

MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE A PREDIKTIVNÍ SYSTÉMY KARCINOMU PRSU DEFINOVANÉ NA ZÁKLADĚ PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE

BREAST CANCER MOLECULAR TAXONOMY AND PREDICTIVE SYSTEMS BASED ON GENE EXPRESSION PROFILING

SVOBODA M.^{1,2}, GRELL P.^{1,2}, FABIÁN P.¹, PALÁCOVÁ M.¹, PETRÁKOVÁ, K.¹, NENUTIL R.¹,
HAJDÚCH M.³, VYZULA R.^{1,2}

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

² LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY BRNO

³ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLOMOUC

Souhrn

Karcinomy prsu jsou nejčastějším maligním onemocněním u žen. Jejich vysoká incidence a mortalita způsobují, že se jedná nejenom o medicínský, ale i o závažný společenský problém. I přes značný pokrok, který za posledních 25 let nastal v diagnostice a v léčbě karcinomu prsu, dochází pouze k pozvolnému poklesu mortality. Pacientky sdílející stejná diagnostická a prognostická kritéria stále vykazují značné rozdíly ve vývoji onemocnění, a to i přes jednotnou protinádorovou léčbu. Příčina těchto diskrepancí může být ve stávající histopatologické klasifikaci a v prognostických systémech používaných v klinické praxi. V obou případech jsou do stejných skupin zařazovány karcinomy s odlišným molekulárním profilem a biologickým chováním, neboť histopatologická taxonomie je založena výhradně na morfologických parametrech a prognostické systémy zohledňují pouze velmi limitovaný počet molekulárních prediktivních markerů. Platí-li základní dogma biologických systémů, potom lze diverzitu fenotypu nádorových buněk sledovat na úrovni jejich genomu. Komplexnost těchto změn však předpokládá analýzu stovek až tisíců genů. Velké naděje byly proto vloženy do DNA čipů a dosavadní publikované práce a existence první klinické studie využívající DNA čipy u karcinomu prsu dokazují, že molekulární taxonomie a prediktivní systémy založené na profilech genové exprese představují správnou cestu k dosažení lepších léčebných výsledků tohoto onemocnění.

Klíčová slova: karcinom prsu, DNA čipy, taxonomie, predikce a prognóza, cílená léčba

Summary

Breast cancer is the most common malignant disease in women. Because of its high incidence and mortality, breast cancer is also important community problem. Despite the biologic and clinical advances that have been made in breast cancer diagnostic and treatment during the last 25 years, there is no corresponding reduction of mortality. Breast cancer patients with the same stage of disease can have markedly different treatment responses and overall outcome. It is believed that these discrepancies in clinical behavior are due to molecular differences between histologically similar tumors. DNA microarray technology is capable to reveal such molecular differences. Looking back to DNA microarray studies, that results have been published until now, we can state that all our expectations put in this technology, were filled up. Mainly, the breast cancer molecular taxonomy and predictive systems based on gene expression profiling are the most promising results with the direct impact on the clinical practice.

Key words: breast cancer, microarrays, taxonomy, prediction and prognosis, target therapy

1. Úvod

Vysoká incidence a mortalita karcinomů prsu představuje závažný medicínský a společenský problém (1). Uplynulých 25 let přineslo značný pokrok ve výzkumu karcinomu prsu, jehož výsledky se promítly na všech stupních diagnostického i léčebného procesu tohoto onemocnění. Pro ženy existuje efektivní program preventivních prohlídek. V diagnostice lze využít digitální mammografie, sonografických přístrojů nových generací a magnetické rezonance. Chirurgové jsou schopni provádět záchovné operace prsu a peroperačně detekovat sentinelovou uzlinu. Patologové mají běžně k dispozici imunohistochemické a FISH metody k vyšetřování molekulárních markerů. Kliničtí onkologové mohou použít moderních cytostatik a cílenou léčbu na bázi hormonoterapie, imunoterapie a nízkomole-

kulárních inhibitorů receptorů růstových faktorů. O to víc je však patrná klinická heterogenita průběhu onemocnění, kdy pacientky sdílející stejná diagnostická a prognostická kritéria a/nebo jednotnou léčbu, vykazují značné rozdíly v léčebných výsledcích. Příčina těchto diskrepancí může být ve stávající histopatologické klasifikaci a v prognostických systémech používaných v klinické praxi. V obou případech jsou do stejných skupin zařazovány karcinomy s odlišným molekulárním profilem a biologickým chováním, neboť histopatologická taxonomie je stále založena výhradně na morfologických parametrech a prognostické systémy zohledňují pouze velmi limitovaný počet molekulárních markerů. V důsledku toho dochází pouze k pomalému poklesu mortality, a naopak je patrné, že řada pacientek diagnostikovaných v časných klinických stádiích v rám-

ci screeningu je zbytečně poškozována adjuvantní chemoterapií. Klinická heterogenita karcinomů prsu se odvíjí od genomu nádorových buněk a patologické exprese jeho genů. Jedná se o komplexní změny, které je možné jen s obtížemi studovat s použitím tradičních metod, vhodných spíše k analýze jednoho nebo několika málo genů. Velké naděje byly proto vloženy do DNA čipů. Dosavadní publikované práce a vznik první klinické studie využívající DNA čipy u karcinomu prsu dokazují, že molekulární taxonomie a prediktivní systémy založené na profilech genové exprese představují správnou cestu k dosažení lepších léčebných výsledků tohoto onemocnění. Náš přehledový článek si klade za cíl seznámit svého čtenáře s nejvýznamnějšími poznatky, kterých bylo při studiu biologických vlastností karcinomů prsu dosaženo pomocí technologie DNA čipů a o kterých jsme přesvědčení, že mají zásadní dopad pro klinickou praxi.

2. Molekulární taxonomie karcinomů prsu založená na profilu genové exprese

Therese Sørlie, Charles Perou a kolektiv jejich spolupracovníků (dále jen stanfordská skupina) v roce 2000 analyzovali pomocí DNA čipů vlastní produkce expresi 8102 genů u 65 vzorků karcinomů prsu získaných od 42 pacientek. Společně s těmito primárními tumory zkoumali i tkáň ze zdravé prsní žlázy a nádorové buněčné linie, jenž byly ustaveny z odlišných buněčných komponent tumoru (z buněk bazálního a luminalního epitelu, z mezenchymu a endotelu). V první fázi zpracování výsledků autoři vybrali 496 genů, jejichž exprese se významně lišila minimálně u tří z analyzovaných vzorků. V dalším kroku provedli shlukovou analýzu, která na základě podobnosti exprese těchto genů rozdělila karcinomy do čtyř skupin. První skupina byla charakteristická přítomností exprese estrogenového receptoru- α (ER+) a cytotokeratinů buněk luminalního epitelu (cytokeratin 8 a 18), a proto byla pojmenována „luminal-like“. Druhá skupina byla pro vysokou expresi genu receptoru Her-2/neu (cErbB2) (dále jen Her-2) označena „Her-2+“. Třetí skupina vykazovala negativní expresi jak estrogenového receptoru- α (ER-), tak i progesteronového a Her-2 receptoru, naopak měla zvýšenou hladinu cytotokeratinů a receptorů adheze typických pro buňky bazálního epitelu (cytokeratin 5, 6 a 17, integrin $\alpha 4$). Tato skupina byla označena „basal-like“. Čtvrtá a poslední skupina mamárních karcinomů byla označena „normal breast-like“, neboť sdílela podobný profil genové exprese jako vzorky z normální prsní žlázy, v nichž převládaly adipocyty (2). O rok později, v roce 2001, publikovala stanfordská skupina další práci, ve které autoři potvrdili své předchozí výsledky na dvojnásobném souboru primárních tumorů. Zřejmě vyšší počet analyzovaných vzorků umožnil shlukové analýze „rozeznat“ ve skupině karcinomů „luminal-like“ tři podskupiny, které autoři označili jako „luminal-like A“, „luminal-like B“ a „luminal-like C“. Podskupina „luminal-like A“ představovala 67% všech tumorů klasifikovaných do skupiny „luminal-like“ a vyznačovala se nejvyšší koncentrací ER v nádorové tkáni (v průměru 111 fmol/mg) a expresí genů souvisejících s jeho signální dráhou. Na rozdíl od podskupiny „luminal-like A“, průměrná koncentrace ER byla v podskupinách „luminal-like B“ a „luminal-like C“ menší (60 fmol/mg). Karcinomy podskupiny „luminal-like C“ byly velmi heterogenní, exprimovaly ER i některé geny charakteristické pro „basal-like“ a „Her-2+“ karcinomy (obrázek 1/I). Ve své druhé práci autoři pokročili mnohem dále. Na základě korelace s údaji o celkovém přežití (OS) a času do relapsu choroby (RFS) prokázali významnou klinickou odlišnost u pěti z šesti molekulárně definovaných skupin karcinomů ($p < 0,01$). Rozdíl nebyl nalezen pouze mezi karcinomy „luminal-like B“ a „luminal-like C“, a proto byly sloučeny do jedné skupiny „luminal B+C“ (3). Podrobněji budeme o prognostickém významu molekulární taxonomie psát v další kapitole. Finální podobu molekulární taxonomie karcinomů prsu publikovala stanfordská skupina v roce 2003, kdy na souboru již 115 primárních

tumorů zreprodukovala dosavadní výsledky a zavedla definitivní označení skupin: „luminal-like A“, „luminal-like B“ (původní „luminal-like B+C“), „basal-like“, „Her-2+“ a poslední skupina „normal breast-like“. Profil genové exprese na jehož základě bylo uvedené členění dosaženo sestával z 534 genů (4).

Ačkoliv finální podoba molekulární taxonomie karcinomů prsu vzešla z analýz poměrně rozsáhlého souboru 115 primárních tumorů, jednalo se vždy o práci jednoho autorského týmu, který používal DNA čipy vlastní produkce. Tohoto „hendikeypu“ si byli autoři vědomi, a proto se rozhodli validovat vlastní výsledky na nezávislém souboru, kterým se stala práce skupiny nizozemských autorů pod vedením Laury van't Veer. Nizozemská skupina analyzovala profil genové exprese u 117 karcinomů prsu pomocí oligonukleotidových DNA čipů produkovaných společností Agilent (5). Stanfordská skupina autorů se rozhodla využít těchto veřejně dostupných dat a vyzkoušet, zda na základě exprese 534 genů jejich klasifikačního profilu dosáhnou stejných výsledků i na nezávislém souboru pacientů, jejichž karcinomy byly navíc analyzovány odlišnou platformou DNA čipů. I přesto, že hodnotitelných bylo 461 z původních 534 genů, rozdělení nizozemského souboru bylo stejné, opět do pěti skupin: „luminal-like A“, „luminal-like B“, „basal-like“, „Her-2+“ a skupina „normal breast-like“. Při popísaných analýzách vyšla najevo zajímavá skutečnost. Všechny 18 karcinomů nesoucích mutaci BRCA1 genu bylo na základě profilu genové exprese zařazeno do skupiny „basal-like“ karcinomů, a to i přesto, že dva z nich exprimovaly estrogenové receptory. Karcinomy, u kterých byla detekována mutace BRCA2 genu (2 případy) byly obsaženy ve skupině „luminal-like A“. V tabulce uvádíme distribuci karcinomů do jednotlivých molekulárně definovaných skupin ve stanfordském a nizozemském souboru (tabulka číslo 1).

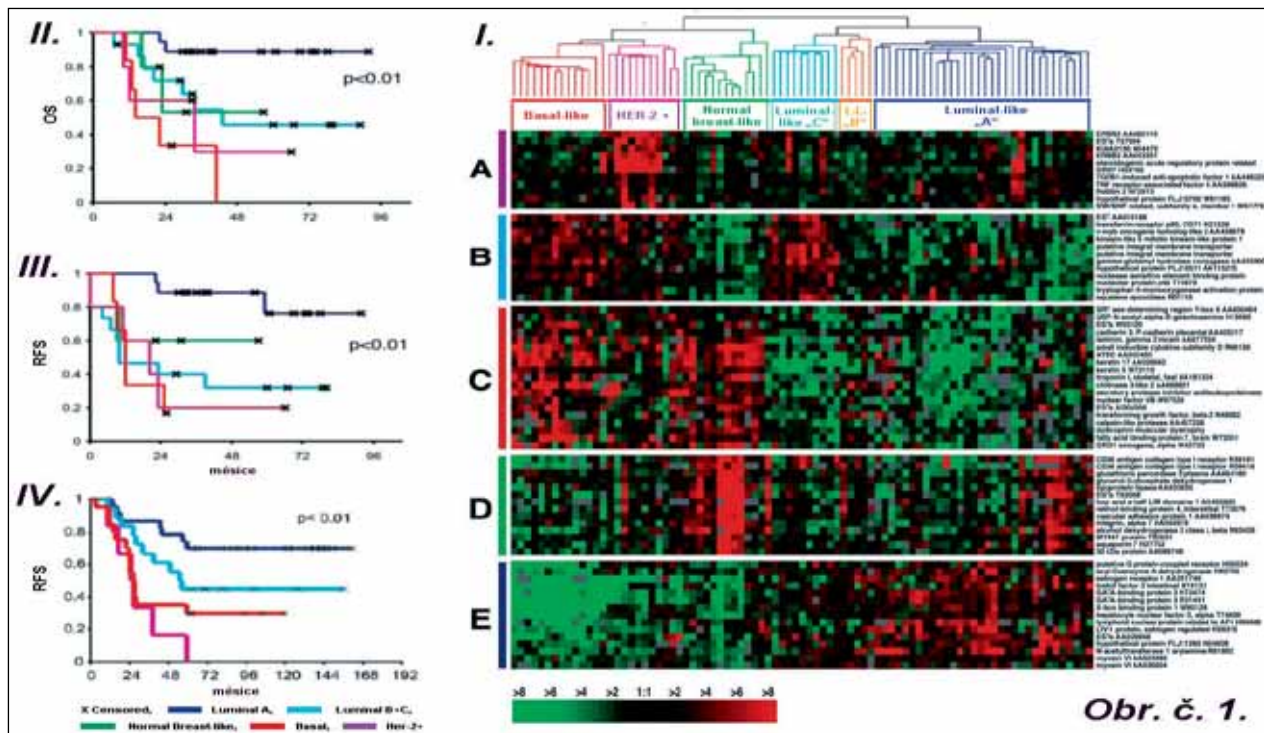
Karcinom	Basal-like	Her-2+	Luminal-like A	Luminal-like B	Normal-breast	Neurčeno
Studie						
Stanford ^a	17%	10%	24%	10%	3%	36%
van't Veer et al. ^b	21%	6%	25%	18%	5%	25%
West et al. ^c	37%	4%	39%	14%	0%	6%
Carey et al. ^d	20%	7%	51%	18%	N	N

Poznámky: N – nebylo stanoveno; ^aVytvořeno zejména z údajů uvedených v přednášce L.A. Carey, ASCO 2006.

2.1. „Basal-like“ karcinomy prsu

Otázkou zůstává, proč mají mezi nově definovanými skupinami „basal-like“ karcinomy nejhorší prognózu? Jsou příčinou této skutečnosti agresivní vlohly „basal-like“ karcinomů nebo svůj podíl nese i dosavadní léčebný přístup, který nezohledňuje jejich existenci?

Biologické vlastnosti „basal-like“ karcinomů dávají skutečně předpoklad k jejich agresivnímu chování. Jak již bylo uvedeno, na úrovni profilu genové exprese sdílí významnou podobnost s karcinomy nesoucími mutaci supresorového BRCA1 genu. Nejedná se však pouze o mutaci, která ve svém důsledku znamená nedostatek funkčního BRCA1 proteinu. Jak dokazuje řada prací, ke stejnému stavu dochází i v případě hypermetylace promotoru nemutovaného BRCA1 genu (35). Alterace na úrovni BRCA1 genu nebo proteinu však nejsou jediné mechanismy vedoucí k možnému agresivnímu chování. Za podrobnější zmínku stojí vyšší výskyt mutací v genu pro protein p53, které byly u „basal-like“ karcinomů zjištěny ve 45-82% případů, ve srovnání se 43-71% u „Her-2+“ a s 13-15% u „luminal-like A“ karcinomů (3). Řada studií přitom jednoznačně prokázala, že přítomnost mutace genu pro p53 je negativním prognostickým faktorem a je asociovaná s horší odpovědí na systémovou léčbu (6,7). Podobně



Obrázek č. 1: (I.) Dendrogram shlukové analýzy, na kterém je patrné rozdělení 85 karcinomů prsu (sloupce) do pěti skupin definovaných na základě podobnosti exprese vybraných genů (řádky): „basal-like“, „HER-2+“, „normal breast-like“, „luminal-like C“, „luminal-like B“ (L.L. „B“), „luminal-like A“. Rovněž geny jsou uskupeny do pěti funkčních skupin, „A“ až „E“. Obrázek je pouze ilustrativní a nezobrazuje všech 476 genů původního genomového profilu. Exprese genů je v dendrogramu kódována barvou. Zelená barva značí nízkou, červená barva vysokou a černá barva průměrnou expresi daného genu v daném karcinomu. Šedá barva označuje gen, jehož exprese nebyla vyhodnocena. V levé části obrázku se nachází grafy prezentující Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití - OS (II.) nebo času do vzdálenostního relapsu choroby - RFS (III., IV.) pro výše uvedené skupiny karcinomů prsu. Dendrogram a grafy II. a III. byly převzaty a upraveny z reference č. 3., graf IV. zobrazuje výsledky ze studie van't Veer L, a kol. (ref. č. 5), a byl převzat a upraven z reference č. 4.

výsledky publikoval i Korsching a kol., který navíc zjistil, že kromě mutovaného proteinu p53 mají „basal-like“ karcinomy i vyšší expresi Her-1 receptoru (EGFR) a proliferačního markeru Ki-67 (8).

Skupina „basal-like“ karcinomů představuje přibližně 6-20% všech karcinomů prsu. V jeho incidenci jsou však patrné rasové rozdíly, kdy zejména v populaci amerických černochů přesahuje výskyt 20% (2,3,9). Z pohledu klinického onkologa jsou „basal-like“ karcinomy součástí skupiny karcinomů prsu, pro kterou je charakteristická negativní exprese jak estrogenového, tak i progesteronového a Her-2 receptoru, tzv. „triple-negative“ (trojitě negativní) fenotyp, (3, 9). Stratifikace pacientů na základě běžně používaných prognostických indexů (St. Gallen, National Cancer Institute, Nottingham) vůbec nezohledňuje výše uvedený fenotyp. Navíc může být negativní exprese Her-2 receptoru vnímána i jako prognosticky příznivý nále. Při uplatnění uvedených prognostických indexů je zřejmé, že, za určitých okolností pacientky s „basal-like“ karcinomem nemusí být vůbec indikovány k adjuvantní chemoterapii, což může negativně ovlivnit výsledky parametrů přežití (OS, RFS).

Po přečtení výše uvedeného textu si můžeme souhrnně odpovědět na otázku v úvodu této kapitoly. Na nepříznivě prognóze „basal-like“ karcinomů prsu se podílí nejenom jejich agresivní vloh, ale rovněž i dosavadní léčebný přístup, který nezohledňuje existenci ani nenabízí cílenou léčbu těchto karcinomů. Proto je reálný předpoklad, že v případě uplatnění individuálního postupu, může nastat zlepšení léčebných výsledků „basal-like“ karcinomů. Již v současnosti je možné vůči pacientkám s triple-negativním fenotypem uplatňovat předpoklad agresivního chování choroby a indikovat adjuvantní léčbu chemoterapií i v případě I. klinického stádia. U pacientek ve věku, který sám o sobě není indikací k vyšetření klinickým genetikem, je vhodné tuto možnost nabídnout a testování na přítomnost mutace BRCA1 genu provést. Vez-

me-li v úvahu molekulární alterace zastoupené u „basal-like“ karcinomů (nadměrná exprese Her-1 receptoru, snížená exprese nebo nefunkční mutace BRCA1 proteinu) je vysoce pravděpodobné, že brzy dojde k využití terapie interferující s těmito změnami. V současné době probíhá klinická studie II. fáze, ve které jsou pacienti s „triple-negative“ fenotypem léčené neoadjuvantní chemoterapií s cisplatinou. Studie vychází z poznatku o vysoké účinnosti interkalačních cytostatik na bázi platinových derivátů u karcinomů s BRCA1 mutací (10,31,32). Kromě těchto přístupů se nabízí i léčba cíleně zaměřená na signální dráhu Her-1 receptoru, kterou představuje aplikace monoklonálních protilátek (např. cetuximab) nebo nízkomolekulárních inhibitorů kinázové aktivity Her-1 receptoru (např. erlotinib a gefitinib). Poslední skupina léčiv by mohla být za účelem stabilizace onemocnění podávána i dlouhodobě, podobně jako je tomu s tamoxifen u ER+ karcinomu prsu. Základním předpokladem pro uplatnění individuálního přístupu k „basal-like“ karcinomům v běžné klinické praxi je stanovení panelů monoklonálních protilátek, které by je dokázaly s dostatečnou specificitou a senzitivitou identifikovat. Několik prací na toto téma již bylo publikováno, přičemž nejčastěji je určen „basal-like“ karcinom založený na výsledku detekce cytokeratinu 5, 6, 17, 19, moesinu, fascinu a c-Kit., Her-1, Her-2, ER, PR a p53 (4,9,33,34).

3. Prediktivní a prognostické profily genové exprese u karcinomů prsu

Indikace adjuvantní léčby u časných stádií karcinomu prsu se v praxi klinického onkologa opírá zejména o existenci několika prognostických systémů. Mezi nejrozšířenější bezesporu patří prognostické skórovací systémy vzešlé z kritérií doporučených skupinou expertů NIH (11) a ze závěrů konference v St. Gallen (12). V podobě internetové aplikace je dostupný systém „Adjuvant on-line“ (13). Uvedené systémy jsou pra-

videlně evaluovány, a proto v současnosti zahrnují nejenom klinické ukazatele (např. věk pacientky, velikost primárního tumoru), ale i histopatologické charakteristiky nádoru (grading, exprese estrogenových a progesteronových receptorů), na základě kterých rozdělují pacientky do dvou hlavních prognostických skupin ve vztahu k riziku časného relapsu choroby. Na straně druhé tyto systémy často selhávají a pro predikci léčebné odpovědi jsou nepoužitelné. Na jejich základě je však indikována adjuvantní chemoterapie u 80% pacientek, i když víme, že pouze polovina z nich bude postižena relapsem choroby a následně podlehe metastatickému onemocnění (14). Nejistý efekt chemoterapie a riziko akutních i dlouhodobých nežádoucích účinků této léčby, představují stálý a intenzivní stimul ke hledání prediktivní a prognostických faktorů.

3.1. Prognostický význam molekulární taxonomie

Stanfordský tým prokázal, že mezi jednotlivými skupinami karcinomů prsu definovanými na podkladě příslušnosti k určitému profilu genové exprese, existují statisticky významné rozdíly v parametrech RFS a OS. Tyto rozdíly byly reprodukovatelné i na nezávislém souboru pacientek nizozemských autorů. Nejhorší prognózu vykazovala skupina „basal-like“ karcinomů, následovaná „Her-2+“ karcinomy. V obou případech více než 60% pacientek nedosáhlo RFS 48 měsíců. Naopak nejlepších výsledků vykazovala skupina karcinomů „luminal-like A“, kde osmiletého OS a RFS dosáhlo přibližně 90% a 70% pacientek. Pacientky s karcinomy „luminal-like B“, nebo „normal breast-like“ dosahovaly těchto parametrů mezi 40 - 60 % (3,4,5), (obrázek č. 1/II-1/IV.).

Rouzier a kol. si položili otázku: Souvisí odlišná prognóza jednotlivých molekulárních variant karcinomu prsu více s jejich chemosenzitivitou, nebo se jedná spíše o odraz jejich metastatického potenciálu? Autoři vybrali 82 pacientek s karcinomem prsu I. až III. klinického stádia, kterým byla podávána neoadjuvantní chemoterapie založená na sekvenčním režimu Paklitaxel+FAC. Před zahájením léčby byla pacientkám provedena tenkojehlová aspirace nádorových buněk z tumoru pro účel mikročipové analýzy, na jejímž základě byl soubor rozdělen na jednotlivé molekulárně definované taxonomické jednotky. Karcinomy typu „luminal-like“ byly zastoupeny v 37%, „normal breast-like“ ve 12%, „basal-like“ ve 27% a „Her-2+“ ve 24%. Patologická kompletní remise tumoru (pCR) nastala nejčastěji ve skupině „basal-like“ a „Her-2+“. V obou případech dosáhlo pCR 45% pacientek. Naopak v případě „luminal-like“ karcinomů byla pCR detekována pouze v 6% případů a u „normal breast-like“ karcinomů nebyla zjištěna vůbec. Autoři následně identifikovali profil genové exprese, který predikoval pCR v souvislosti s danou léčbou. Multivariabilní analýza však neprokázala jeho nezávislost, neboť stejného rozdělení bylo dosaženo i při kombinovaném použití klinicko-patologických parametrů: věku a exprese estrogenového receptoru. Tento výsledek byl bezesporu ovlivněn netypickým zastoupením jednotlivých skupin karcinomů v poměrně malém souboru, kdy karcinomy typu „basal-like“ a „Her-2+“ tvořily více než jeho polovinu. Pouze pro skupinu „basal-like“ karcinomů bylo možné identifikovat specifický profil genové exprese, který byl nezávislým prediktorem pCR (15).

3.2. Prognostické profily nezávislé na molekulární taxonomii

V úvodu k dalším kapitolám musíme poznamenat, že jsme měli snahu zachovat pro termíny „predikce“ a „prognóza“ vymezení ve smyslu predikce odpovědi na léčbu a prognóza pro přežití nebo událost spojenou s relapsem/progresí choroby. Řada publikací, ze kterých jsme čerpali, však takového vymezení neměla, a proto jsou i v našem textu oba pojmy často zastupitelné.

3.2.1. Indikace adjuvantní chemoterapie

I přesto, že na molekulární úrovni definovaná klasifikace karcinomů prsu obsahuje i prognostické informace, řada výzkumných týmů se snažila identifikovat prognostické profily genové exprese nezávisle na taxonomických jednotkách. Z dosud provedených analýz vyplývá, že v případě karcinomu prsu je možné prognózu vývoje onemocnění stanovit z profilu genové exprese primárního tumoru již v době diagnózy choroby (5).

Laura van't Veer, Marc J. van de Vijver a Yixin Wang publikovali velmi nadějně studie, jejichž výsledkem byly profily genové exprese, které dokázaly stratifikovat pacientky s karcinomem prsu lokalizovaným pouze na oblast mammy, bez prokázaného postižení regionálních lymfatických uzlin a vzdálených metastáz (dále jen $pT \leq pN0M0$), do skupiny s nízkým, nebo s vysokým rizikem vzdáleného relapsu (M1) choroby v průběhu pěti let od zahájení léčby (dále jen „časný relaps“). Nizozemská skupina autorů, pod vedením Laury van't Veer, provedla v roce 2001 DNA čipovou analýzu 117 karcinomů prsu, ve které identifikovala profil genové exprese mající silný vztah k predikci časného relapsu choroby. Aby bylo možné validovat výsledky při omezeném počtu karcinomů, rozdělili autoři soubor na cvičnou (training-set) a kontrolní (test-set) skupinu. Pomocí specifických biostatistických analýz identifikovali ve cvičném souboru profil 70 genů, jejichž hodnoty exprese se lišily mezi karcinomy pocházejícími od pacientek s časným nebo pozdním relapsem choroby ($p=0,0018$). Tento profil následně testovali na kontrolní skupině karcinomů. Senzitivita a specifita profilu pro rozdělení pacientek do výše uvedených rizikových skupin dosáhla 91% a 73% a vícerozměrné analýzy prokázaly jeho nezávislost na dosud používaných klinicko-patologických parametrech (velikost tumoru, postižení lymfatických uzlin, stav hormonálních receptorů, angioinvasze, grading) ($p<0,001$). Identifikace skupiny genů, jejichž profil exprese je zřetelně asociován s časným relapsem choroby dokazuje, že tyto karcinomy měly již od počátku svého vzniku metastatický fenotyp a samotný rozsev maligních buněk nemusí probíhat pouze lymfatickou cestou (5).

O dva roky později publikoval nizozemský tým další práci, ve které autoři testovali „svůj“ 70-genový prognostický profil na rozsáhlém souboru 295 pacientek, jehož charakteristika je podrobně rozvedena v tabulce č. 2 (Vijver a kol.). Souhrně můžeme říci, že se opět jednalo o pacientky s karcinomem prsu lokalizovaným na oblast mammy, v tomto případě však zcela záměrně přibližně polovina měla prokázané postižení regionálních lymfatických uzlin ($pN1$). Více než dvě třetiny karcinomů exprimovalo estrogenový receptor. Pacientky byly léčeny chirurgicky, a pokud byla indikována, následovala zajišťovací radioterapie. Adjuvantní chemoterapii obdrželo 37% pacientek. V retrospektivní analýze dokázal 70-genový profil spolehlivě určit riziko relapsu pacientek, a to nezávisle na stavu postižení lymfatických uzlin a řady dalších klinických parametrů ($p<0,001$, obrázek č. 2A-2D). Ve skupině 151 pacientek s karcinomem lokalizovaným pouze na oblast prsu ($pT \leq pN0M0$) provedli autoři velmi zajímavé srovnání mezi údaji o prognóze pacientek dosaženými na základě profilu genové exprese, nebo kritérií doporučených skupinou expertů NIH, či ze závěrů konference v St. Gallen. Výsledky tohoto srovnání jsou shrnuty v tabulce č. 3 a 4. Mezitím co oba klinicko-patologické prognostické systémy identifikovaly v dané skupině pouze 7-15% pacientek s nízkým rizikem relapsu, na podkladě profilu genové exprese tvořila tato skupina 39%. O prognostické síle genového profilu vypovídá nejlépe skutečnost, že pouze 13,2% pacientek s predikovaným nízkým rizikem během 10 let zrelabovalo (16). Tyto výsledky podnítily nizozemské autory k realizaci první klinické studie, která do jednotlivých ramen „randomizuje“ pacientky na základě výše uvedeného profilu genové exprese. Jedná se o prospektivní multicentrickou studii třetí fáze organizovanou pod záštitou

EORTC (protokol 10041-BIG-3-04), která byla zahájena v roce 2006 a počítá s nábořem 6000 pacientek s časným karcinomem prsu, omezeným pouze na oblast mammy (pT≤3pN0M0). Jak název klinické studie „Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy“ (zkratka „MINDACT“) napovídá, jejím primárním cílem je srovnat, zda je ve výběru pacientek pro adjuvantní chemoterapii efektivnější 70-genový prognostický profil, nebo stávající klinicko-patologická kritéria. Schéma studie představuje obrázek č. 3. Na začátku studie je u každé pacientky stanoveno riziko časného relapsu nemoci na základě 70-genového profilu exprese a klinicko-patologických kritérií (Adjuvant on-line). Pakliže oba prognostické systémy zařadí pacientku do skupiny s nízkým rizikem časného relapsu, není indikována adjuvantní chemoterapie. V opačné situaci ano. Předpokládá se, že ve většině případů dojde k neshodě výsledků obou prognostických systémů, kdy jeden nebo druhý zařadí pacientku do nízkého nebo vysokého rizika časného relapsu. Za těchto okolností budou pacientky randomizovány do dvou skupin. V první bude o indikaci chemoterapii rozhodnuto na základě výsledku klinicko-patologického prognostického systému, ve druhé na základě výsledku 70-genového prognostického systému. U pacientek, které budou indikovány k aplikaci adjuvantní chemoterapie dojde k další randomizaci, která je rozdělí do ramene s chemoterapií založenou na antracyklinu, nebo na kapecitabinu a docetaxelu. Pacientky s tumorem exprimujícím estrogenové receptory budou dále randomizovány do ramene s dvouletým podáváním tamoxifenu následovaným pětiletou léčbou letrozolem, nebo do ramene se samotným letrozolem aplikovaným po dobu sedmi let. Poslední dvě randomizace vycházejí z druhotných cílů studie, ve které chtějí pořadatelé srovnat efektivitu a bezpečnost obou ramen s chemoterapií a hormonoterapií.

Na nezávislém souboru čítajícím 286 pacientek a za použití jiné mikročipové technologie publikovali o několik let později podobnou práci i Wang a kol. Podrobnou charakteristiku jejich souboru udává tabulka č. 2. Stručně lze říci, že se jednalo výhradně o pacientky s karcinomem prsu lokalizovaným na oblast mammy (pT≤4M0), bez prokázaného postižení regionálních lymfatických uzlin (pN0) a více než dvě třetiny karcinomů exprimovalo estrogenový receptor. Tumory o velikosti pT3 a pT4 tvořily pouze 3% celého souboru.

Charakteristika	Studie	Vijver a kol. NEJM 2002 ¹¹	Wang a kol. Lancet 2005 ¹²
Čipová platforma		Affilent	Affymetrix
Počet detekovatelných genů		25 000	22 000
Biologický materiál		zmrazená tkáň	zmrazená tkáň
Zastoupení nádoru v analyzovaném vzorku		> 50%	> 70%
Počet pacientů (primárních tumorů)		295	286
Charakteristika TNM stadiu		T1-2N0-1M0	T1-4N0M0
Věk: < 40 let / > 55 let		21% / 0%	13% / 42%
ER +		77%	73%
PR+		neurčeno	58%
Her-2+		neurčeno	neurčeno
G1/G2/G3		25%/35%/40%	2%/15%/52%
pT1/T2/T3a/T4		53%/47%/0%	51%/46%/3%
pN0		51%	100%
Radikální mastektomie		45%	23%
Adjuvantní chemoterapie		37%	0%
Adjuvantní radioterapie		neurčeno	87%
Adjuvantní hormonoterapie		14%	neurčeno
Relaps do 5 let		26%	33%
Počet primárních tumorů ve cvičném souboru		(78:T1-2N0M0)*	115
Počet primárních tumorů v kontrolním souboru		295	171
Počet genů v prognostickém profilu		70	76
Počet genů zastoupených v obou profilech		3	
Zastoupení tumorů s prog. příznivým profilem		39% / (52%)*	35%
Senzitivita profilu		92% / (91%)*	93%
Specifita profilu		50% / (73%)*	48%

Pacientky byly léčené chirurgicky, a pokud byla indikována, následovala zajišťovací radioterapie. Adjuvantní chemoterapie nebyla podávána. Pacientky byly rozděleny na dvě části. První část, označená jako „cvičný soubor“ („training set“),

zahrnovala 115 pacientek a sloužila k identifikaci prognostického profilu genové exprese. Druhá část, kontrolní soubor („test set“), sloužila k nezávislému ověření výsledků získaných z analýzy cvičného souboru. Oba soubory obsahovaly ve stejném poměru pacientky s pozitivní a s negativní expresí estrogenového receptoru. Mikročipová analýza cvičného souboru identifikovala u ER+ pacientek 60 genů a u ER- pacientek 16 genů, které dohromady vytvořily profil genové exprese schopný rozdělit pacientky do skupiny s nízkým, nebo s vysokým rizikem časného vzdálenostního relapsu (obrázek č. 2E a 2F). Stejně jako v předchozí práci, i zde autoři provedli srovnání s klinicko-patologickými prognostickými systémy a dospěli k podobným výsledkům, které jsou shrnuty v tabulce č. 3 a 4 (10).

Tabulka č. 3. Vývoj karcinomu prsu u pacientek stratifikovaných do rizikových skupin na základě profilu genové exprese					
	Zastoupení pacientů	Přežití bez vzniku vzdálenostních metastáz		Celkové přežití	
		5 let	10 let	5 let	10 let
Studie van de Vijver a kol., NEJM 2002¹¹					
Pacienti s příznivým prognostickým profilem (115 pacientů)	39%	94,7%	85,2%	87,4%	84,6%
z toho pacienti „pT1-2pN0“	37%	93,4%	86,8%	86,7%	86,7%
Pacienti s nepříznivým prognostickým profilem (189 pacientů)	61%	60,5%	50,6%	74,1%	54,6%
z toho pacienti „pT1-2pN0“	63%	56,2%	44,7%	71,6%	49,6%
Studie Wang a kol., Lancet 2005¹²					
Pacienti s příznivým prognostickým profilem (59 pacientů)	36%	93%	N	87%	N
Pacienti s nepříznivým prognostickým profilem (112 pacientů)	66%	53%	N	70%	N
Poznámky: ¹¹ Studie zahrnovala pacientky pT1-2pN0-1M0. ¹² Studie zahrnovala pouze pacientky pT1-2pN0M0 a z celkového počtu 298 pacientek byly parametry přežití hodnoceny pouze v kontrolním souboru čítající 171 pacientek, N = neurologického dožívání.					

	Studie van de Vijver a kol., NEJM 2002 (hodnoceny pouze pT1-2pN0 pacientky)				Studie Wang a kol., Lancet 2005			
	Nízké riziko		Vysoké riziko		Nízké riziko		Vysoké riziko	
	% pacientů	MP5 10 let ^a	% pacientů	MP5 10 let ^a	% pacientů	MP5 5 let	% pacientů	MP5 5 let
NOH kritéria ¹³	7%	82%	93%	58%	9%	91%	89%	
St. Gallen kritéria ¹⁴	15%	77%	85%	57%	8%	92%	90%	
Profil genové exprese ¹⁵	39%	86,8%	61%	44,1%	35%	65%	52%	

Z obou prací vyplývá, že na základě profilu genové exprese primárního tumoru lze predikovat vývoj nádorového onemocnění mnohem přesněji, než pomocí dosavadních klinicko-patologických prognostických systémů. Vezmeme-li v úvahu, že u pacientek s negativním postižením regionálních lymfatických uzlin, které nejsou zajištěny adjuvantní chemoterapií nastává relaps přibližně v 30-40% případů (10), tak distribuce pacientů do skupiny s nízkým rizikem je v případě klinicko-patologických prognostických systémů jednoznačně poddimenzována (7-15%). Stanovení rizika relapsu na základě profilu genové exprese přináší rozdělení blížíící se více přirozenému průběhu choroby. Tomu odpovídá jak rozdělení pacientů do obou prognostických skupin (nízké riziko stanoveno v 35-39%), tak i počty pacientů dosahujících pěti a desetiletého přežití bez vzniku vzdálených metastáz (viz. tabulky č. 3 a 4). I přesto, že věrohodnost dosažených výsledků mikročipových analýz je podložena klinickým vývojem onemocnění u relativně vysokého počtu pacientek (s ohledem na finanční náklady spojené s použitím DNA čipové technologie), je nutné zmínit i několik nejasností, které nám utkvěly v paměti při pročítání uvedených prací. Překvapující je, že ani jeden z profilů neobsahuje geny, jejichž prognostický význam byl u karcinomu prsu již popsán. Jedná se například o Her-2/neu, cyklin D1, ER-alfa, p53, UPA, PAI-1, c-myc a další. Vysvětlení se nabízí několik. Vyzvednout chceme skutečnost, že výše uvedené prediktory jsou studovány především na úrovni proteinů, jejichž regulace je ovlivňována posttranslačními a posttranskripčními mechanismy. Profily přitom mohou obsahovat geny hrající důležitou roli právě v těchto mechanismech, přičemž tato jejich funkce nemusela být dosud odhalena.

Dalším překvapením je, že oba prognostické profily jsou až na tři výjimky tvořeny úplně jinými geny, a to i přesto, že původně vznikly analýzou karcinomů s velmi podobnou histopatologickou charakteristikou. Rovněž klinické parametry souborů jsou si velmi podobné. Výraznější odlišnosti jsme našli pouze ve věkovém rozložení pacientek a v zastoupení jednotlivých stupňů gradingu, kdy ve Wangově práci je větší zastoupení pacientek starších 55 let a menší zastoupení dobře diferencovaných karcinomů „G1“ (31% karcinomů ve Wangově souboru ale nemá stanoven grading). Přitom stupeň gradingu je v řadě klinických studií nezávislým prognostickým faktorem, a tedy odráží biologické vlastnosti tumoru mající základ v genomovém profilu. Pomineme-li tyto skutečnosti, odpovědnost za tak zásadní odlišnost obou prognostických genomových profilů je možné „svést“ rovněž na rozdílné mikročipové technologie použité v obou studiích. Na tento argument se přitom odvolává autorský tým Wangovy práce. Mikročipové platformy Affymetrix a Agilent sice detekují genomovou expresi více než dvou desítek tisíc genů, mezi nimi však existuje variabilita hybridizačních sekvencí a datové analýzy (37).

Tabulka č. 5. Stanovení rizika relapsu na základě profilu genomové exprese u pacientek s karcinomem prsu adjuvantně léčených tamoxifenem²⁸

Prognostická skupina	RS skóre*	NSABP B-14		NSABP B-20	
		% pacientů	Tamoxifen DRF 10 let [†]	% pacientů	Tamoxifen + chemoterapie DRF 10 let [‡]
		100%	85%	100%	87,8%
Nízké riziko	< 18	91%	93,2%	94%	96,8%
Střední riziko	18 - 30	22%	85,7%	21%	90,9%
Vysoké riziko	> 31	27%	69,5%	25%	60,5%

Poznámky: *RS-skóre se pohybuje v intervalu 0-100 a je stanoveno na základě hodnoty exprese 21 genů. †Pacientky s karcinomem prsu (pT1-4pN0M0) exprimujícím estrogenové receptory. ‡Procento pacientek, které dosáhly desetileté přežití bez vzniku vzdálenostních metastáz.

Zajímavý komentář ke studiím Wang a van't Veerové se objevil v časopisu Lancet. Z pohledu biologických vlastností karcinomů prsu zde byla učiněna zásadní námitka, která upozornila na rozdíl v metodikách práce obou autorských týmů. Mezitím co Y. Wang vyhodnocoval výsledky mikročipových analýz odděleně u karcinomů s pozitivní a s negativní expresí estrogenových receptorů, přičemž dva takto detekované prognostické profily ve finále sloučil dohromady, L. van't Veerová analyzovala karcinomy neseparovaně. Signální dráha estrogenového receptoru je pro nádorovou buňku mimořádně významná a přímo i nepřímo ovlivňuje expresi mnoha dalších genů. Identifikace prognostického profilu je záležitost biostatistického zpracování hodnot genomové exprese ve vztahu k vývoji choroby. Vzhledem k matematickým algoritmům, které tento vztah definují, výběr prvních několika „nejsignifikantnější asociovaných“ genů může mít významný vliv na selekci těch zbývajících, pakliže jsou v silné funkční biologické vazbě (18). Lze tedy předpokládat, že geny mající vztah k signální dráze estrogenového receptoru mohly získat významnější zastoupení v profilu L. van't Veerové. Dokázat takovou hypotézu, jak jsme již uvedli, je však obtížné, neboť u řady z nich nemusí být tento vztah dosud objeven.

Obecným problémem většiny mikročipových studií je malý počet pacientů ve cvičných souborech, na kterých jsou prognostické profily generovány. Limity počtu pacientů vycházejí z finanční náročnosti DNA čipových analýz. I při relativně vysokém počtu pacientek ve cvičných souborech obou analýz (78 a 115), je při detekci více než 20 000 genů v každém karcinomu vysoce pravděpodobné, že i na vysoké hladině statistické významnosti (např. $p < 0,001$) bude vybrána desítky genů se silnou, nicméně falešně pozitivní prediktivní hodnotou (18).

3.2.2. Predikce léčebné odpovědi na tamoxifen

Tamoxifen je nejčastěji používán antiestrogen k léčbě karcinomů prsu exprimujících estrogenové receptory. V adjuvantní terapii časných stádií představuje podávání tamoxifenu vysoce účinnou léčbu, která snižuje kumulativní riziko relapsu choroby o 40 až 50% pro každý rok jejího podávání. Při-

bližně u 40% pacientek však tato léčba na podkladě primární nebo sekundární rezistence selhává a dochází k relapsu choroby. Hormonální léčba se uplatňuje rovněž v terapii metastatického karcinomu prsu. I v těchto případech dříve či později dochází k jejímu selhání.

Již jsme uvedli, že molekulární taxonomie rozlišuje ER+ karcinomy prsu na dvě skupiny „luminal-like A“ a „luminal-like B“, které mají i přes jednotnou léčbu výrazně odlišnou prognózu (4). V případě nalezení vhodných imunohistochemicky vyšetřitelných markerů, jenž by obě skupiny spolehlivě odlišily, bylo by možné zahájit klinické studie vedoucí k optimalizaci léčby rizikových „luminal-like B“ karcinomů. Rovněž podrobnější studium jejich molekulární podstaty může přinést vysvětlení příčin selhání antiestrogenové léčby a případně odhalit nové terapeutické cíle.

Identifikací profilu genomové exprese, na jehož podkladě by bylo možné spolehlivě určit pacientky, které budou mít největší benefit z adjuvantní léčby tamoxifenem, nebo naopak budou ohroženy jejím selháním, si vzala za cíl skupina autorů z University of Pittsburgh. V roce 2004 v NEJM publikovali práci, ve které představili profil složený z 21 genů, jenž rozdělil pacientky do tří skupin podle rizika relapsu choroby. Tyto geny byly původně vybrány ze skupiny 250 kandidátních genů, o nichž existovaly informace, včetně výsledků DNA čipových studií, dokladující jejich prediktivní význam u karcinomu prsu. Analyzovaný soubor tvořilo 668 pacientek s ER+ karcinomem prsu omezeným pouze na oblast mammy (pT≤4pN0M0). Všechny uvedené pacientky byly v rámci protokolu klinické studie NSABP B-14 adjuvantně léčené tamoxifenem po dobu pěti let a medián jejich sledování přesáhl 14 let. K analýze byla použita RNA izolovaná z karcinomů fixovaných formálněm a archivovaných v parafinových bločcích a pomocí multiplexové kvantitativní Real-Time PCR reakce byla stanovena hodnota exprese 21 vybraných genů, které se staly základem pro výpočet indexu rizika relapsu „RS-skóre“ (recurrence score). Na základě RS-skóre byly pacientky rozděleny do tří skupin: 1. s nízkým (<10%), 2. se středním (10-30%) a 3. s vysokým (>30%) rizikem vzdáleného relapsu choroby do 10 let od zahájení adjuvantní léčby tamoxifenem. Mezitím co v celém souboru dosáhlo uvedených 10 let 85% pacientek, ve skupině s nízkým, středním a vysokým rizikem tomu bylo u 93%, 85% a 31% pacientek ($p < 0,001$). Podrobně viz. tabulka č. 5. I přestože pacientky mladší 50 let (v době zahájení léčby) vykazovaly častější výskyt relapsů, v multivariabilní analýze při použití RS-skóre nebyl věk signifikantním prognostickým faktorem. Z ostatních testovaných parametrů (velikost tumoru, Her-2 amplifikace, hladina estrogenového receptoru v cytozolu buněk, grading tumoru) nabyly prognostického významu pouze údaje o gradingu. Bohužel, i přes zavedení jednotných hodnotících kritérií, stanovení gradingu tumoru vykazuje do značné míry variabilitu závislou na subjektivním úsudku patologa. Autoři proto nechali grading vyhodnotit nezávisle třemi patology, přičemž pouze u špatně diferencovaných tumorů bylo dosaženo interpersonální shody. Překvapivým nálezem bylo, že více než třetina pacientů s primárním tumorem nepřesahujícím 1cm byla ve středním nebo vysokém riziku s 15-20% výskytem relapsu ve sledovaném období (23).

Autoři si položili otázku, zda prognostický význam jejich 21-genového profilu bude zachován i v případech, kdy adjuvantní hormonoterapii předchází aplikace chemoterapie. Předmětem jejich zájmu se proto staly pacientky zařazené do klinické studie NSABP B-20. Jednalo se o soubor 651 pacientek s časným stádiem ER+ karcinomu prsu (pT≤4pN0M0), které byly léčené adjuvantní hormonoterapií tamoxifenem po dobu pěti let (227 pacientek), a nebo adjuvantní chemoterapií založenou na režimu MF a CMF s následující hormonoterapií tamoxifenem po dobu 5 let (424 pacientek). Medián jejich sledování přesáhl 10 let. Obdobně i zde byly pacient-

ky rozděleny na základě RS-skóre do 3 prognostických skupin (nízké, střední a vysoké riziko relapsu). Pacientky s nízkým RS-skóre dosahovaly nejlepších léčebných výsledků v průběhu desetiletého sledování. Potvrdil se tak prognostický význam RS-skóre, a to nezávisle na skutečnosti, zda pacientky absolvují adjuvantní chemoterapii. Podrobnější údaje viz. tabulka č.5 (24). Použitá metoda byla následně patentovaná společností Oncotype (25).

3.2.3. Predikce patologické kompletní remise po neoadjuvantní chemoterapii

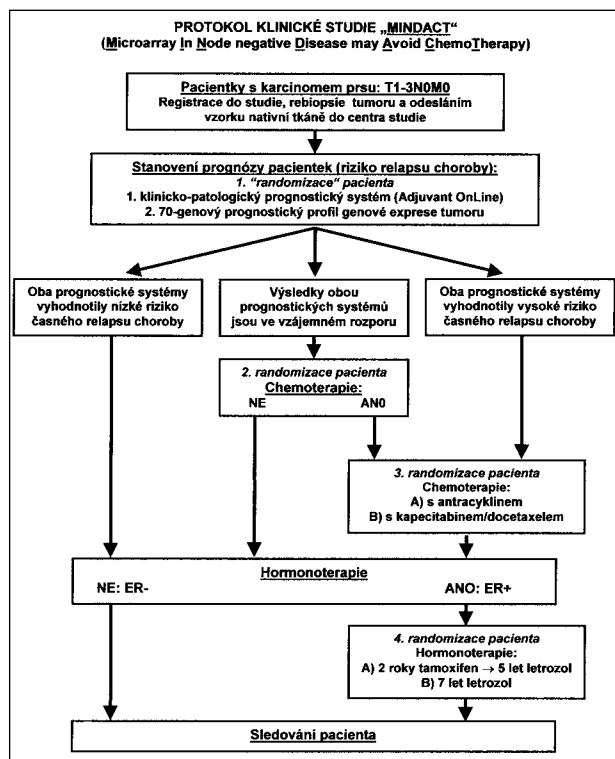
Profil genové exprese byl rovněž použit k predikci patologické kompletní remise (pCR) u pacientek s karcinomem prsu léčeným neoadjuvantní chemoterapií. Retrospektivní analýzy řady klinických studií prokázaly, že dosažení pCR po neoadjuvantní léčbě je spojeno s delším bezpříznakovým a celkovým přežitím pacientek (26,27). Pravděpodobnost dosažení pCR je při aplikaci současných chemoterapeutických režimů přibližně 25-30% (24,28). Pokud by byl objeven prediktivní test, který by dosáhl minimálně 60% pozitivní prediktivní hodnoty, takto vybrané pacientky by měly dvojnásobně vyšší pravděpodobnost dosažení pCR. Ayers a kol. publikovali práci, ve které podrobili mikročipové analýze 42 primárních karcinomů prsu od pacientek, jež podstoupily neoadjuvantní chemoterapii režimem s paklitaxelem, fluorouracilem, doxorubicinem a cyklofosfamidem (T-FAC). Třináct pacientek (31%) dosáhlo pCR. Autoři z 19813 zkoumaných genů identifikovali 74 genů, které byly signifikantně spojeny s výskytem pCR. I přestože v kontrolním souboru dosáhl tento 74 genový profil 100% specifity, jeho senzitivita byla nízká - 43% (28). Podobnou Rouzierovu práci jsme představili v kapitole 2.1. (15).

Mohlo by se zdát, že k hledání prediktivních markerů je model neoadjuvantních chemoterapií více než ideální, neboť léčebnou odpověď lze stanovit v relativně krátké době a účinek chemoterapie není ovlivněn sekundární rezistencí vzniklou na podkladě předchozí aplikace cytostatik. K překvapivému závěru proto dospěla skupina Hannemannové a kol., která nedokázala identifikovat žádný genový profil, který by předpověděl pCR u pacientek léčených neoadjuvantní chemoterapií založenou na režimu AC (doxorubicin, cyklofosfamid) a AD (doxorubicin, docetaxel) (29). Jen těžko věříme vysvětlení autorů, že v daném případě zřejmě neexistuje skupina genů, která by dokázala vytvořit silný prediktivní profil ve vztahu k pCR u uvedených chemoterapeutických režimů. Negativní stanovisko musíme zaujmout k práci Changa a kol. publikované v Journal of Clinical Oncology v roce 2005, která prezentovala profil genové exprese predikující rezistenci nebo minimální odpověď pro karcinomy prsu neoadjuvantně léčené docetaxelem. Poněkud zvláštní se jeví mezní rozdělení pacientek na docetaxel senzitivní a rezistentní kritériem dosažení 75% procentní redukce nádorové masy, pakliže 96% pacientek mělo primární tumor klasifikovaný jako T3 a u 39% z těchto tumorů přesáhl jeden z rozměrů 10 cm. Samotný profil genové exprese byl stanoven pouze na vzorku čítajícím 7 „senzitivních“ a 6 „rezistentních“ tumorů (30).

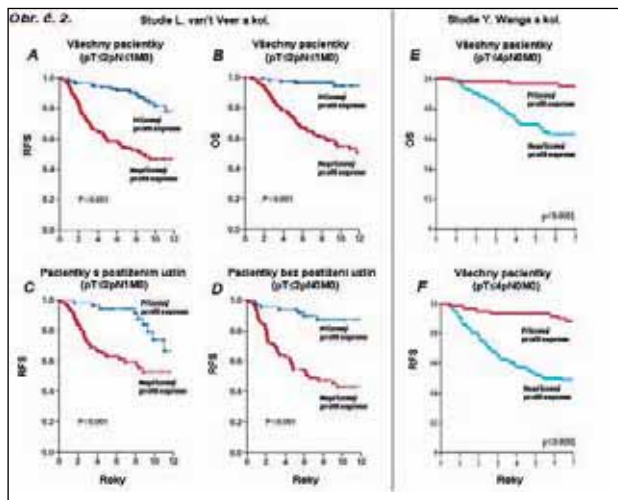
4. Příspěvek DNA čipů k vývoji nového modelu metastazování karcinomu prsu

Metastazování je považováno za poslední a fatální stupeň v relativně zdlouhavém procesu kancerogeneze solidních tumorů. Metastatický potenciál obnáší schopnost nádorové buňky migrovat extracelulární složkou tumoru, intravazovat do lymfatického a krevního oběhu, přežít v tomto nepříznivém prostředí, přestoupit z něj do jiného orgánu a zde realizovat svůj maligní potenciál. Přitom pouze méně než 0,1% nádorových buněk, které se dostanou do cirkulace, je schopno založit životaschopné metastázy (19). Dosavadní znalosti o procesu metastazování sloužily k podložení několika

hypotéz, které lze z nadhledu na jejich základní podstatu rozdělit do dvou směrů. První tvrdí, že nabytí metastatického potenciálu vyžaduje řadu postupných specifických genetických změn, které pod vysokým selekčním tlakem mohou vzniknout pouze v určité subpopulaci buněk primárního tumoru. Druhý směr tvrdí, že získání genové výbavy zodpovědné za metastazování je stochastický jev, který může postihnout kteroukoliv buňku primárního tumoru na samotném počátku jejího vzniku. Jednotlivé hypotézy pak již více nebo méně připouští, že metastatický proces může být ovlivňován buněčnou i extracelulární složkou mikroprostředí, ve kterém se nádorová buňka nachází (14,20,21).



Výsledky DNA čipových analýz jednoznačně dokazují, že genovou výbavu realizující metastatický potenciál mohou mít nádorové buňky aktivovanou již od počátku svého vzniku. Svědčí o tom dvě skutečnosti. Ta první spočívá ve zjištění, že již v časných karcinomů prsu ($pT \leq pN0M0$) lze v době stanovení diagnózy identifikovat profil genové exprese spjatý s časným vzdálenostním relapsem choroby (5,16,17). Druhá skutečnost potvrzuje předchozí. Práce publikované kolektivy autorek Laury van't Veer a Britty Weigelové dokazují, že genová exprese primárního tumoru a jeho metastázy je sobě vzájemně podobná mnohem více, než genová exprese mezi jednotlivými primárními tumory nebo mezi metastatickými ložisky. Dosud necitovaná práce B. Weigelové analyzovala expresi 18336 genů u osmi párových vzorků primárních tumorů a jejich vzdálených metastáz, které vznikly v intervalu 2 až 15 let od diagnózy primárního tumoru. Stejnou expresi v primárním tumoru a v jeho metastáze vykazovalo 17748 až 18271 genů (96,7-99,6%), což potvrdilo domněnku, že za metastatický potenciál je zodpovědná početně malá skupina genů (5,20). Karcinom prsu má svá predilekční místa metastatického rozsevu. Další otázku zůstává, zda stejné geny, které předurčují metastatický potenciál zodpovídají i za orgánový tropismus, nebo se v tomto případě jedná o selekční tlak na genovou výbavu tumoru vycházející z mikroprostředí, ve kterém se nádorové buňky vyskytují (složení extracelulární matrice, makrofágy, dendritické buňky, endotelie, přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů)?



Obrázek č. 2.: Šest dílčích grafů zobrazuje Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití (OS), nebo pravděpodobnosti přežití bez výskytu vzdáleného relapsu choroby (RFS) v příslušné skupině pacientek s nízkým (příznivý profil exprese), nebo s vysokým (nepříznivý profil exprese) rizikem časného vzdáleného relapsu choroby. Riziko bylo určeno na základě profilu genové exprese. Grafy „A“ až „D“ byly převzaty a upraveny z reference č. 16 a grafy „E“ a „F“ z reference č. 17. V obou studiích (ref. č. 16 a č. 17) byl použitý nezávislý prognostický profil genové exprese. Pozor: barevné značení křivek není v obou studiích totožné.

Z tohoto pohledu přináší zajímavé výsledky práce publikovaná Minne a kol. v *Nature* v roce 2005. Autoři použili buněčnou linii karcinomu prsu, která byla původně izolována z pleurálního výpotku pacientky v odstupu řady let od operace primárního tumoru. Tyto buňky označili za mateřské a pomocí níže popsané metodiky mezi mateřskými buňkami identifikovali ty, jenž preferenčně metastazovaly do plic. Buňky mateřské linie vstříkli do ocasní žíly myši. Po průkazu plicních metastáz myši usmrtili a z plicních ložisek vyizolovali jednotlivé nádorové buňky, které po pomnožení opět vstříkli do ocasní žíly dalších myší. Tento proces dvakrát zopakovali a v jeho závěru získaly populaci nádorových buněk, která velmi agresivně zakládala pouze plicní metastázy. Mikročipovou analýzou následně detekovali profil složený z 54 genů, jejichž exprese odlišovala nádorové buňky metastazující do plic od buněk původní mateřské linie. S ohledem na proces metastazování obsahoval profil dvě skupiny genů. První skupinu tvořily geny, jejichž biologická funkce je obecně spjatá s agresivitou a metastazováním nádorů. Druhou skupinu představovaly geny, jejichž exprese je v primárním tumoru nízká, ale významně se zvýší v okamžiku, kdy se nádorová buňka ocitne v místě vhodném pro založení metastázy. Ze druhé skupiny uvedeme několik příkladů: epiregulin (ligand receptorů ErbB rodiny), CXCL1 (chemokin), IL13RA2 (receptor pro interleukin 13), ID1 (inhibitor transkripce), MMP1 a 2 (matrixmetaloproteinázy), SPARC (adhezní molekula), COX2 a VCAM1 (receptor adheze). Dokonalost jejich práce tkvěla především ve validaci získaných výsledků. Autoři prokázali nejenom, že změny exprese uvedených devíti genů se odrážejí i na proteinové úrovni, ale především jednoznačnou souvislost těchto genů se vznikem plicních metastáz. Pokud v mateřských buňkách docílili zvýšení jejich exprese, tyto buňky zakládaly signifikantně větší množství plicních metastáz. Na-

pak snížení exprese uvedených genů v buňkách, které původně metastazovaly pouze do plic, způsobilo až desetinásobné snížení počtu plicních metastáz.

Objevený genový profil predikující metastatické postižení plic autoři následně ověřovali na souboru primárních karcinomů prsu získaných od 82 pacientek. Na jeho základě rozdělili pacientky na skupinu s nízkým a s vysokým rizikem vzniku metastatického postižení plic. Desetiletého období bez vzniku plicních metastáz dosáhlo ve skupině s nízkým rizikem 89% pacientek, mezitím co ve skupině s vysokým rizikem pouze 56% ($p<0,0018$). Autoři vyslovili hypotézu, že primární tumory, které mají metastatický potenciál, obsahují subpopulace buněk s orgánově specifickým genovým profilem předurčujícím místo jejich metastatického rozsevu (22).

Na základě nejnovějších poznatků, které zahrnují výsledky mikročipových analýz a objev nádorových kmenových buněk, vznikl nový model metastazování karcinomu prsu. Na jeho počátku stojí fyziologická kmenová buňka mléčné žlázy, která po dobu své existence akumuluje genové mutace do chvíle, kdy nabydou transformujícího potenciálu. V tomto okamžiku vzniká nádorová kmenová buňka, která je při neomezeném množství buněčného dělení schopna sebeobnovy a diferenciaci do stádií jednotlivých maligních progenitorů. Mezitím co z progenitorů vzniká majoritní buněčná populace primárního nádoru, která však nemá potenciál k založení vzdálených metastáz, samotná kmenová buňka migruje do krevního oběhu a následně do jednotlivých orgánů, kde může i po letech strávených ve stádiu dormance úspěšně založit metastatická ložiska. Genový program pro specifický orgánový tropismus získává kmenová buňka interakcí se svým mikroprostředím. Tak mohou vzniknout kmenové buňky schopné založit metastázy například pouze v plicích nebo ve skeletu (14).

5. Závěr

Technologie DNA čipů se stala základním nástrojem výzkumu biologické podstaty a chování karcinomů prsu a její výsledky mění náš pohled na toto onemocnění. Vznikla molekulární taxonomie, která definuje pět skupin karcinomů prsu: „luminal-like A“, „luminal-like B“, „basal-like“, „Her-2+“ a skupinu „normal breast-like“, které se výrazně liší svým klinickým průběhem. V případě „luminal-like B“ a „basal-like“ karcinomů existuje navíc předpoklad, že individualizace terapeutického přístupu může vést ke zlepšení jejich léčebných výsledků. Nové poznatky přinesly DNA čipové analýzy rovněž do procesu metastazování, kde dokazují, že genovou výbavu realizující metastatický potenciál mohou mít nádorové buňky aktivovanou již od počátku svého vzniku. To může vysvětlovat skutečnost, proč stávající klinicko-patologické prognostické systémy, na jejichž podkladě je v současnosti indikována adjuvantní chemoterapie, tak často selhávají. Z tohoto důvodu byly další DNA čipové analýzy zaměřeny na identifikaci prediktivních a prognostických profilů genové exprese, které by daleko přesněji stanovovaly riziko časného relapsu choroby, nebo odpověď na podanou léčbu. Výsledkem jsou první klinické studie, které za tímto účelem DNA čipy používají.

Poděkování:

Práce byla podpořena grantovými projekty: IGA MZČR NR/8335-3, IGA MZČR NR/8270-3, MŠMT 6198959216 a MPO 1H-PK45.

LITERATURA:

- Novotvary 2003 ČR, ÚZIS ČR Praha, 2006, str. 31-69.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(19):10869-74.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(14):8418-23.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-6.
- Aas T, Borresen AL, Geisler S, et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996;2(7):811-4.
- Bergh J, Norberg T, Sjogren S, et al. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995;1(10):1029-34.
- Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 2002;82(11):1525-33.
- Nielsen T, Hsu F, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5367-74.
- Majdak EJ, Debnjak J, Milczek T, et al. Prognostic impact of BRCA1 pathogenic and BRCA1/BRCA2 unclassified variant mutations in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2005;104(5):1004-12.
- Eifel P, Axelsson JA, Costa J, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 2001;93: 979-89.
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer: Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817-27.
- www.adjuvantonline.org, Adjuvant Inc., USA.
- Weigelt B, Peterse J, van't Veer L, et al. Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. *Nature Rev Cancer* 2005;5:591-602.
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5678-5685.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(25):1999-2009.
- Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-679.
- Jenssen TK, Hoving E. Gene-expression profiling in breast cancer. *Lancet* 2005;365:634-635.
- Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumour emboli labeled with 125-I-5-iodo-2-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:773-782.
- Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, et al. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(14):15901-15905.
- Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977;197(4306):893-5.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;436(7050):518-524.
- Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of Tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(27):2817-26.
- Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3726-3734.
- www.oncotypedx.com
- Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2672-2685.
- Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17:460-469.
- 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.
- Hannemann J, Oosterkamp HM, Bosch CA, et al. Changes in gene expression associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3331-3341.
- Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:1169-1177.
- Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: Chemosensitivity, Treatment Outcomes and Prognosis. *Fam Cancer* 2006;5(2):135-42.
- Dana-Farber Clinical Trial No.: DFCI 04-183. Preoperative Cisplatin in Early Stage Breast Cancer, II Phase Study. www.dfci.harvard.edu
- Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(5):1533-1539.
- Charafe-Jauffret EA, Monville F, Finetti P, et al. Definition of basal-like breast tumors: Validation of new protein markers. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2006;47:3602.
- Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, et al. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Treatment* 2005;91:179-186.
- West M, Blanchette C, Dressman H, et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(20):11462-7.
- Cheadle C, Becker KG, Cho-Chung YS, et al. A rapid method for microarray cross platform comparisons using gene expression signatures. *Mol Cell Probes* 2006. In press.