

# VÝZNAM ANALÝZY GÉNOVEJ EXPRESIE V PREDPOVEDI PROGNÓZY A LIEČEBNEJ ODPOVEDE PRI KARCINÓME PRSNEJ ŽĽAZY

Karol Kajo, Lukáš Plank

Ústav patologickej anatómie JLF UK a MFN, Martin

Súčasťou diagnosticko-terapeutického manažmentu pri karcinóme prsnej žľazy (CaPŽ) je určenie prognostických a prediktívnych faktorov. Keďže na základe doteraz používaných ukazovateľov (morfológických – veľkosť, typ, grade, stav lymfatických uzlín, resp. biologicko-molekulových – estrogénové a progesterónové receptory, HER2) nie je vždy možná exaktná predikcia prognózy, resp. odpovede na liečbu, hľadajú sa nové možnosti presnejšej stratifikácie pacientov. CaPŽ predstavuje heterogénne onkologické ochorenie, ktorého variabilita klinického aj morfológického obrazu je spôsobená genetickými a epigenetickými príčinami. Preto jednou z perspektívnych ciest sú analýzy génovej expresie. V prehľade sa uvádzajú niektoré z profilov génovej expresie, ktoré napomáhajú v pochopení biologického správania CaPŽ, predikcii prognózy a odpovede na liečebné modalitty pri tomto ochorení. V diskusii sa rozoberajú názorové prúdy na perspektívy, limity a možnosti uplatňovania multiparametrických molekulových analýz v bežnej praxi.

**Kľúčové slová:** prsník, karcinóm, imunohistochemia, génová expresia, prognóza.

**SIGNIFICANCE OF GENE EXPRESSION PROFILING FOR PREDICTION OF PROGNOSIS AND THERAPY RESPONSE IN BREAST CARCINOMA**  
Determination of prognostic and predictive factors represents an important part of breast carcinoma (BC) diagnostic and therapeutic management. Because both traditional morphological (tumor size, carcinoma type, histological grade, lymph node status) and biological parameters (analysis of hormone receptors and HER2) do not always lead to the exact prediction of prognosis and/or therapeutical response, new approaches are researched to allow a more precise patient's stratification. BC represents a heterogeneous oncological disease and its clinical and morphological variability is based on genetic and epigenetic changes. That is the reason why the BC gene expression analysis seems to be very promising. In the review, some gene expression profiles are presented and discussed to understand better the biological behavior of the breast carcinoma, as well as prediction of its prognosis and response to therapeutical modalities. In conclusion, some opinions, perspectives, limits and possibilities of practical utilization of these multiparametric methods are discussed.

**Key words:** breast, carcinoma, immunohistochemistry, gene expression, prognosis.

Onkológia (Bratisl.), 2008, roč. 3 (4): 224–229

## Úvod

Karcinóm prsnej žľazy (CaPŽ) je z hľadiska klinického priebehu a morfológického obrazu značne heterogénne onkologické ochorenie. Je známe, že za túto fenotypickú variabilitu sú zodpovedné genetické a epigenetické zmeny, ktoré vedú k narušeniu rovnováhy medzi bunkovou proliferáciou, apoptózou, diferenciáciou, starnutím a mechanizmami kontrolujúcimi tieto bunkové procesy. Všeobecne teda ide o komplexnú poruchu regulácie bunkových mechanizmov s alteráciami subcelulárnych štruktúr, z čoho pramení takmer nekonečné množstvo variácií s početnými morfológickými obrazmi a rozdielnou závažnosťou priebehu ochorenia. Vyjadriť sa teda k novej prognóze ochorenia, znamená zväziť viaceré faktory a mechanizmy a na základe znalosti ich korelácie s priebehom, resp. s predikciou na určité liečebné modalitty, zaradiť daného pacienta do určitej prognostickej alebo prediktívnej kategórie.

Doteraz bol výber prognostických a prediktívnych faktorov pri CaPŽ založený na jednotlivých klasických morfológických (veľkosť, resp. rozsah nádoru, stav lymfatických uzlín – LU, typ a stupeň diferenciácie karcinómu) a niektorých biologických parametroch. Z molekulových prognosticko-prediktívnych faktorov sa z veľkého počtu potenciálnych

parametrov vyseletovali len tri markery, a to stav hormónových receptorov (estrogénových – ER a progesterónových – PR) a HER2 (1). Ide o parametre, ktoré sa ukázali byť nezávislými prognostickými alebo prediktívnymi faktormi. Ich prognostickú informáciu je možné zvýrazniť, ak sú hodnotené komplexne v podobe multiparametrických indexov a kritérií, napr. TNM staging, Nottinghamský prognostický index, a pod. (2) a tiež sú podstatou viacerých štandardných odporúčaní (3, 4, 5).

Potvrdilo sa však, že len na základe týchto ukazovateľov nie je možné identifikovať časť pacientov s negatívnymi LU, ktorí sú ohrození rekurenciou a sú kandidátmi na adjuvantnú systémovú liečbu. Na druhej strane, je snaha uchrániť od zbytočnej chemoterapie tých pacientov, ktorí sú chirurgickým zákrokom vyliečení, a teda nepotrebnú ďalšiu cytostatickú liečbu. Je teda potrebná presnejšia stratifikácia pacientov s CaPŽ najmä vo včasných štádiách ochorenia. Navyše, základným trendom v onkológii sa stáva „osobná medicína“ založená na poskytnutí cielenej liečby pre každého pacienta (6) a jej podkladom je práve znalosť presného prognostického či prediktívneho profilu a identifikácia chybných genetických alebo epigenetických mechanizmov.

## Ako ďalej v predikcii prognózy a odpovede na liečbu?

Po kompletizácii ľudského genómu sa otvorili možnosti analýzy expresie tisícok génov v nádorovom tkanive. Ide o opis aktivity génu, t. j. koľkokrát je daný gén prepísaný, alebo koľko produkuje výsledného proteínu. Tieto poznatky nás obohatili o nové informácie o biologickej povahe nádorov, pomohli nám prostredníctvom snímania množstva nádorových podpisov, t. j. kolekcii abnormálnej expresie génov pri vytvorení novej taxonómie CaPŽ, ale aj pri triedení nádorov do skupín s rozdielnymi charakteristikami (6, 7). Tieto signatúry by mohli poskytnúť omnoho presnejšie informácie ako v súčasnosti používané prognostické a prediktívne faktory.

Na stanovenie multigénových prediktorov sa využívajú metódy vyšetrovania založené jednak na morfológii – imunohistochemia (IHC), fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH), ako aj nemorfológické techniky, ako sú kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (QRT-PCR) a génová mikroarray. Prvé tri z nich je možné zvyčajne stanoviť z materiálu fixovanom vo formalíne a zaliatom do parafínu, a teda aj z archivovaného materiálu, avšak mikroarrayové profilácie si vyžadujú čerstvé nádorové tkanivo. Niektoré z týchto testov sú dokonca komerčne prístupné, napr. Oncotype DX™, MammaPrint®,

Mammostrat®, pričom cena imunohistochemickej detekcie sa pohybuje v rozpätí 300 – 600 \$, pri FISH je cena 300 – 600 \$, avšak cena pri RT-PCR, ako aj mikroarray je uvádzaná od 3500 \$ (8).

### Molekulová klasifikácia a jej význam z hľadiska prognózy karcinómu prsnej žľazy

Pomocou rozdielnych vzorov géovej expisie sa podarilo vytvoriť molekulový „portrét“ CaPŽ, pri ktorom základnými diskriminačnými faktormi sú gény asociované so stavom ER, HER2 a proliferlačnej aktivity. Už na základe samotného ER by CaPŽ mohli byť rozdelené do dvoch základných skupín, a to na nádory exprimujúce ER a gény spojené s ich aktiváciou (napr. cyclin D1) a na ER-negatívne karcinómy. Prvé z nich predstavujú lumenálnu skupinu a druhé sa ďalej rozdeľujú na bazaloidné, HER2-pozitívne a CaPŽ s normálnym prsníkovým genotypom (9, 10). **Luminálne karcinómy** tvoria 34 – 66 % všetkých CaPŽ a sú charakteristické pozitívitou lumenálnych cytokeratínov (CK) typu 8/18. Táto skupina v súčasnosti delí na 3 podskupiny – A, B a C, pričom podskupina A je spojená s vyššou expresiou ER a estrogénmi regulovanými a asociovanými génmi (napríklad GATA3 a hepatocytový jadrový faktor 3). Nádory v podskupine B majú nízku až strednú úroveň expisie génov špecifických pre lumenálnu skupinu a vyššiu expresiu génov asociovaných s proliferáciou a bunkovým cyklom, napríklad MYB, pričom časť z nich môže byť zároveň HER2 pozitívna. V podskupine C sú nádory charakterizované vysokou úrovňou koexpresie dosiaľ neidentifikovaných, resp. neznámych skupín génov (7, 10). Ukázalo sa, že klinické prežívanie pacientov s lumenálnymi A nádormi je podstatne lepšie ako prognóza pacientov v ostatných skupinách a podskupinách, a to aj napriek tomu, že tieto nádory boli lokálne pokročilé. To svedčí pre ich prognosticky priaznivú nádorovú biológiu s limitovaným metastatickým potenciálom.

**Bazaloidné CaPŽ** predstavujú 16 – 37 % CaPŽ a vykazujú expresiu CK 5, CK 6 a CK 17, laminínu, c-kitu, EGFR a proliferlačné gény zahrnuté v p21 sprostredkovanvej signalizácii. Do tejto skupiny patrí 80 – 90 % tzv. „trojito negatívnych“ karcinómov (ER-, PR-, HER2-negatívne) (7) a väčšina nádorov od pacientov s mutáciami BRCA1.

**HER2-pozitívne CaPŽ** tvoria 4 – 10 % CaPŽ a vyznačujú sa nadmernou expresiou HER2 a ostatných génov lokalizovaných v ERB2 amplikóne (napríklad GRB7, MLN64, TRAF4, GATA4). Prípady s bazaloidnými a HER2-pozitívnymi karcinómami sú často spojené s mutáciami p53, agresívnym správaním, zlou prognózou, rezistenciou na hormónovú liečbu sú viac senzitivné na chemoterapiu. Tieto pozorovania sú v niektorých ohľadoch logické, pretože je zreteľná korelácia medzi molekulovými podtypmi a konvenčnými histopatologickými faktormi. Napríklad v jednej štúdií

boli všetky lumenálne karcinómy ER pozitívne a 63 % z nich bolo dobre a stredne diferencovaných, zatiaľ čo 95 % bazaloidných karcinómov bolo ER-negatívnych a až 91 % z nich bolo zle diferencovaných (11).

**CaPŽ pripomínajúce normálne tkanivo prsníka** predstavujú do 10 % prsníkových karcinómov a vykazujú expresiu génov charakteristických pre tukové tkanivo a ostatné neepitelové bunky prsníka. Prognóza týchto nádorov je lepšia ako pri bazaloidných CaPŽ (7). Ďalším typom by mohla byť forma CaPŽ charakterizovaná vysokou expresiou génov regulovaných interferénom, ktorá je spojená so zlou prognózou a s metastázovaním do LU (6). Na základe štatistických metaanalýz je možné definovať len tri základné podtypy CaPŽ, a to: HER2-pozitívne, ER-pozitívne/HER2-negatívne (lumenálne) a ER-negatívne/HER2-negatívne (bazálne) CaPŽ (6, 8). V súčasnosti sa v súvislosti s molekulovou klasifikáciou a určovaním prognózy, resp. prospechu osobnej liečby spomína tzv. Breast BioClassifier, čo je QRT-PCR test založený na analýze expisie 50- génov pre identifikáciu lumenálnych A a B podtypov, HER2-pozitívnych a bazaloidných CaPŽ (8).

### Molekulový grading

Histologický grading poskytuje dôležité klinické a prognostické informácie, a preto je využívaný v predoperačnom, ale najmä pooperačnom manažmente a terapeutických algoritmoch. Jeho hlavnou nevýhodou je, že je trojstupňový, a teda medzi dvoma prognosticky najvýznamnejšími stupňami G1 a G3 je zaradený grade 2, ktorého hodnotenie je obvykle problematické. Tento stredný stupeň mnohokrát predstavuje „odpadkový kôš“ pre prípady, kde nádor nie je možné histologicky jednoznačne zaradiť do G1 alebo G3. Na základe analýzy 97 génov prevažne zohrávajúcich úlohu v regulácii bunkového cyklu a proliferácie boli reklasifikované prípady s trojstupňovým gradingom do dvoch molekulovo odlišných stupňov. Bol vytvorený tzv. *Genomic Grade Index* (molekulový grade), pomocou ktorého boli prípady s histologickým stredným stupňom preradené buď do grade 3 alebo grade 1, podľa podobnosti expisie génového profilu s oboma stupňami (12).

### Multigénové vyšetrenia za účelom stanovenia prognózy a odpovede na liečbu

Už spomínané štúdie standfordskej a nórskej skupiny, na základe ktorých boli CaPŽ rozdelené do 4 základných typov, priniesli informácie o rozdielnom biologickom správaní medzi jednotlivými skupinami (9, 10).

### 70-génový podpis

Z hľadiska posudzovania prognózy pomocou analýzy géovej expisie bola pionierskou štúdiou Van't Veera et al. (13), ktorí vyvinuli 70-génový profil založený na analýze spektra génov bunkového cyklu, invázie,

metastázovania a angiogenézy. Pomocou neho mohli klasifikovať pacientky do 55. rokov veku a s negatívnymi LU do 2 skupín, a to so zlou prognózou (so zaznamenanými rekurenciami alebo metastázami v priebehu 5 rokov) a s dobrou prognózou (bez rekurencie v priebehu 5 rokov). Podarilo sa im s 83 % presnosťou predpovedať prognózu, pričom v prognosticky zlej skupine bolo správne klasifikovaných až 31 z 34 pacientov. U mladších žien sa vyskytovali skôr agresívnejšie fenotypy s vysoko malígnymi nádormi vo viac ako dvoch tretinách a cievnou inváziou v takmer jednej tretine.

**MammaPrint®** (Molecular Profiling Institute Inc., Phoenix, AZ a Agendia BV, Amsterdam, The Netherlands) je komerčne prístupný 70-génový DNA-mikroarrayový test na hodnotenie CaPŽ u pacientov v I. alebo II. štádiu s pozitívnymi aj negatívnymi ER a negatívnymi LU. V roku 2006 boli zverejnené výsledky medzinárodnej štúdie, na ktorej participovalo 40 partnerov z 21 európskych krajín – TRANSBIG (14). Cieľom štúdie bolo určiť, či 70-génová expresia poskytuje prognostickú informáciu nezávislú od klinických hodnotení. V štúdií bolo zahrnutých 307 pacientov z 5 centier, ktorí boli rozdelení do vysoko a nízko rizikových skupín na základe géovového podpisu a klinických parametrov. Išlo o prípady, ktoré boli diagnostikované pred rokom 1999 vo veku do 60 rokov, boli s nádormi do 5 cm a s negatívnymi LU a neboli liečené adjuvantnou systémovou terapiou. Výsledky tejto štúdie ukázali, že 70-génový podpis prekonáva bežné klinicko-patologické hodnotenie rizika a jeho prognostická úroveň je takmer úplne nezávislá na výsledkoch klinického rizika. Pod koordináciu Európskej organizácie pre výskum a liečbu rakoviny prebieha multicentrickú prospektívnu III. fázu randomizovanej štúdie MINDACT (*Microarray In Node negative Disease may Avoid Chemotherapy*) na porovnanie 70-génovej expisie s klinicko-patologickými kritériami pri výbere pacientov pre adjuvantnú chemoterapiu v CaPŽ s negatívnymi LU. Pacienti, ktorí sú zaradení medzi vysokorizikovú skupinu podľa klasických prognostických ukazovateľov (Adjuvant Online) a tiež podľa 70-génového profilu, dostávajú chemoterapiu. Tie prípady, ktoré sú v nízkorizikovej skupine adjuvantnú chemoterapiu nedostávajú. Pacienti, ktorí sú podľa klasických prognostických faktorov zaradení do vysoko rizikovej skupiny a podľa 70-génovej signatúry do nízkorizikovej kategórie, potom randomizovane dostávajú, resp. nedostávajú chemoterapiu (15). Americká spoločnosť klinickej onkológie (ASCO), NCCN, ani novšie odporúčania zo St. Gallena neodporúčajú zatiaľ tento test využívať v terapeutickom manažmente (4, 5, 16).

### Oncotype DX™

Cieľom Oncotype DX™ (Genomic Health, Inc., Redwood City, CA, USA) je vyjadrenie pravdepodobnosti vzdialenej rekurencie u pacientov s CaPŽ a zároveň pomôcť pri hodnotení prospechu chemoterapie.

Pôvodné štúdie, na ktorých bol testovaný Oncotype DX™, využili prípady z predchádzajúcich klinických štúdií NSABP 14 a 20 (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*). Týmto testom je možné vyšetrovať bežný materiál fixovaný vo formalíne a zaliaty do parafínu, pričom ako metóda sa využíva QRT-PCR za účelom analýzy expície 21 génov. Z jej výsledkov je potom stanovené skóre rekurencie (*Recurrence Score*, RS). Algoritmus RS bol vytvorený na základe expície 16 génov, ktoré boli vo vzťahu ku karcinómu a 5 referenčných génov. Z „karcinómových“ génov sú zastúpené tie, ktoré regulujú proliferáciu, resp. sú zodpovedné za inváziu alebo sú zaradené do estrogénmi riadených pochodov. Výsledné RS je v rozsahu 1 – 100, pričom RS pod 18 predstavuje nízke riziko, medzi 18 – 31 stredné riziko a nad 31 vysoké riziko. Každé RS koreluje so špecifickou pravdepodobnosťou vzdialenej rekurencie v priebehu 10 rokov u nádorov, ktoré sú ER- pozitívne a s negatívnymi LU (17). Ide o komerčný test, ktorý je realizovaný v laboratóriách *Genomic Health* v USA, pričom podľa údajov zverejnených na ich internetovej stránke bolo od januára 2004 doteraz bolo vyšetrených týmto testom viac ako 33 000 pacientov (8).

V roku 2006 Paik a spol. prezentovali výsledky svojej štúdie, ktorej cieľom bolo určiť, či Oncotype DX™ dokáže predpovedať účinok chemoterapie u časti pacientov (n = 651) zaradených v NSABP 20 protokole, v ktorom pacienti randomizovane dostávali samotný tamoxifén alebo tamoxifén spolu s chemoterapiou – v kombinácii s cyklofosfamidom, metotrexátom a fluorouracilom (CMF) alebo s MF (2, 17, 18). Išlo o pacientov s ER-pozitívnymi nádormi a s negatívnymi LU. Zistilo sa, že účinok chemoterapie narastal so zvyšujúcim sa RS a naopak, pri nízkom RS (pod 18) bola prospešnosť liečby nízka alebo žiadna. V strednej skupine bol účinok liečby bez jednoznačných výsledkov, a preto sa odporúča chemoterapia. Realizované boli viaceré analytické štúdie, ako aj práce ohľadom klinickej validity a využitia tohto testu, ktorých výsledky boli veľmi priaznivé (17).

V prebiehajúcej studii TAILOR (*Trial Assigning Individualized Options for Treatment*), ktorý je sčasti podporovaný Narodným onkologickým ústavom v USA (NCI), sa skúma validácia a uplatňovanie výsledkov Oncotype DX™ štúdie. Táto štúdia sa začala v máji 2006, je podporená viacerými spolupracujúcimi onkologickými skupinami USA a Kanady a plánuje zahnúť viac ako 10 000 prípadov s ER- aj PR-pozitívnymi nádormi. Cieľom je stanoviť, či pacienti v strednej kategórii (RS 11–25) budú alebo nebudú mať prospech z adjuvantnej chemoterapie. Pacienti s RS 10 alebo menej sú na hormonálnej liečbe, prípady s RS 26 a viac sú na kombinovanej hormonálnej a chemoterapii, zatiaľ čo pacienti v strednej skupine sú randomizovaní do dvoch ramien, a to na samotnú hormónovú alebo kombinovanú liečbu. Prvé výsledky tohto trialu sa očakávajú v roku 2013 (8, 17).

### Porovnanie Oncotype DX™ a MammaPrint®

Oba najznámejšie testy multigénovej expície majú svoje výhody aj nevýhody. Zaujímavosťou je, že sa vzájomne prekrývajú len v jednom analyzovanom géne. Výhodou Oncotype DX™ je, že sa môže realizovať na archivovanom materiáli, avšak MammaPrint® poskytuje ďalšie potenciálne farmakogenomické informácie. Navyše MammaPrint® má širšie indikačné pole, pretože zahŕňa ER-pozitívne aj negatívne prípady, a tým aj viac mladších žien. Naproti tomu, Oncotype DX™ bol odskúšaný nielen ako prognostický test, ale poskytol aj informácie o predikcii na tamoxifén a adjuvantnú chemoterapiu (cyklofosfamid, metotrexát, fluorouracil) a ASCO a NCCN odporučili tento test pri predpovedi rizika rekurencie u novo diagnostikovaných prípadov CaPŽ s negatívnymi LU a pozitívnymi ER, ktoré budú liečené tamoxifénom a pri výbere pacientov, ktorí nebudú vyžadovať adjuvantnú chemoterapiu. MammaPrint® bol zaradený len do skupiny „v testovaní“ (5, 16). Oncotype DX™ nie je v Európe odporúčaný a je to najmä vplyvom negatívneho postoja expertov zo St. Gallena (4).

### Rotterdamská signatúra (76-génový test)

Ide o panel 76 génov, ktorý slúži k predikcii pravdepodobnosti vyvinutia metastáz u pacientov s CaPŽ vo včasnom štádiu. Pôvodnou štúdiou bola analýza Wang a spol. z roku 2005, ktorí použili zmrazené nádorové vzorky z nádorovej banky v Rotterdame od 286 pacientov s negatívnymi LU, ktorí nedostali neoadjuvantnú alebo adjuvantnú liečbu. Celkovo bolo zhodnotených 17 819 génov, z ktorých bol vybratý profil 76 génov, pričom 60-génová kolekcia bola od ER- pozitívnych pacientov a druhá 16-génová kolekcia od ER- negatívnych pacientov. Táto signatúra vykazovala 58 % špecifickosť a 93 % senzitivitu pre identifikáciu pacientov so zlou prognózou a ukázala sa byť nezávislým prognostickým faktorom v multifaktoriálnych analýzach pre interval bez metastáz. Pacienti, ktorí vyvinuli vzdialené metastázy v priebehu 5 rokov mali 5, 67-násobne vyššie riziko v porovnaní s prípadmi, ktoré zostali bez metastáz. Autori na základe výsledkov tejto štúdie hodnotili test ako silný nástroj pre identifikáciu pacientov s vysokým rizikom pre vzdialenú rekurenciu, ktorý môže byť užitočný u pacientov s negatívnymi LU a nádormi v rozpätí 10 – 20 mm bez ohľadu na menopauzálny stav (19). Zatiaľ však tento test nie je komerčne prístupný a budú potrebné ďalšie štúdie na potvrdenie jeho validity (8, 17).

### Ostatné testy multigénovej expície na hodnotenie prognózy

Známe sú dva imunohistochemické testy na hodnotenie multigénovej expície, a to *ProEx™Br* (*TriPath Oncology, Durham, NC*) a *Mammostrat®* (*Applied Genomics Inc. Huntsville, AL*). Oba testy sú založené

na princípe komplexnej detekcie piatich rozdielnych markerov pomocou obrazovej analýzy a vyhodnotení formou skórovacieho systému. Výsledné skóre je dané do korelácie s výškou rizika relapsu, čo je dané do korelácie s výškou rizika. Pomocou metódy FISH je možné hodnotenie počtu kópií troch génov u ER-pozitívnych CaPŽ bez ohľadu na stav LU na fixovanom materiáli za účelom predpovede prognózy s využitím tzv. testu *eXagenBC™* (*eXagen Diagnostics, Inc., Albuquerque, NM*). Z ostatných multigénových prognostických testov, ktoré využívajú na detekciu QRT-PCR je *Celera Metastasis Score™* (*Celera, Inc., Rockville, MD, USA*) (8). CaPŽ s metastázami vo vzdialených orgánoch môžu obsahovať tkanivovo-špecifické génové profily. Známe sú 86- a 69-génové profily, pomocou ktorých je možné predpokladať pravdepodobnosť metastázovania do kosti a tiež 54-génový test pre hodnotenie rizika pľúcnych metastáz (6).

### Multigénové analýzy ako nástroj na hodnotenie predikcie

CaPŽ patrí medzi solídne nádory senzitivne na chemoterapiu. Systémová terapia zahŕňa hormónovú liečbu, chemoterapiu, ako i nové modality. V klinickej praxi je chemoterapia aplikovaná empiricky aj napriek skutočnosti, že nie všetci pacienti z nej majú prospech. Dobrým príkladom potreby spoľahlivého prediktívneho faktora je adjuvantná liečba tamoxifénom, ktorý je najčastejšie predpisovaný antiestrogén ženám s včasnými a metastatickými karcinómami s pozitívnymi ER. Pri adjuvancii významne ovplyvňuje celkové prežívanie aj riziko rekurencie, napríklad redukuje ročné riziko rekurencie o 40 % – 50 %. Pravdaže, následne u viac ako 40 % prípadov dochádza k relapsu na podklade intrinsic (de novo) alebo získanej rezistencie. Ma et al. (2004) analyzovali profil expície u 60 pacientov liečených tamoxifénom s použitím 22 000 oligonukleotidov. Pri porovnaní odpovede na tamoxifén a profilom expície sa im podarilo identifikovať 3 silne prediktívne gény: homeobox gén *HOXB13*, interleukin 17B receptor (*IL17BR*) a *EST A1240933* (20). Ukázalo sa, že pomer medzi *HOXB13* a *IL17BR* významne koreluje s rekurenciou a prekonáva ostatné klinicko-patologické ukazovatele u pacientov s ER-pozitívnymi a nádormi, ktoré sú bez metastáz v LU. *HOXB13* gén je lokalizovaný na 17. chromozóme a je výlučne exprimovaný v neoplastických bunkách, zatiaľ čo expresia *IL17BR* sa stráca v invazívnych nádoroch. Význam tohto 2-génového testu je najmä v prípadoch liečených tamoxifénom. Tento RT-PCR test je v súčasnosti komerčne prístupný (*Breast Cancer Two Gene Expression Ratio H/I™* od *Aviara Dx, Inc., Carlsbad, CA, USA*), je možné ho aplikovať na fixovanom materiáli (8).

Jansen a spol. (2005) porovnali profily expície a odpovede na tamoxifén na súbore 46 pacientov s použitím primárneho 81-génového panelu, ktorého gény boli



rozdielne exprimované v skupinách s odpoveďou a bez odpovede na tamoxifen. Z týchto génov bol následne vybratý 44-génový profil, ktorý vykazoval významnú štatistickú koreláciu s odpoveďou, aj napriek tomu, že nebol štatisticky významný v multifaktoriálnych analýzach. Autori pozorovali vyššiu expresiu génov lokalizovaných na 17q21 a 17q22 pri oboch 81- aj 44-génových podpisoch. Hoci HOX13 nebol priamo v ich podpisoch, tento gén je lokalizovaný na 17q21.2, čo by nasvedčovalo skutočnosti, že gény lokalizované na dlhom ramienku 17. chromozómu môžu zohrávať úlohu v rezistencii na tamoxifen. Autori však nezahodnotili účinok nadmernej expresie HER2, ktorý je tiež lokalizovaný na 17q a slúži ako prediktor zlej odpovede na tamoxifen (21).

Ďalšou oblasťou, kde by mikroarray mohla zohrať úlohu, je predikcia neoadjuvantnej liečby, pretože na základe géneho podpisu by mohla byť vybraná liečba a tiež by mohli byť porovnané profily pred a po liečbe. Táto metóda bola použitá aj k vytvoreniu signatúry pre odpoveď na sekvenčnú liečbu paklitaxelom nasledovaným fluoracilom, doxorubicínom a cyklofosamidom (22). Išlo o 74-génový podpis na skupine 24 pacientov a potom testovaná na skupine 18 prípadov, pričom vykazovala 78 % presnosť pri senzitivite 43 % a špecificite 100 %. Tieto výsledky sú veľmi sľubné a mohli by napomôcť pri výbere liečby šitej na mieru. Pravdaže súbory sú zatiaľ príliš malé na vytvorenie definitívnych záverov (22). Z ďalších profilov génovej expresie je známy 92-génový panel vytvorený ako potenciálny prediktor odpovede na taxany s dosiahnutím 92 % špecificity a 83 % senzitivity pri selekcii pacientov na docetaxel senzitivity a docetaxel negatívnej skupiny (8).

## Záver

Každá nová vyšetrovacia metóda alebo možnosť stanovenia prognózy či predikcie na liečbu vyvolá počiatočnú eufóriu, ktorá sa po čase ukáže ako predčasná. Tak to bolo v nedávnej minulosti s imunohistochemiou, ktorá nám spočiatku naskytla takmer neobmedzené možnosti identifikácie rôznych jednotlivých antigénov korelujúcich s prežívaním alebo odpoveďou na určité liečebné modality. Dnes imunohistochemia nesporné predstavuje dôležitý diagnostický nástroj pri CaPŽ v bežnej praxi, avšak po čase sa vyseletovali len tri ukazovatele detekovateľné imunohistochemicky, ktoré našli uplatnenie v liečebných štandardoch, a to: ER, PR a HER2. CaPŽ však nepredstavuje ochorenie len s heterogénnou expresiou ER alebo HER2, ale ide o kolekciu molekulo odlišných neoplastických ochorení prsníka. Preto sa perspektívnou cestou ukazuje uplatňovanie multiparametrických vyšetrení a zavedenie nových testov na hodnotenie génovej expresie, ktoré by mohli byť nápomocné pri klasifikácii, hodnotení stupňa diferenciácie, prognózy a predpovedi odpovede liečby. Treba však zdôrazniť, že molekulové podpisy nádoru budú len doplniť bioptické vyšetrenie o dodatočné informácie, ale

nebudú ho nahrádzať. Nevyhnutnou požiadavkou naďalej ostane komplexné zhodnotenie všetkých klinických, patologických alebo molekulových parametrov, pretože žiaden z nich nie je schopný poskytnúť odpoveď terapie alebo riziko rekurencie, ak je hodnotený izolovane (23). Je logické, že komplexné hodnotenie viacerých parametrov (génov a/alebo proteínov) poskytuje významnejšiu informáciu ako výsledky jednotlivých faktorov (7).

Lyman s Kudererom (2006) spracovali systematický prehľad, v ktorom zahrnuli metaanalýzy a všetky štúdie do roku 2006 využívajúce analýzu génovej expresie (76-, 70-, 64-, 41-, 23- a 21-génového profilu) u pacientov vo včasnom štádiu CaPŽ. V štúdiách bolo celkovo 2 908 pacientov, z ktorých 1 531 bolo zaradených do vysoko rizikovej skupiny na základe génovej expresie. Celková senzitivita bola vysoká (80,6 %), avšak celková špecificita bola nízka (53,6 %). Autori svoj prehľad uzatvárajú, že doterajšie výsledky štúdií svedčia o prognostickom význame analýzy génovej expresie, avšak využitie týchto metód pri terapeutickom rozhodovaní je zatiaľ limitované a vyžaduje si ďalšie štúdie (24). Analýza multigénovej expresie sa ukázala ako lukratívna, a preto vzniklo veľa testov a niektoré z nich sa dokonca stali komerčne dostupné. Keďže ich počet je neúnosne veľký, je na mieste vyčkávací taktika s cieľom vyselektovania tých testov, ktoré budú mať aj praktické využitie. Napriek veľmi sľubným výsledkom

doterajších prác zaoberajúcich sa génovou expresiou, objavili sa aj ich určité limitácie, pretože chýba štandardizovaná predikcia molekulových typov a zatiaľ tiež nie je známy exaktný počet molekulových tried. V tejto súvislosti je potrebné si uvedomiť, že zo spomínaných testov len MammaPrint bol schválený FDA (*Food and Drug Administration*) (8, 16). Ďalšími nepriaznivými faktormi aplikácie týchto testov je ich veľká cena, monopolné postavenie niektorých „výrobných“ laboratórií, ako aj to, že slúžia na analýzu prognózy len určitej časti pacientov, obvykle ER- pozitívnych a HER2-negatívnych CaPŽ s negatívnym stavom LU. Poukazuje sa na sprehladnenie experimentov a ich výsledkov, zostavenie väčších súborov pre všetky štádiá vyvinutia týchto testov, zahŕňajúce skúšobné testy a podobne a samozrejme je nevyhnutná reprodukovateľnosť metód (15).

Záverom treba zdôrazniť nesporný význam analýz génovej expresie v pochopení biológie nádorov, avšak na ich uplatnenie v bežnej praxi si bude potrebné vyčkávať na výsledky prebiehajúcich klinických štúdií.



doc. MUDr. Karol Kajo, PhD.

Ústav patologickej anatómie  
JLF UK a MFN  
Kollárova 2, 036 01 Martin  
e-mail: karol.kajo@post.sk

## Literatúra

1. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology* 2008; 52: 82–90.
2. Pusztai L, Symmans F. Histopathologic and molecular markers of prognosis and response to therapy. In Hunt KK, Rott GL, Strom EA, UETO, NT. (Eds): *Breast Cancer, Sec. Edit., M.D. Anderson Cancer Care Series*, Springer 2008; 323–339.
3. Adjuvant!Online. Prístupné na adrese: <http://www.adjuvantonline.com>
4. Goldhirsch A, Wood W, Gelber R et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 1133–1144.
5. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice guidelines in oncology: invasive breast cancer. 2008. Prístupné na: [www.nccn.org](http://www.nccn.org) (aktualizované 1/08/08).
6. Fu J, Jeffrey SS. Transcriptomic signatures in breast cancer. *Mol BioSyst* 2007; 3: 466–472.
7. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology* 2008; 52: 67–81.
8. Ross JS, Hatzis C, Symmans WF et al. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *The Oncologist* 2008; 13: 477–493.
9. Perou CM, Sorlie T, Eisen MG et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–752.
10. 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: 10869–10874.
11. Rouzier N, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5678–5685.
12. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 262–272.
13. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530–536.
14. Buyse M, Loi S, van't Veer L et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1183–1192.
15. Ioannidis JPA. Is molecular profiling ready for use in clinical decision making? *The Oncologist* 2007; 12: 301–311.
16. Harris L, Fritsche H, Mennel R et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5287–5312.
17. Marchionni L, Wilson RF, Marinopoulos SS, et al. Impact gene expression profiling tests on breast cancer outcomes. *AHRQ Publication No.08-E002*, Rockville, January 2008. 230 s.
18. Paik S, Tang G, Shak S et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer 2006; 24: 3726–3734.
19. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 671–679.
20. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD et al. A two gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004; 5: 607–616.
21. Jansen MP, Foekens JA, van Staveren IL, et al. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 2005; 23: 732–740.
22. Ayers M, Symmans WF, Stec J et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2284–2293.
23. Pusztai L. Current status of prognostic profiling in breast cancer. *The Oncologist* 2008; 13: 350–360.
24. Lyman GH, Kuderer NM. Gene expression profile assays as predictors of recurrence-free survival in early-stage breast cancer: a metaanalysis. *Clin Breast Cancer*. 2006; 7: 372–379.