

Agnieszka Kołacińska, Mariusz Pawlak, Zbigniew Morawiec

Oddział Chirurgii Onkologicznej WSS im. M. Kopernika w Łodzi

Nowoczesne testy diagnostyczne w raku piersi

Novel diagnostic tests for breast cancer

Adres do korespondencji:

dr med. Agnieszka Kołacińska
Oddział Chirurgii Onkologicznej WSS
im. M. Kopernika
ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź
tel.: (042) 689 54 61
faks: (042) 689 50 41
e-mail: agnkol@gazeta.pl

STRESZCZENIE

W niniejszej pracy zaprezentowano nowoczesne testy diagnostyczne stosowane w raku piersi. OncotypeDx jest zbadanym klinicznie, wielogenowym testem dla pacjentów z wczesnym rakiem piersi, za pomocą którego ocenia się prawdopodobieństwo nawrotu choroby oraz przewiduje korzyść z zastosowanej chemioterapii, co umożliwia zaplanowanie optymalnego leczenia. GeneSearch pozwala wykryć przerzuty raka piersi do regionalnych węzłów chłonnych, stanowiąc cenną alternatywę dla współczesnych technik śródoperacyjnych. CellSearch to zaawansowana platforma diagnostyczna analizująca krążące komórki guza u pacjentów z uogólnionym rakiem piersi. Przewiduje ona przeżycia wolne od progresji oraz całkowite przeżycia lepiej niż obecne metody diagnostyczne.

Słowa kluczowe: rak piersi, OncotypeDx, GeneSearch, CellSearch

ABSTRACT

The current paper presents novel diagnostic tests for breast cancer. OncotypeDx is the clinically validated multi-gene assay for early-stage breast cancer that quantifies the likelihood of distant breast cancer recurrence to assist in treatment planning and predicts the magnitude of chemotherapy benefit. GeneSearch is the objective test system for breast cancer lymph node analysis, a viable alternative to current intraoperative techniques. CellSearch is an advanced diagnostic platform for the analysis of circulating tumor cells (CTC) in patients with metastatic breast cancer. Circulating tumor cells analysis provides valuable diagnostic information for predicting progression-free survival and overall survival earlier than the current standard of care.

Key words: breast cancer, OncotypeDx, GeneSearch, CellSearch

Onkologia w Praktyce Klinicznej
Tom 3, nr 2, 56-58
Copyright © 2007 Via Medica
ISSN 1734-3542
www.opk.viamedica.pl

Wstęp

W grudniu 2006 roku autorka niniejszej pracy uczestniczyła w 29. Sympozjum Raka Piersi w San Antonio. W artykule przedstawiono trzy nowoczesne testy diagnostyczne, które omówiono podczas tej konferencji: OncotypeDx™, GeneSearch™ oraz CellSearch™.

OncotypeDX

Od pewnego czasu w piśmiennictwie onkologicznym pojawiają się opinie, iż takie czynniki, jak wiek pacjenta, typ

histologiczny raka, jego średnica, stan receptorów dla estrogenów (ER, *estrogen receptor*) i progesteronów (PR, *progesterone receptor*), stan receptorów HER2, stopień histologicznej złośliwości czy stan regionalnych węzłów chłonnych (cecha N) nie są wystarczające dla zaplanowania indywidualnie dostosowanej, pooperacyjnej terapii raka piersi [1, 2]. OncotypeDx wydaje się sprostac tym wyzwaniom, dostarczając dodatkowych informacji, określając punktację nawrotu choroby oraz przewidując prawdopodobieństwo przerzutów raka piersi w ciągu 10 lat u pacjentek z wczesnym rakiem piersi, bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych N0 oraz z dodatnimi receptorami estrogenowymi ER(+) [3].

Impulsem do powstania testu OncotypeDx była analiza 250 genów, a następnie selekcja 21 z nich w badaniach preparatów parafinowych metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR, *reverse transcription — polymerase chain reaction*) pacjentów z badań naukowych *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) B-20, B-14 czy *Kaiser Permanente*. Obecnie prace potwierdzające skuteczność OncotypeDx przeprowadza się w ramach TAILORx [4, 5].

Zatem OncotypeDx jest 21-genowym testem, który w sposób ilościowy ocenia prawdopodobieństwo nawrotu raka piersi, dzięki temu wspomagając zaplanowanie najbardziej optymalnego leczenia. Wyniki testu przedstawia się w postaci punktacji nawrotu (RS, *recurrence score*) — 0–100, która swoiście koreluje z prawdopodobieństwem wznowy raka piersi w ciągu 10 lat od postawienia rozpoznania. Ponadto zastosowanie OncotypeDx u pacjentów włączonych do badania NSABP B-20 pozwoliło przewidzieć wielkość korzyści odniesionych z adiuwantowej chemioterapii (CMF: cyklofosfamid, metotreksat, 5-fluorouracyl) [1, 2, 5, 6].

Punktację nawrotu oblicza się na podstawie ekspresji 16 genów charakterystycznych dla raka i 5 genów referencyjnych, wyselekcjonowanych w wymienionych badaniach klinicznych jako geny z największą siłą predykcyjną oraz statystycznie najsilniej związane z potencjalnym rozsiewem. Powyższe 21 genów to geny związane z proliferacją: Ki-67, STK 15 (*serine/threonine kinases*), surwiwina, cyklina B1, MYBL2 (*v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2*); z inwazją: stromelizyna 3, katepsyna L2; HER2: GRB7 (*growth factor receptor-bound protein 7*), HER2; hormonalne: ER, PR, Bcl2, SCUBE2 (*signal peptide CUB domain EGF-like 2*), GTSM1 (*glutathione S-transferase M1*), CD68 (*cluster of differentiation 68*), BAG1 (*Bcl2-associated athanogene*); oraz referencyjne: β -aktyna, GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), RPLPO (*human acidic ribosomal phosphoprotein PO*), GUS (*glucuronidase*), TFRC (*transferrin receptor*). Punktację nawrotu (RS) przedstawia się w formie matematycznego wzoru:

$$\begin{aligned} RS = & +0,47 \times \text{punktacja grupy HER2} \\ & -0,34 \times \text{punktacja grupy ER} \\ & +1,04 \times \text{punktacja grupy proliferacji} \\ & +0,10 \times \text{punktacja grupy inwazji} \\ & +0,05 \times CD68 \\ & -0,08 \times GSTM1 \\ & -0,07 \times BAG1 \end{aligned}$$

Wyróżnia się następujące kategorie ryzyka nawrotu raka piersi:

- małe — RS < 18;
- średnie — RS 18–31;
- duże — RS > 31 [3].

Paik i wsp. stwierdzili, że 10-letnie przeżycia wolne od nawrotu w grupie pacjentów NSABP B-14, z wczesnym

rakiem piersi, N0, ER+, z małym oraz dużym ryzykiem wznowy choroby określonej na podstawie analizy genowej OncotypeDx wynosiły odpowiednio 93% i 69%, a różnica ta była istotna statystycznie [4].

Ponadto OncotypeDx przewiduje wielkość korzyści odniesionych z chemioterapii. Jedynie chore z dużym ryzykiem nawrotu odniosły 28-procentową absolutną korzyść z dołączenia chemioterapii do tamoksyfenu. Pacjentki, u których ryzyko nawrotu jest małe i średnie, odnoszą niewielką lub żadną korzyść z chemioterapii [1].

Metodologia testu OncotypeDx obejmuje analizę bloczka parafinowego lub 6 10-mikronowych przekrojów (3 przekroje w każdej z 2 probówek dostarczonej przez producenta) i 1 szkiełka barwionego hematoksyliną i eozyną z preparatu raka piersi. Tak przygotowany materiał tkankowy przesyłany jest do amerykańskiego laboratorium *Genomic Health*. Wyniki testu dostarczane są lekarzowi prowadzącemu leczenie i patologowi za pomocą faksu lub drogą elektroniczną w systemie zabezpieczeń. Opis wyniku zawiera:

- dane personalne pacjenta;
- opis testu: OncotypeDx używa metody RT-PCR do oceny ekspresji panelu 21 genów w tkance raka piersi, RS oblicza się na podstawie wyników ekspresji poszczególnych genów przy zastosowaniu opracowanego wzoru matematycznego. Punktacja nawrotu zawiera się w granicach 0–100;
- wyniki przedstawiane są liczbowo i na wykresie: jeśli u pacjentki obliczona RS wynosi na przykład 10, to oszacowane przeciętne ryzyko wznowy raka piersi u tej chorej w ciągu 10 lat stanowi około 7% na podstawie wykresu (prospektywnie definiowane punkty odcięcia w grupie 668 pacjentek z wczesnym rakiem piersi, N0, ER+, leczonych tamoksyfenem — kliniczne badanie walidacyjne testu OncotypeDx, oś X wykresu — punktacja nawrotu; oś Y — przeciętne ryzyko nawrotu w ciągu 10 lat) [3, 4].

Podsumowując, OncotypeDx:

- przewiduje prawdopodobieństwo nawrotu raka piersi w ciągu 10 lat w postaci punktacji nawrotu;
- określa korzyści odniesione przez chorą z leczenia adiuwantowego w zakresie chemioterapii i hormonoterapii;
- stanowi spektakularne osiągnięcie w erze medycyny personalnej raka piersi;
- stanowi źródło genetycznego/molekularnego podpisu raka piersi dopełniającego powszechnie znane czynniki prognostyczne i predykcyjne, pozwalając zaplanować optymalną terapię [5].

GeneSearch

GeneSearch jest testem, którego celem jest szybkie wykrywanie klinicznie znaczących — powyżej 0,2 mm — przerzutów raka piersi w usuniętym węźle/węzłach

u pacjentów z rakiem piersi przy użyciu 2 markerów: cytokeratyny 19 i mammoglobiny z zastosowaniem metody RT-PCR. Otrzymane wyniki pozwalają na podjęcie decyzji w zakresie wykonania pełnej limfadenektomii pachowej i oceny stopnia zaawansowania schorzenia (*staging*) [7].

GeneSearch stanowi cenną alternatywę dla współczesnych technik śródoperacyjnych badań węzłów chłonnych. W badaniach klinicznych zaprezentowanych podczas Sympozjum Raka Piersi w San Antonio, przeprowadzonych wśród 416 pacjentów, u których usunięto węzeł chłonny wartowniczy w raku piersi, wykazano:

- większą czułość testu GeneSearch w porównaniu z badaniem histopatologicznym skrawków mrożonych i biopsji odciskowej, porównywalną z barwieniem hematoksyliną i eozyną oraz badaniem immunohistochemicznym;
- znacząco lepszą identyfikację przerzutów zrazikowego raka piersi w porównaniu z badaniem śródoperacyjnym (skrawki mrożone);
- większą czułość testu GeneSearch w porównaniu z innymi technikami śródoperacyjnymi, co pozwoli zmniejszyć częstość ponownych przyjęć chorych na bloku operacyjnym w celu wykonania drugiego etapu zabiegu w pasze po biopsji węzła wartowniczego [8].

CellSearch

CellSearch wykrywa krążące komórki guza (KKG) u pacjentów w IV stopniu zaawansowania raka piersi [9, 10]. Powyższa analiza dostarcza cennych informacji diagnostycznych dla przewidywania przeżyć wolnych od progresji choroby i całkowitych przeżyć wcześniej niż obecny standard postępowania obejmujący badania diagnostyki obrazowej. Test CellSearch pozwala wykryć już pojedynczą krążącą komórkę nowotworową w 7,5 ml krwi, a jego swoistość równa 99,99% dla poziomu KKG większego lub równego 5 KKG prawie całkowicie eliminuje wyniki fałszywie dodatnie. Używając punkt odcięcia 5 KKG w 7,5 ml krwi wykazano, iż CellSearch w sposób niezależny i wiarygodny przewiduje przeżycia wolne od progresji i przeżycia całkowite u pacjentów leczonych z powodu uogólnionego raka piersi. W ten sposób CellSearch ulepsza stratyfikację chorych i optymalizuje dobór indywidualnych opcji terapeutycznych. I tak na przykład średnie całkowite przeżycie u chorych leczonych z powodu uogólnionego raka piersi z poziomem KKG poniżej 5 wynosiło 21,9 miesiąca, podczas gdy u pacjentów z poziomem KKG powyżej 5 — 10,9 miesiąca ($p = 0,0001$) [11].

Budd i wsp. u chorych leczonych w IV stopniu zaawansowania raka piersi z progresją choroby odnotowaną w badaniach radiologicznych wykazali 3-krotnie dłuższe przeżycia u pacjentów z poziomem KKG poniżej 5 niż u chorych z poziomem KKG powyżej 5 w teście CellSearch [12].

Procedura testu CellSearch obejmuje techniki immunomagnetyczne, krążące komórki guza identyfikowane są jako CD45–, EpCAM+ (*epithelial cell adhesion molecule*) (cząsteczki adhezyjne obecne na powierzchni komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego) oraz cytokeratyna 8, 18 i/lub 19+ [11].

Podsumowanie

Omówione powyżej nowoczesne testy w szybki i precyzyjny sposób wspomagają i ulepszają diagnostykę raka piersi, zarówno we wczesnym, jak i zaawansowanym stadium choroby, umożliwiając jednocześnie dobór najbardziej właściwych opcji terapeutycznych do indywidualnych potrzeb i oczekiwań chorego oraz prowadzącego leczenie onkologa.

Ujawnienie potencjalnego konfliktu interesów

Ponieważ w artykule użyto komercyjnych nazw testów diagnostycznych, autorzy pracy deklarują, że ani oni, ani ich najbliższe rodziny nie są pracownikami lub konsultantami Genomic Health oraz Veridex LLC, Johnson & Johnson com. oraz nie przyjmowali wynagrodzeń od powyższych firm.

Piśmiennictwo

1. Paik S., Tang G., Shak S. i wsp. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 3726–3734.
2. Paik S., Tang G., Shak S. i wsp. Multi-gene RT-PCR assay for predicting recurrence in node-negative breast cancer patients- NSABP Studies B-20 and B-14. Presented at the 26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 3-6 grudnia 2003; abstract 16.
3. OncotypeDx Breast Cancer Assay (instruction for use). Genomic Health, Inc. 2006.
4. Paik S., Shak S., Tang G. i wsp. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 2817–2826.
5. Sparano J.A. The TAILORx trial: individualized options for treatment. *Comm. Oncol.* 2006; 3: 494–496.
6. Esteban J., Baker J., Cronin M. i wsp. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer: multi-gene RT-PCR assay of paraffin-embedded tissue. Zaprezentowano podczas: 39th Meeting of the American Society of Clinical Oncology. 31 maja – 3 czerwca 2003, Chicago; abstract 3416.
7. Kurosumi M., Kobayashi Y., Takei H. i wsp. Higher accuracy confirmed by 0.2 mm interval section analysis in the detection of lymph node metastases using real time RT-PCR assay system in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2006; Supl. 1: S86, abstract 2018.
8. GeneSearch Veridex LLC, Johnson & Johnson com. (instructions for use) 2006.
9. Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J. i wsp. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 781–791.
10. Cristofanilli M., Hayes D.F., Budd G.T. i wsp. Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 1420–1430.
11. CellSearch Circulating Tumor Cell Test Kit (instruction for use). Warren, NJ Veridex, LLC; 2005.
12. Budd G.T., Cristofanilli M., Ellis M.J. i wsp. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 6403–6409.