagają w doborze leków przeciwnowotworowych, dawki, czasu leczenia oraz ocenie szansy wznowy nowotworu. ER α jest wrażliwy na estrogeny, jednakże poprzez zmienioną konformację białka w wyniku mutacji bądź alternatywnego składania mRNA, może być niewrażliwy na leki

z grupy SERM i SERD. Wówczas można wybrać za cel wcześniejszy etap całej kaskady transdukcji sygnału, mianowicie etap syntezy estrogenów, stosując inhibitory aromatazy, jak np. aminoglutetymid. Także ekspresja innych białek może być celem terapii. Obecnie dostępne są preparaty hamujące działanie czynników wzrostu VEGF i EGF. Receptor HER-2 daje podstawę do zastosowania zestawu monoklonalnych przeciwciał (preparat trastuzumab, herceptyna) lub do wprowadzenia leków stosowanych w I stopniu zaawansowania raka piersi, takich jak Pertuzumab, EKB-569, a w III fazie OSI-774, Tarceva, Erlotinib. Pertuzumab (rhuMab 2C4, Omnitarg) jest jednym z przedstawicieli grupy inhibitorów dimeryzacji receptorów rodziny HER, określanych skrótowo HDI (*Human Epidermal Growth Factor Receptor dimerization inhibitors*). Jest to zestaw monoklonalnych przeciwciał, które wiążą inne epitopy zewnątrzkomórkowej domeny HER-2, inne niż przeciwciała obecne w trastuzumabie i dzięki wprowadzonej zawadzie przestrzennej blokują domenę odpowiedzialną za tworzenie heterodimerów HER-2 z innymi receptorami z grupy HER. EKB-569 (3-cyano-kwinolin) jest substancją o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Wiąże się on kowalencyjnie z receptorami HER-1, HER-2 i HER-4, blokując ich fosforylację i przekazanie sygnału do wnętrza komórki, co hamuje jej proliferację i może dodatkowo stymulować apoptozę. Preparat OSI-774 (Erlotinib, Tarceva) zawiera chlorowodorek kwinazolin, który, współzawodnicząc z ATP w wiązaniu się do wewnątrzkomórkowej domeny katalitycznej wszystkich receptorów z grupy HER, blokuje sygnał do proliferacji, generowany związaniem się EGF do tych receptorów. Jednakże należy pamiętać, że w komórkach nowotworowych, zmienione w wyniku mutacji lub alternatywnego składania, białka markerowe mogą być nierozpoznawalne przez monoklonalne przeciwciała używane w diagnostyce i dawać wynik fałszywie ujemny.

W związku z tym tak cenne jest opracowanie mikromacierzy cDNA, które powinny zawierać cDNA z kombinacji wszystkich możliwych transkryptów, powstałych z alternatywnego składania mRNA i transkrypcji z różnych promotorów. Sam gen kodujący ER α ma 7 promotorów i wiadomo, że transkrypcja jest inicjowana z innych promotorów w komórkach nowotworowych, niż w komórkach prawidłowych.

Najnowsze technologie molekularne dla diagnostyki i terapii skupiają się na konstrukcji macierzy cDNA i mikrotestów tkankowych TMA (*tissue microarrays*), będących kombinacją testu ACGH (*array-based comparative genomic hybridization*), opartego na genomowej hybrydyzacji i innych testów, opartych na fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* FISH (*fluorescence in situ hybridization*) [53]. Po przeanalizowaniu poziomu ekspresji cDNA 18 432 ludzkich genów z materiału pobranego od chorych na raka piersi z dobrym i złym rokowaniem, zidentyfikowano grupę genów kluczowych dla rozwoju nowotworu piersi i wyliczono indeks prognostyczny IP, w celu oceny prognozy pooperacyjnej [54]. Tego typu testy mogą być w przyszłości zastosowane w rozpoznaniu i ocenie roko-

wania chorych na raka piersi, ponieważ obecnie żaden marker molekularny nie jest w stanie zasygnalizować obecności mikroprzerzutów, które mogą mieć miejsce nawet w I stadium nowotworu. Po drugie, dobrze rokujący spadek jakiegoś markera może być wynikiem operacyjnego usunięcia masy guza, a nie skutecznego leczenia.

Rodzina białkowych kinaz serynowo-treoninowych PKC (*protein kinase C*) stanowi grupę białek, biorących udział w regulacji cyklu komórkowego. PKC powodują zatrzymanie cyklu w fazie G1 komórek raka piersi na drodze szlaku przekazywania sygnału PKC-ERK-MAPK-JNK-Rb (ERK – *extracellular signal-regulated kinase*, MAPK – *mitogen-activated protein kinase*, JNK – *c-Jun NH2-terminal kinase*, Rb – *retinoblastoma*) [55]. Z grupy tych białek wybrano nowe białka, będące molekularnymi wyznacznikami raka piersi, a także będące jednocześnie nowymi obiecującymi celami terapii tej choroby. Dodatkowo odkryto nowy mechanizm, dzięki któremu kwasy trans-retinolowe ATRA (*all-trans retinoic acid*) i antyneoplaston powodują zwiększenie zahamowania wzrostu komórek raka piersi, wywierając efekt na wewnątrzkomórkowe drogi przekazywania sygnałów. ATRA i antyneoplaston wyciszają ekspresję PKC i obniżają stopień fosforylacji białek szlaku ERK-MAPK oraz białka Rb, co w konsekwencji powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Szlak wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów z udziałem PKC stanowi obiecujący cel dla nowych leków [56]. Następnymi kandydatami na wyznaczniki i cele terapii raka piersi są: supresor nowotworów Cap43/NDRG1/Drg-1 (*N-myc downstream-regulated gene 1/ Differentiation-related gene-1*) i białko regulatorowe YB-1 (*Y-box binding protein-1*), wiążące sekwencję Y-box w DNA [56]. Stymulacja estradiolem (E2) komórek raka piersi ER α (+) obniża ekspresję genu *Cap43*. Efekt ten jest zniesiony po podaniu tamoksyfenu i ekspresja genu *Cap43* wzrasta. Zatem produkt genu *Cap43* może stać się nowym molekularnym wyznacznikiem, użytecznym w monitoringu skuteczności terapii lekami antyestrogenowymi. Jądrowe białko YB-1 należy do rodziny białek zawierających domenę szoku hipotermicznego CSD (*cold shock domain*). Ekspresja genu *YB-1* jest pozytywnie skorelowana z ekspresją *HER-2* w komórkach raka piersi i stanowi niezależny czynnik prognostyczny, służący do oceny czasu całkowitego przeżycia. Poziom ekspresji YB-1 koreluje ze stopniem złożoności histopatologicznej raka piersi [56].

Dobrym wyznacznikiem może być koaktywator receptora ER α , AIB1 (SRC-3), którego silną nadekspresję wykazano w liniach komórkowych raka piersi człowieka MCF-7. Jego nadekspresja w komórkach nowotworowych znosi antagonistyczne działanie tamoksyfenu na ER α , co może być przyczyną nieskutecznej terapii lekami z grupy SERM. Bardzo ważną rolę odgrywa tu *HER-2*, od którego prowadzony sygnał aktywuje AIB1 poprzez fosforylację [57].

Celem obecnie stosowanych antracyclin w terapii raka piersi jest topoizomeraza II (TopoII), jądrowy enzym nacinający DNA. Miejscowe rozwinięcie DNA jest niezbędne do procesów transkrypcji, replikacji, a także

naprawy DNA, dlatego m.in. w nadekspresji TopoII leży przyczyna oporności nowotworów zarówno na chemio-, jak i radioterapię [58]. W 5% przypadków raka piersi stwierdza się amplifikację genu *TopoII*, aczkolwiek amplifikacja samego genu nie zawsze wiąże się z podwyższeniem ekspresji na poziomie białka. Wysoka ekspresja TopoII w komórkach nowotworowych wiąże się z słabym stopniem zróżnicowania komórek, wysokim indeksem proliferacyjnym i brakiem receptorów steroidowych, co sprzyja rozwojowi bardzo agresywnych nowotworów [59]. Dodatkowo fakt, iż TopoII jest bardzo ważnym białkiem biorącym udział w naprawie DNA, powoduje, że nowotwory z jej nadekspresją są w stanie szybko naprawić uszkodzenia wywołane chemio-, jak i radioterapią, obniżając prawdopodobieństwa przeżycia chorych na raka piersi. Poziom TopoII jest kandydatem na bardzo dobry wyznacznik predykcyjny, mówiący o skuteczności chemioterapii opartej na antracyclinach, a także pomagający oszacować szansę przeżycia pacjentek z rakiem piersi.

Jednak w dobie rozwoju badań nad molekularnymi wyznacznikami raka piersi, są nowotwory, w przypadku których jedynymi użytecznymi markerami, dającymi lekarzom onkologom podstawy do wyboru terapii, są klasyczne markery: rozmiar guza i stan okolicznych węzłów chłonnych oraz ekspresja receptora estrogenowego ER α . Sytuacja taka ma miejsce w przypadku najtrudniej leczonych tzw. „potrójnie negatywnych” (*triple-negative*) nowotworów piersi o fenotypie ER α (-)/PR(-)/HER-2(-). Ten typ nowotworu nie wykazuje ekspresji ER α , PR ani HER-2, dlatego możliwości uzupełniającego leczenia są ograniczone – nowotwory o takim fenotypie nie reagują na hormonoterapię oraz trastuzumab. W celu opisanego stopnia zaawansowania tego typu raka piersi i ewentualnego wyboru terapii oznacza się inne markery, takie jak: inne niż HER-2 receptory z rodziny EGFR, receptor androgenowy (ADR), P-kadherynę, E-kadherynę, p53, cytokeratyny CK5/6 i CK14. W tego typu nowotworach obserwuje się zanik ekspresji ADR i E-kadheryny, a zwiększenie ekspresji cytokeratyn, P-kadheryny, p53 i EGFR. Nowotwory te są bardzo agresywne, szybko powiększają swoją masę, dają dalekie przerzuty, a chorzy wykazują krótki czas przeżycia [60].

Podsumowanie

Obecnie markery CA15-3, CA 27.29, CEA, ER α , PR, HER-2, uPA i PAI-1 są jedynymi, rekomendowanymi przez ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), markerami molekularnymi raka piersi, badanymi u chorych przyjmowanych na oddziały onkologiczne [61]. Oznaczenie niektórych markerów ulegających ekspresji w komórkach nowotworowych, zarówno w surowicy, jak i wewnątrz lub na powierzchni komórek nowotworowych, daje wgląd w procesy zachodzące w samym nowotworze, pomaga zaprojektować zestaw leków i strategię chemioterapii. Markery odzwierciedlają przebieg i skuteczność prowadzonej terapii i pozwalają na postawienie prognozy. Z tego względu tak cenne jest poszukiwanie nowych markerów, pozwalających na ustalenie typu i fazy nowo-

tworu, w której się aktualnie znajduje. Równie pożądane są prace nad udoskonalaniem czułości i swoistości testów wykrywających określone wyznaczniki.

Aktualnie oznaczane molekularne wyznaczniki raka piersi oraz te, nad których przydatnością wciąż trwają prace, winny być połączone z uznanymi wyznacznikami klinicznymi oraz wzbogacone o metodologię bioinformatyczną. Rak piersi może być indukowany, promowany i ulega progresji z jednoczesnymi zmianami w ekspresji wielu genów, dlatego zastosowanie mikromacierzy cDNA, umożliwiających jednoczesną analizę tysięcy genów, oraz zastosowanie analiz proteomicznych, może znacznie wzmocnić siłę prognozowania w raku piersi. Kombinacja cDNA genów, których udział stwierdzono w raku piersi, będzie użytecznym narzędziem monitorującym procesy zachodzące w komórkach nowotworowych, a dodatkowo dane pochodzące z analizy proteomu dostarczą celów terapii celowanej, zarówno klasycznej, jak i genowej.

Mgr Katarzyna Janik-Papis
Katedra Genetyki Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Piśmiennictwo

- Nakata B, Ogawa Y, Ishikawa T i wsp. Serum CYFRA 21-1 is one of the most reliable tumor markers for breast carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1285-90.
- Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M i wsp. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2593-600.
- Einarsson R, Lindman H, Bergh J. Use of TPS and CA 15-3 assays for monitoring chemotherapy in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Res* 2000; 20: 5089-94.
- von Mensdorff-Pouilly S, Snijdwint FGM, Verstraeten AA i wsp. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 343-56.
- Hudson MJ, Stamp GW, Chaudhary KS i wsp. Human MUC1 mucin: a potent glandular morphogen. *J Pathol* 2001; 194: 373-83.
- Yin L, Li Y, Ren J i wsp. Human MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2003; 278: 35458-64.
- Lindblom A, Liljegren A. Tumour markers in malignancies. *Clin Rev* 2000; 320: 424-7.
- Gion M, Boracchi P, Dittadi R i wsp. Prognostic role of serum CA 15.3 in 362 node-negative breast cancers: An old player for a new game. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1181-8.
- Kumpulainen EJ, Kesikuru RJ, Johansson RT. Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76: 95-102.
- Gion M, Mione R, Leon A i wsp. CA 27.29: a valuable marker for breast cancer management. A confirmatory multicentric study on 603 cases. *Eur J Cancer* 2001; 37: 355-63.
- Tampellini M, Berruti A, Gorzegno G i wsp. Independent factors predict supranormal CA 15-3 serum levels in advanced breast cancer patients at first disease relapse. *Tumor Biol* 2001; 22: 367-73.
- Kokko R, Holli K, Hakama M. CA 15-3 in the follow-up of localised breast cancer: a prospective study. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1189-93.
- Skubitz AP. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res* 2002; 107: 305-29.
- Burguignon LY. CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 287-97.
- Morris SF, O'Hanlon DM, McLaughlin R. The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in Stage II breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 527-31.
- Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1607-20.
- Kenemas P, Verstraeten R.A, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas* 2004; 49: 34-43.
- Yoshida R, Kimura N, Harada Y i wsp. The loss of E-cadherin, a- and b-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 513-20.
- Gillett CE, Miles DW, Ryder K i wsp. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2001; 193: 433-41.
- Cheng CW, Wu PE, Yu JC i wsp. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 2001; 20: 3814-23.
- Reis-Filho JS, Cancela Paredes J, Milanezi Fi wsp. Clinicopathologic implications of E-cadherin reactivity in patients with lobular carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 2002; 94: 2114-5.
- Kleer CG, van Golen KL, Braun T i wsp. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol* 2001; 14: 458-64.
- Hurd TC, Sait S, Kohga S i wsp. Plasminogen activator system localization in 60 cases of ductal carcinoma in situ. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3117-24.
- Duffy MJ. Biochemical markers in breast cancer: which ones are clinically useful? *Clin Biochem* 2002; 34: 347-52.
- Subramanian R, Gondi CS, Lakka SS i wsp. siRNA-mediated simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2006; 28: 831-9.
- Stillfried GE, Saunders DN, Ranson M. Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R14.
- Meng S, Tripathy D, Shete S i wsp. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 17361-5.
- de Witte JH, Foekens JA, Brünner N i wsp. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in cytosols and pellet extracts derived from primary breast tumours. *Br J Cancer* 2001 85: 85-92.
- Harbeck N, Kates RE, Schmitt M i wsp. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004; 5: 348-52.
- Qin W, Zhu W, Hewett JE i wsp. uPA is upregulated by high dose celecoxib in women at increased risk of developing breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 298-306.
- Descotes F, Riche B, Saez S i wsp. Plasminogen activator inhibitor type 1 is the most significant of the usual tissue prognostic factors in node-negative breast ductal adenocarcinoma independent of urokinase-type plasminogen activator. *Clin Breast Cancer* 2008; 8: 168-77.
- Błasiak J, Beata Smolarz B. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is not associated with breast cancer. *Acta Biochemica Polonica* 2000; 47: 191-9.
- Qin W, Zhu W, Wagner-Mann C. Nipple aspirate fluid expression of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator receptor predicts breast cancer diagnosis and advanced disease. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 948-53.
- Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1000-7.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 161-74.
- Przybyłowska K, Kluczna A, Zadrozny M i wsp. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 95: 65-72.
- Przybyłowska K, Zielinska J, Zadrozny M i wsp. An association between the matrix metalloproteinase 1 promoter gene polymorphism and lymphnode metastasis in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 121-5.
- Bigelow RL, Williams BJ, Carroll JL i wsp. TIMP-1 overexpression promotes tumorigenesis of MDA-MB-231 breast cancer cells and alters expression of a subset of cancer promoting genes in vivo distinct from those observed in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117: 31-44.
- Guo LJ, Luo XH, Xie H i wsp. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 suppresses apoptosis of mouse bone marrow stromal cell line MBA-1. *Calcif Tissue Int* 2006; 78: 285-92.

40. Kuvaja P, Talvensaar-Mattila AT, Turpeenniemi-Hujanen T. High preoperative plasma TIMP-1 is prognostic for early relapse in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 846-51.
41. Evans JF, Kargman SL. Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 627-34.
42. Perrone G, Santini D, Vincenzi B i wsp. COX-2 expression in DCIS: correlation with VEGF, HER-2/neu, prognostic molecular markers and clinicopathological features. *Histopathology* 2005; 46: 561-8.
43. Half E, Ming Tang X, Gwyn K i wsp. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002; 62: 1676-81.
44. Markičević M, Petrović A, Kanjer K i wsp. Estrogen-regulated cut-off values of pS2 and cathepsin D expression in breast carcinomas. *Adv Exp Med Biol* 2008; 617: 341-8.
45. Moiseeva EV, Rapoport EM, Bovin NV i wsp. Galectins as markers of aggressiveness of mouse mammary carcinoma: towards a lectin target therapy of human breast cancer. *Breast Canc Res Treat* 2005; 91: 227-41.
46. Mayoral MA, Mayoral C, Meneses A i wsp. Identification of galectin-3 and mucin-type O glycans in breast cancer and its metastasis to brain. *Cancer Invest* 2008; 26: 615-23.
47. Balan V, Nangia-Makker P, Schwartz AG i wsp. Racial disparity in breast cancer and functional germ line mutation in galectin-3 (rs4644): a pilot study. *Cancer Res* 2008; 68: 10045-50.
48. Pertynski T, Wozniak K, Romanowicz-Makowska H i wsp. Telomerase expression and activity in endometrial cancer. *Experimental Oncology* 2002; 24: 265-9.
49. Blasiak J, Kadlubek M, Kowalik J i wsp. Inhibition of telomerase activity in endometrial cancer cells by selenium-cisplatin conjugate despite suppression of its DNA-damaging activity by sodium ascorbate. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22: 73-82.
50. Hines WC, Fajardo AM, Joste NE i wsp. Quantitative and spatial measurements of telomerase reverse transcriptase expression within normal and malignant human breast tissues. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 503-9.
51. Brown NM, Stenzel TT, Friedman PN. Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 97: 41-7.
52. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN i wsp. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 108: 389-97.
53. Tubbs RR, Swain E, Pettay JD i wsp. An approach to the validation of novel molecular markers of breast cancer via TMA-based FISH scanning. *J Mol Hist* 2007; 38: 141-50.
54. Onda M, Mitsuru Emi M, Nagai H i wsp. Gene expression patterns as marker for 5-year postoperative prognosis of primary breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 537-45.
55. Yokoyama G, Fujii T, Tayama K i wsp. PKC δ and MAPK mediate G1 arrest induced by PMA in SKBR-3 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 720-726.
56. Fujii T, Yokoyama G, Takahashi H i wsp. Preclinical studies of molecular-targeting diagnostic and therapeutic strategies against breast cancer. *Breast Cancer* 2008; 15: 73-8.
57. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1616-22.
58. Di Leo A, Isola J. Topoisomerase IIa as a marker predicting the efficacy of anthracyclines in breast cancer: are we at the end of the beginning? *Clinical Breast Cancer* 2003; 4: 179-86.
59. Nakopoulou L, Lazaris AC, Kavantzis N i wsp. DNA topoisomerase II-a immunoreactivity as a marker of aggressiveness in invasive breast cancer. *Pathobiology* 2000; 68: 137-43.
60. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR i wsp. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 25-32.
61. Barak B, Uziely A, Hubert B i wsp. Prognostic significance of cytokeratin markers in breast cancer in meta analysis V. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2006; 62: 513-25.

Otrzymano: 7 lipca 2009 r.

Przyjęto do druku: 12 października 2009 r.