

Radostaw Mlak¹,
Paweł Krawczyk¹,
Janusz Milanowski^{1, 2}

¹Katedra i Klinika Pneumonologii,
Onkologii i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
²Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

Czynniki biochemiczne i genetyczne w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu chorób nowotworowych

Biochemical and genetic factors in the diagnosis and prognosis of cancer

STRESZCZENIE

Pomimo rozwoju nauki, coraz doskonalszych technik diagnostycznych, nowych terapii opartych na lekach działających wybiórczo na komórki nowotworowe, nowotwory złośliwe stanowią po chorobach układu krążenia najczęstszą przyczynę zgonów. W Polsce w 2006 roku na nowotwory złośliwe zachorowało ponad 120 tysięcy osób. Do najczęstszych przyczyn zgonu z powodu schorzeń nowotworowych wśród mężczyzn należą: rak płuca, prostaty, jelita grubego, trzustki oraz białaczki. Natomiast u kobiet są to: rak płuca, piersi, układu rozrodczego, jelita grubego i trzustki. Polska zajmuje ostatnie miejsce pod względem skuteczności leczenia nowotworów wśród krajów Unii Europejskiej. Jest to spowodowane wieloma czynnikami, które często nakładają się na siebie. Zaliczyć tu należy między innymi niewiedzę lub lekceważenie pierwszych objawów choroby, zbyt późno rozpoczęty proces diagnostyczny, uwarunkowania ekonomiczne oraz utrudnienia administracyjne.

Historyczne pojęcie markera nowotworowego oznacza biochemiczną substancję wybiórczo uwalnianą przez komórki guza do krążenia, która może być następnie wykryta w surowicy krwi lub innych płynach ciała w celu klinicznego monitorowania procesu nowotworowego. Z biegiem lat termin ten został rozszerzony o cechy charakteryzujące tkanki czy komórki nowotworowe (ekspresja receptorów, enzymów, mutacje w onkogenach i genach supresorowych, aberracje chromosomalne). Idealny marker nowotworowy jest substancją normalnie niewystępującą w organizmie, której wykrycie odzwierciedla obecność, progresję lub regresję toczącego się procesu nowotworowego (antygeny swoiste dla nowotworu powstałe w wyniku mutacji kodujących je genów). Dużą wartość diagnostyczną mają także antygeny wspólne występujące na komórkach nowotworowych oraz gametach i komórkach łożyska. Najczęściej jednak oznacza się an-

Adres do korespondencji:

mgr Radostaw Mlak
Pracownia Immunologii i Genetyki
Katedry i Kliniki Pneumonologii,
Onkologii i Alergologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin
tel.: (081) 724-42-93,
faks: (081) 724-48-23
e-mail: pulm.lab@am.lublin.pl

tygeny różnicowania (swoiste dla tkanek, z których wywodzi się nowotwór (np. CYFRA 21.1) oraz powszechnie występujące, których stężenie u chorych z procesem nowotworowym jest znamienne wyższe niż u osób zdrowych. W tej grupie znajdują się także antygeny embrionalno-nowotworowe, podlegające ekspresji podczas rozwoju płodowego, które u dorosłych mogą pojawić w wyniku procesów naprawczych lub nowotworowych (np. antygen karcynoembrionalny [CEA] i α -fetoproteiny [AFP]).

Przy obecnym stanie służby zdrowia w Polsce (braku odpowiednich rozwiązań strukturalnych, ograniczonego zaufania lekarzy do nowych metod diagnostycznych oraz warunkowań ekonomicznych) w najbliższym czasie diagnostyka molekularna nowotworów (zwłaszcza guzów litych) może napotykać na duże trudności. Nie dotyczy to rutynowo oznaczanych markerów, takich jak CA 125, CA 19.9 czy PSA, należących jednak do antygenów powszechnie występujących. Istnieje jednak nadzieja szybkiego wdrożenia badań molekularnych w oznaczaniu czynników predykcyjnych w kwalifikacji chorych do terapii ukierunkowanych molekularnie.

Forum Medycyny Rodzinnej 2010, tom 4, nr 2, 122–134

słowa kluczowe: markery nowotworowe, czynniki genetyczne, czynniki molekularne, nowotwory

ABSTRACT

Despite the scientific progress, the increasingly advanced diagnostic techniques and the novel drug therapies specifically targeting tumour cells, cancer remains a common cause of death, second only to cardiovascular disease. More than 120 thousand new cases of cancer were diagnosed in 2006 in Poland. The most common causes of cancer-related deaths in men include: lung cancer, prostate cancer, colorectal cancer, pancreatic cancer and leukaemias, and those in women include: lung cancer, breast cancer, gynaecological cancer, colorectal cancer and pancreatic cancer. Poland ranks last in terms of cancer treatment efficacy in the European Union. The reasons are multiple and overlapping, and include: lack of knowledge or ignoring the first symptoms of the disease, delayed diagnostic evaluation, economic factors and administrative problems.

The term "tumour marker" historically refers to a biochemical substance released by tumour cells into the circulation which may then be detected in serum or other bodily fluids for the purpose of clinical monitoring of the neoplastic process. With time the term has evolved to include parameters of the tumour tissues or cells (receptor expression, enzyme expression, oncogene and suppressor gene mutations, chromosome aberrations). The ideal tumour marker is a substance which is not normally found in the body, whose detection reflects the presence, progression or regression of an ongoing neoplastic process (tumour-specific antigens expressed as a result of mutations in their genes). Common antigens present on tumour cells, gametes and placental cells are also of considerable diagnostic value. Differentiation antigens, however, are among the most commonly determined. These include antigens specific to tissues from which the tumour originates (e.g. CYFRA 21.1) and commonly found antigens whose concentration is significantly higher in cancer patients than in healthy individuals. This group includes carcinoembryonic antigens which are expressed during foetal development and which may be expressed in adults as a result of reparative or neoplastic processes (e.g. CAE, AFP).

**”
Do najczęstszych
przyczyn zgonu wśród
mężczyzn należą
nowotwory płuc, prostaty,
jelita grubego, trzustki
oraz białaczki. U kobiet
są to nowotwory płuc,
piersi, układu
rozdroczego, jelita
grubego i trzustki**

At the present condition of healthcare in Poland (the lack of appropriate structural solutions, the limited confidence towards new diagnostic methods among doctors and the economic environment) molecular diagnostics of cancer (especially of solid tumours) may come up against considerable difficulties. This does not apply to the routinely determined markers, such as CA 125, CA 19.9 or PSA, which are, however, common antigens. There is, however, hope that molecular testing will soon be implemented in the determination of predictive factors during qualification for molecularly targeted therapies.

Forum Medycyny Rodzinnej 2010, vol. 4, no 2, 122–134

key words: tumour markers, genetic factors, molecular factors, neoplasms

EPIDEMIOLOGIA NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH

Choroby nowotworowe stanowią obecnie podstawowy problem, z którym współczesna medycyna radzi sobie w sposób niezadowalający zarówno w Polsce, jak i na całym świecie. Pomimo ciągłego rozwoju nauki, coraz doskonalszych technik diagnostycznych i nowych terapii opartych na lekach działających wybiórczo na komórki nowotworowe, nowotwory złośliwe w dalszym ciągu zajmują pierwsze miejsce u kobiet i drugie u mężczyzn (po chorobach serca) pod względem najczęstszych przyczyn zgonów. Według danych pochodzących z *International Agency for Reserch of Cancer* (IARC) około 10 milionów ludzi choruje na nowotwory złośliwe, a liczba zgonów z tego powodu przekroczyła 6 milionów. Jeżeli obecne tendencje nie ulegną zmianie, to do 2020 roku liczby te mogą ulec podwojeniu [1]. W Polsce w 2006 roku na nowotwory złośliwe zachorowało ponad 64 tysiące mężczyzn oraz 61 tysięcy kobiet, a średni wiek osób, u których zdiagnozowano nowotwór złośliwy, wynosił 66 lat. W tym samym roku liczba zgonów z powodu nowotworów złośliwych wyniosła ponad 90 tysięcy [2]. Analizy *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) szacują, że w 2009 roku w Stanach Zjednoczonych liczba chorych na nowotwory złośliwe wyniesie ponad 1,5 miliona (w tym 766 130 męż-

czyn i 713 220 kobiet) [3]. Do najczęstszych przyczyn zgonu wśród mężczyzn należą nowotwory płuc (32,2% wszystkich zgonów z powodu nowotworów złośliwych u mężczyzn w Polsce), prostaty, jelita grubego, trzustki oraz białaczki. Natomiast u kobiet są to nowotwory płuc (ok. 12,8%), piersi (ok. 12%), układu rozrodczego, jelita grubego i trzustki. Zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet najwyższą śmiertelnością cechuje się rak płuca. U mężczyzn współczynnik umieralności z tego powodu w 2006 roku w Polsce osiągnął wartość 67 na 100 tys. mężczyzn, a u kobiet jest niższy i wynosi 40 na 100 tys. kobiet, co daje łączną liczbę 21 775 zgonów z powodu raka płuca. Co więcej, jest to jeden z nielicznych nowotworów, którego współczynnik umieralności wykazuje, zwłaszcza u kobiet, tendencję wzrostową [3]. W dalszym ciągu około 86% chorych z rozpoznaniem raka płuca umiera w ciągu 5 lat od postawienia diagnozy.

OPÓŹNIENIA W DIAGNOSTYCE NOWOTWORÓW

W przypadku schorzeń nowotworowych czas potrzebny na prawidłowe rozpoznanie i wdrożenie odpowiedniego leczenia odgrywa niezwykle istotną rolę. Zgodnie z raportem EURO CARE3 dotyczącym skuteczności leczenia nowotworów, Polska znajduje się na końcu listy ocenianych krajów Unii

Europejskiej. Jest to spowodowane wieloma czynnikami, które często nakładają się na siebie. Zaliczyć tu należy przede wszystkim niewiedzę lub lekceważenie pierwszych objawów choroby oraz zbyt późno rozpoczęty proces diagnostyczny. Towarzyszą temu uwarunkowania ekonomiczne, jak i brak refundacji oraz ogólnospołecznej dostępności do wybranych badań specjalistycznych, a także utrudnienia administracyjne (np. nieadekwatne do potrzeb limity badań) [4]. W dalszym ciągu ponad połowa pacjentów (57,7%) zgłasza się do lekarza w zaawansowanym stadium nowotworu, co wyklucza podjęcie leczenia radykalnego. Średni czas opóźnienia z winy pacjenta z powodu lęku przed rozpoznaniem choroby nowotworowej lub bagatelizowania jej objawów zmniejszył się w porównaniu z latami ubiegłymi i wynosi 8,6 miesiąca. Natomiast średni czas opóźnienia wynikający ze stosowania niekonwencjonalnych metod leczenia wynosi 4,7 miesiąca i nie uległ istotnej zmianie na przestrzeni ostatnich kilku lat. Opóźnienie w procesie diagnostycznym, trwającym od momentu zgłoszenia się do lekarza do rozpoznania choroby, wynosi średnio 2 miesiące. Niezwykle istotny jest również czas od zgłoszenia się do lekarza do rozpoczęcia leczenia (śr. ok. 3 mies.). Pacjenci, u których pojawiają się pierwsze niepokojące objawy, trafiają przede wszystkim do lekarza pierwszego kontaktu (59,2%), a niewielki odsetek (6,5%) zgłasza się bezpośrednio do onkologa. W Polsce 1/3 chorych traci możliwość wyleczenia w wyniku niewłaściwej lub zbyt późno wykonanej diagnostyki [5–7].

MARKERY NOWOTWOROWE

W ujęciu historycznym pojęcie markera nowotworowego oznacza biologiczną lub biochemiczną substancję wybiórczo uwalnianą przez komórki guza do krążenia, która może być następnie wykryta w surowicy krwi lub innych płynach ciała w celu klinicznego monitorowania procesu nowotworowego.

Z biegiem lat termin ten został rozszerzony o cechy charakteryzujące tkanki czy komórki nowotworowe, takie jak markery cytogenetyczne, na przykład mutacje w onkogenach i genach supresorowych lub aberracje chromosomalne oraz nadekspresja białek o rozmaitych funkcjach (enzymy, receptory, glikoproteiny błonowe) [8].

Markery nowotworowe są użyteczne we wszystkich fazach procesu diagnostycznego:

1. Badania przesiewowe (profilaktyka nowotworów).
2. Rozpoznanie toczącego się procesu nowotworowego w korelacji z konkretnymi objawami.
3. Określanie stopnia zaawansowania choroby (zależność poziomu ekspresji markera od zaawansowania procesu nowotworowego).
4. Lokalizacja zmian nowotworowych w obrębie narządu.
5. Monitorowanie skuteczności leczenia (ocena progresji/regresji choroby po zastosowanej operacji, radio- i chemioterapii, wykrycie wznowy).
6. Wyznaczanie celu terapeutycznego dla nowych leków.

Za pierwszy marker nowotworowy uznać można odkryty ponad 150 lat temu w 1847 roku przez angielskiego badacza Bance-Jonesa ciężki osad powstały w wyniku zakwaszenia moczu pochodzącego od pacjentów z osteomalacją. Prawie sto lat zajęła identyfikacja osadu. Okazało się, że powstaje on w wyniku wytrącania się łańcuchów lekkich immunoglobulin monoklonalnych, ulegających podwyższonej produkcji, a następnie wydalaniu wraz z moczem u pacjentów ze szpiczakiem mnogim. Znaczny postęp w rozwoju badań nad markerami przypadł na lata 1928–1963, kiedy to wykazano możliwość zastosowania oznaczania stężenia hormonów, enzymów i izoenzymów jako czynników pozwalających na wykrywanie i ocenę przebiegu procesu nowotworowego (dyhydrogenazy mleczanowej [LDH, *lactate dehy-*



W Polsce 1/3 chorych traci możliwość wyleczenia w wyniku niewłaściwej lub zbyt późno wykonanej diagnostyki



**Markery nowotworowe
w większości przypadków
cechują się stosunkowo
niską specyficznością
oraz czułością**

drogenase], fosfatazy zasadowej [ALP, *alkaline phosphatase*], gamma-glutamylotranspeptydazy [GGTP, *gamma-glutamyltransferase*], enolazy neuronalnej [NSE, *neuron-specific enolase*]). Jednak dopiero odkrycie w 1963 roku α -fetoproteiny (AFP, *alphafetoprotein*) przez Abeleva i w 1965 roku antygenu karcynoembrionalnego (CEA, *carcinoembryonic antigen*) przez Golda i Freemana rozpoczęło erę powszechnego stosowania markerów nowotworowych jako nowych narzędzi diagnostycznych w onkologii [9, 10].

Idealny marker nowotworowy jest substancją normalnie niewystępującą w krążeniu, której wykrycie w surowicy w minimalnych nawet ilościach (wysoka czułość) odzwierciedla obecność, progresję lub regresję toczącego się procesu nowotworowego. Dodatkowo powinna go charakteryzować wysoka swoistość narządowa. Stwierdzenie jego obecności ma także wartość prognostyczną [11]. Zastosowanie markerów nowotworowych na szerszą skalę w praktyce klinicznej zawdzięczamy między innymi radioimmunologii zastosowanej po raz pierwszy przez Bersona i Yallowa w 1968 roku, jak również odkryciu przeciwciał monoklonalnych przez Köhlera i Milsteina w 1975 roku. Odkrycia te zapewniły dostępność niezwykle czułych metod badawczych, pozwalających na wykrycie niemierzalnych dotąd ilości substancji, które potencjalnie mogłyby być użyte do celów diagnostycznych. Niestety, markery nowotworowe w większości przypadków cechują się stosunkowo niską specyficznością (w wielu łagodnych schorzeniach wynik testu badania może być pozytywny) oraz czułością (nie u wszystkich pacjentów z określonym nowotworem złośliwym stwierdza się obecność markera, stąd negatywny wynik badania nie wyklucza choroby) [9, 12]. Ponieważ nie ma dotychczas markera nowotworowego, który cechowałby się 100-procentową czułością oraz swoistością, oznaczanie markerów pozostaje metodą wspomagającą diagnostykę oraz monitoro-

wanie przebiegu leczenia chorób nowotworowych [13].

Występujące współcześnie różne klasyfikacje markerów nowotworowych wynikają z przyjętego kryterium podziału. Klasyfikacja stosowana często w diagnostyce i monitorowaniu skuteczności terapii dzieli markery na prognostyczne (Bcl-2, mutacje *K-ras*), predykcyjne — pozwalające przewidzieć efekt leczenia (mutacje *HER2* [*human epidermal receptor*], *K-ras*, *EGFR* [*epidermal growth factor receptor*]) oraz ryzyka wystąpienia nowotworu (mutacje *BRCA1* i *BRCA2*). Stosowany w tej pracy podział opiera się przede wszystkim na stopniu swoistości markera dla określonego typu nowotworu oraz obejmuje markery komórkowe (molekularne) i markery krążące w płynach ustrojowych (biochemiczne) (tab. 1) [14, 15].

Stopień swoistości dla określonego typu nowotworu pozwala wyróżnić markery swoiste dla nowotworu (np. neoantygeny) powstałe w wyniku mutacji genu (np. *K-ras* i *EGFR* w raku płuca i jelita grubego) lub aberracji chromosomalnych (np. powstanie białka Bcr-Abl w przewlekłej białaczce szpikowej). Markery wspólne są wytwarzane przez komórki nowotworowe oraz prawidłowe gamety i komórki łożyska (np. antygen *MAGE* w czerniaku lub *hCG* w nasieniaku i raku kosmówki). Nowotworowe antygeny różnicowania występują, choć w mniejszym stężeniu, w prawidłowych tkankach, z których rozwija się nowotwór. Należą tu białka gp100 i tyrozynaza, syntetyzowane przez komórki czerniaka i przez prawidłowe melanocyty oraz glikoproteinę nabłonka kanałików gruczołu krokowego (*PSA*, *prostate-specific antigen*), wytwarzaną w dużym stężeniu przez komórki raka prostaty. Antygeny powszechnie występujące pojawiają się w wielu prawidłowych tkankach, jednak pewne typy nowotworów wytwarzają je w bardzo wysokich stężeniach. Należą tu antygeny płodowo-zarodkowe, takie jak *CEA* i *AFP*, produkowane powszechnie przez ko-

Tabela 1

Markery użyteczne w diagnostyce chorób nowotworowych człowieka

Biochemiczne markery nowotworowe	Nowotwór	Molekularne markery nowotworowe	Nowotwór
CEA	Rak jelita grubego, rak wątroby, rak trzustki, rak żołądka, rak płuca, rak sutka, rak tarczycy	<i>EGFR</i>	Rak płuca, rak jelita grubego, rak trzustki, rak gruczołu krokowego, rak głowy i szyi
AFP	Rak wątroby, nienasieniakowe guzy jądra	<i>HER2</i>	Rak sutka, rak płuca
β -hCG	<i>Choriocarcinoma</i> , guzy zarodkowe jądra	<i>K-ras</i>	Rak jelita grubego, rak głowy i szyi
CA15.3	Rak sutka	<i>ERCC1</i>	Rak płuca, rak jelita grubego
CA19.9	Nowotwory trzustki i dróg żółciowych	<i>BRCA1</i>	Rak sutka, rak płuca
CA125	Rak jajnika	<i>P53</i>	Większość nowotworów człowieka
CA72.4	Rak żołądka		
PSA	Rak gruczołu krokowego		

Objaśnienia skrótów znajdują się w tekście

Tabela 2

Zastosowanie oznaczania markerów nowotworowych w wybranych chorobach nowotworowych człowieka

Choroba nowotworowa	Pomocne w diagnostyce	Wartość prognostyczna	Monitorowanie	Wartość predykcyjna	Markery o niższej użyteczności lub nowe markery w fazie badań klinicznych
Rak wątroby	AFP, GGT	AFP	AFP, CEA	Raf, FLT-3 i RET, VEGFR -1, -2, -3, PDGFR-B, c-KIT	GGT mRNA, GPC3, hTERT, VEGF, AFP mRNA, MAGE-1
Rak piersi	CA 15-3, <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i>	ER, PgR, <i>HER-2</i> , <i>BRCA1</i> , <i>p53</i> , uPA, PAI-1	CA 15-3, CEA	<i>HER-2</i> , ER, PgR, CA 15-3, <i>BRCA1</i> , <i>ERCC1</i> , <i>p53</i> , MUC-1	c-myc, N-myc, int2, CA 549, CA 27.29, MCA, NBR1, NBR2, VEGF, Ki67, cyclin D, cyclin E, p27, p21
Rak płuca	TPA, NSE, SCC, CYFRA21.1	CYFRA21.1	CEA, NSE, CYFRA21.1, ProGRP	<i>EGFR</i> , <i>ERCC1</i> , <i>RRM1</i> , <i>C-RAF</i> , <i>B-RAF</i> , <i>VEGF</i> , PI3K/AKT, ICAM	PTEN, <i>BRCA1</i> , <i>P53</i> , <i>P27</i> , <i>HER-2</i> , β Tubulina
Rak prostaty	PSA, cPSA, %fPSA+ DRE, PAP	PSA, cPSA, PSMA, PSCA	PSA, cPSA	PAP, AR, PI3K/AKT, PTEN, <i>Bcl2</i> , <i>EGFR</i> , <i>Her2</i>	EPCA-2, <i>BRCA2</i> , ER, GSTP-1, p27, p53, VEGF, HPC1, PcaP, PCGEM1
Rak jelita grubego	CEA, <i>MSI</i> , <i>K-ras</i> , APC, MLH1/MSH2/MSH6	CEA, <i>K-ras</i> , <i>MTHFR</i> , <i>VEGF</i>	CEA	<i>EGFR</i> , <i>K-ras</i> , <i>ERCC1</i> , <i>p53</i> , <i>MSI</i> , VEGF, <i>Bcl2</i> , <i>DPD</i> , <i>TS</i> , <i>TP</i>	CA19.9, CA242, PTEN, BRAF, CIN, PMS1, PMS2, p16, p14, GSTP1, TYMS-ER, UGT1A1, ABCB1
Rak trzustki	CA19.9	CA19.9, CP	CA19.9, CEA	<i>VEGF</i> , <i>EGFR</i> , <i>K-ras</i> , <i>Ki-67</i> , PI3K, <i>PTEN</i> , <i>BRCA2</i>	<i>CHI3L1</i> , p16, p53, <i>ERBB2</i> , katepsyna D, <i>FANCC</i> , <i>FANCG</i> , <i>FBXW7</i> , <i>BAX</i> , <i>RB1</i>

Objaśnienia skrótów znajdują się w tekście

mórki płodu, a u osób dorosłych pojawiają się w różnych tkankach pod wpływem procesów zapalnych, naprawczych lub nowotworowych. Istnieją też nieswoiste markery nowotworowe, takie jak: wzmożona odpowiedź immunologiczna (zmiany w stężeniu cytokin, białek ostrej fazy, molekuł adhezyjnych, ekspresji receptorów dla cytokin), wzrost stęże-

nia czynników wzrostu (np. naskórkowego [EGF, *epidermal growth factor*], insulinopodobnego [IGF-1, *insulin-like growth factor*], śródbłonka naczyniowego [VEGF, *vascular endothelial growth factor*]), enzymów i izoenzymów (LDH), ekotopowo wytwarzanych hormonów (np. parathormon w raku płuca) i pierwiastków śladowych (tab. 2) [9, 15].

CZYNNIKI BIOCHEMICZNE

■ Alfa-fetoproteina

Alfa-fetoproteina ulega ekspresji w wątrobie i przewodzie pokarmowym płodu, a także w błonie woreczka żółtkowego. U osób dorosłych obecność wysokiego stężenia AFP w surowicy ściśle wiąże się z nowotworem złośliwym wątroby (70% pacjentów). Podwyższone stężenie obserwuje się również w nowotworach jajników i jąder z wyjątkiem nasieniaków oraz w raku kosmówki. Rzadko wykrywa się wysokie stężenie AFP u pacjentów z rakiem płuca czy przewodu pokarmowego. Różne stężenia notuje się w marskości wątroby lub u chorych na przewlekłe zapalenie wątroby, pęcherzyka żółciowego i jelit [16].

■ Antygeny karcyno-embrionalne

Antygeny CEA stanowią dużą rodzinę glikoprotein (36 białek) związanych z błoną komórkową o strukturze zbliżonej do immunoglobulin. Pierwotnie uznawano CEA za specyficzny dla jelita grubego marker nowotworowy. Nieco później okazało się jednak, że występuje on również w wielu innych schorzeniach (wrzodziejące zapalenie jelita grubego, przewlekłe zapalenie trzustki), a nawet u zdrowych osób (ciąża). Dodatkowo podwyższone stężenie tego antygenu może występować w wielu innych nowotworach, w tym: wątroby, płuca, odbytu, trzustki, piersi oraz tarczycy, co znacznie zmniejszyło użyteczność oznaczania tego markera w onkologii. W praktyce klinicznej zastosowanie CEA ogranicza się głównie do wykrywania wznowy w raku jelita grubego oraz odbytu po leczeniu chirurgicznym (czułość 75%). Przedoperacyjne stężenie CEA koreluje ze stadium zaawansowania nowotworu i stopniem jego unaczynienia. Blisko 95% chorych z przerzutami raka jelita grubego do wątroby i 25–50% z przerzutami do innych narządów ma podwyższone stężenie CEA w surowicy krwi. Wyższą wartością kliniczną od wartości bezwzględnej tego markera ma współ-

czynnik przyrostu w czasie, co jest związane z dynamiką procesu nowotworowego [17].

■ Pozostałe antygeny nowotworowe

Większość użytecznych klinicznie antygenów nowotworowych to mucyny. Zalicza się tu między innymi: CA19, CA50, CA72.4, CA15.3, MCA, CA549, CTA, CA125, SCC, TPA, PSA. Możliwość wykorzystania w diagnostyce tych antygenów wiąże się ze zmianami w strukturze łańcucha glikoproteiny i powstawaniu nowych epitopów (do ich wykrywania służą swoiste przeciwciała monoklonalne) zachodzących w kolejnych etapach onkogenezy.

CA19.9

Jest to sializowana forma antygenu grupowego krwi Lewis-Le(a), która u zdrowych osób może normalnie występować w niektórych tkankach. Osoby o grupie krwi Le(a) ujemnej są genetycznie niezdolne do ekspresji CA19.9. Wzrost ekspresji tego antygenu jest obserwowany w przebiegu kilku nowotworów, szczególnie gruczolakoraków (rak trzustki i jelita grubego). W przypadku raka trzustki 70–100% chorych wykazuje podwyższone stężenie CA19.9 w surowicy krwi. Marker ten jest użyteczny w monitorowaniu przebiegu leczenia tego schorzenia, a jego stężenie koreluje ze stadium zaawansowania nowotworu. Bardzo wysokie stężenie markera (> 1000 j./l) wiąże się zazwyczaj z ograniczeniem radykalności terapii (guz nieoperacyjny). Testy diagnostyczne oparte na oznaczeniu antygenu CA19.9 cechuje jednak niska swoistość związana ze wzrostem stężenia tego czynnika w wielu schorzeniach — stany zapalne trzustki i wątroby [18].

CA15.3

Jest jedną z najpowszechniej oznaczanych mucyn w raku piersi, cechuje ją jednak dość niska specyficzność. Wzrost stężenia CA15.3 obserwowany jest w wielu nowotworach, między innymi żołądka, jelita grubego, płuc,

trzustki, jajników, a także u około 10% zdrowych kobiet (bez związku z ciążą i karmieniem piersią), jak również u około 40% osób ze schorzeniami łagodnymi (np. przewlekłe zapalenie wątroby). W związku z tym niezalecane jest stosowanie CA15.3 w celach przesiewowych lub we wczesnej diagnostyce raka piersi. Wysokie stężenie tego antygeny wiąże się zazwyczaj z gorszym rokowaniem. Podjęto próby aplikacji pomiaru CA15.3 w surowicy krwi w celu monitorowania pacjentek z wysokim ryzykiem nawrotu raka piersi po leczeniu operacyjnym. Jednak w 1996 roku Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej opublikowało praktyczny przewodnik na temat użyteczności markerów nowotworowych, według którego CA15.3 nie jest czułym wskaźnikiem występowania mikroprzerzutów, a jego badanie generuje dużą liczbę fałszywie pozytywnych i negatywnych wyników. Informacje płynące z oznaczeń tego markera są użyteczne, gdy stężenie CA15.3 po 30 dniach od operacji wzrasta 3-krotnie nawet, jeżeli jest on zbliżony do wartości referencyjnych. W celu monitorowania skuteczności chemioterapii należy dokonać pomiaru stężenia CA15.3 co najmniej 3 miesiące przed rozpoczęciem leczenia. Następnym pomiarem dokonuje się w trakcie leczenia i po jego zakończeniu [19, 20].

CA125

Największą użyteczność badania stężenia CA125 obserwuje się w diagnostyce raka jajnika. Część wyników badań klinicznych wskazuje również na pewną przydatność oznaczania tego markera w diagnostyce nowotworów złośliwych wątroby, płuc, jelita grubego, trzustki oraz macicy. Około 80% dorosłych kobiet z rakiem jajników ma podwyższone stężenie CA125. Ponad 50% chorych z wysokim stężeniem CA125 ma nowotwór złośliwy, natomiast jedynie u 5% z takim stężeniem antygeny stwierdzono wzrost łagodny (diagnostyka różnicowa). Po-

nadto u zdrowych kobiet stężenie tego antygeny jest uzależnione od stanu hormonalnego. Wykazano, że stężenie antygeny koreluje ze stopniem zaawansowania raka jajnika i szyjki macicy (przerzuty do węzłów chłonnych i odległe), jak również z odsetkiem 5-letniego przeżycia. Niskie stężenie CA125 jest korzystnym czynnikiem prognostycznym w tych nowotworach. Marker ten jest dodatkowo niezależnym prognostykiem wznowy nowotworu. Wykazano, że wzrost stężenia antygeny po terapii wyprzedzał średnio o 6 miesięcy kliniczne objawy nawrotu choroby nowotworowej [21].

CZYNNIKI MOLEKULARNE

Powstanie komórki nowotworowej uzależnione jest od zaburzenia równowagi trzech procesów: proliferacji, różnicowania i apoptozy. Największą rolę wśród czynników wpływających na nadmierną proliferację jest wysoka aktywność onkogenów (np. *K-ras*, *EGFR*, *HER2*) wywołana ich mutacją. Różnicowanie komórek nowotworowych zostaje zahamowane na wczesnych etapach dojrzewania i może być uzależnione od zaburzeń ekspresji receptorów dla hormonów i innych czynników wzrostu na powierzchni komórki nowotworowej. Zahamowanie apoptozy zależy od wadliwej ekspresji genów supresorowych (np. *p53*, *BRCA-1*) lub nadmiernej antyapoptotycznych onkogenów (np. *Bcl-2*). Wspólną cechą wymienionych markerów nowotworowych jest konieczność ich oznaczania w komórkach nowotworowych i występowanie problemów związanych z dostępnością materiału do badania.

Pomimo faktu coraz powszechniejszego wykorzystania tak zwanych klasycznych markerów nowotworowych (CEA, CA15.3, CA125, AFP itd.), onkolodzy coraz częściej sięgają do badań genetycznych. Markery molekularne, takie jak mutacje w istotnych dla karcynogenezy genach, mogły być wykryte dzięki opracowanej w 1984 roku przez Karry'ego Mullisa technice łańcuchowej reakcji



Pomimo faktu coraz powszechniejszego wykorzystania tak zwanych klasycznych markerów nowotworowych onkolodzy coraz częściej sięgają do badań genetycznych

”
W wielu schorzeniach nowotworowych charakterystyka molekularna komórek nowotworowych pozwala również na ocenę możliwości zastosowania tak zwanych terapii celowanych opartych na lekach, które działają wybiórczo na komórki nowotworowe

polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) oraz technice sekwencjonowania DNA opisanej przez Frederika Sangera w 1981 roku. Uzupełnieniem tych metod są wszelkie modyfikacje metody immunohistochemii (IHC, *immunohistochemistry*), za pomocą których określa się ekspresję białek w komórkach nowotworowych [22, 23].

Obecnie najistotniejsze zarówno z praktycznego, jak i naukowego punktu widzenia jest określenie czynników determinujących odpowiedź na zastosowane leczenie. W wielu schorzeniach nowotworowych charakterystyka molekularna komórek nowotworowych pozwala również na ocenę możliwości zastosowania tak zwanych terapii celowanych opartych na lekach, które działają wybiórczo na komórki nowotworowe. Terapię taką cechuje stosunkowo duża skuteczność oraz względnie mała liczba powikłań, która znacząco wzrasta po zastosowaniu standardowej radioterapii lub chemioterapii. Niejednokrotnie wybór między mniej lub bardziej intensywną terapią podyktowany jest obecnością lub brakiem określonych czynników prognostycznych, a przede wszystkim predykcyjnych.

ONKOGENY

■ *K-ras*

Białko Ras bierze udział w przekazywaniu sygnałów mitogennych. Mutacja onkogenu *K-ras* w kodonie 12, 13 i 61 skutkuje nadmierną aktywnością Ras i zwiększonym potencjałem podziałowym komórek nowotworowych. Ma to miejsce w raku płuca, głowy i szyi, jelita grubego. Chorzy z mutacjami w genie *K-ras* odznaczają się zazwyczaj gorszym rokowaniem i często szybszą progresją choroby. Ponadto aktywacja szlaku sygnałowego, w którym bierze udział Ras, prowadzi do uniezależnienia komórki od przekazywania sygnałowego pochodzącego z receptorów błonowych, a w konsekwencji warunkuje oporność na terapię anty-EGFR. Chorzy z mutacjami *K-ras* w komórkach raka jelita

grubego odznaczali się słabszą odpowiedzią na leczenie cetuksymabem — przeciwciałem monoklonalnym blokującym zewnątrzkomórkową domenę EGFR. Natomiast wartość predykcyjna mutacji *K-ras* w leczeniu inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR (EGFR-TKI, *epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor*) w niedrobnokomórkowym raku płuca nie została dowiedziona [24, 25].

■ *HER2*

Receptor ten jest kodowany przez onkogen *ErbB2* i należy do rodziny receptorów HER (*human epidermal growth factor receptors*). Receptor HER2 tworzy homo- lub heterodimery z innymi członkami rodziny HER (EGFR, ErbB3, ErbB4), co prowadzi do fosforylacji wewnątrzkomórkowej domeny receptora. Fosforylacja powoduje aktywację szlaku sygnałowego inicjującego proliferację i zahamowanie apoptozy komórek. Nadmierna aktywacja tego szlaku wiąże się z występowaniem oporności na terapię hormonalną w raku sutka. W związku z tym amplifikacja lub nadekspresja onkogenu *HER2* stanowi ważny czynnik predykcyjny w wielu terapiach systemowych stosowanych w inwazyjnym raku piersi. Obiecujące wyniki dało zastosowanie terapii celowanej — przeciwciała monoklonalnego anty-HER2 (trastuzumab) u kobiet chorych na raka piersi wykazujących nadekspresję HER2. Podobne wyniki uzyskano w leczeniu lapatynibem — pierwszym w Polsce podwójnie (anty-EGFR i anty-HER2) celowanym drobnocząsteczkowym lekiem stosowanym łącznie z kapecytabiną. Terapię lapatynibem zaleca się w przypadku przerzutowego raka piersi lub w późnych stadiach zaawansowania nowotworu u chorych z nadekspresją HER2. Wyniki ostatnich badań dotyczących zaburzeń w obrębie genu *HER2* w raku płuca wskazują na wartość prognostyczną i predykcyjną tego markera również w tym typie nowotworu [26].

■ **EGFR**

Zaburzenia w ekspresji EGFR (HER1) wiążą się z patogenezą wielu nowotworów. Wywołują nadmierną proliferację komórek i upośledzenie ich apoptozy. Mutacje w obrębie genu *EGFR* warunkują skuteczność leczenia EGFR-TKI w niedrobnokomórkowym raku płuca (drobnocząsteczkowe leki — erlotynib i gefitynib). Są to między innymi: 19 rodzajów delecji w egzonie 19, substytucja L858R w eksonie 21 oraz substytucja G719X w egzonie 18. Mutacje występują u około 10% chorych rasy białej oraz u 30–40% chorych rasy żółtej. W badaniach dowiedziono, że pacjenci z mutacją charakteryzującą się znacznie wyższym odsetkiem odpowiedzi na leczenie niż pacjenci z dzikim typem genu (70–80% v. 1–7%). Z kolei mutacja T790M w egzonie 20 genu *EGFR*, jak również liczne insercje w tym egzonie, warunkują wtórną oporność na leczenie. Mutacje te powodują zmianę konformacji kieszonki dla ATP w domenie kinazy tyrozynowej, co powoduje ułatwione lub utrudnione dopasowanie się leku. Dochodzi do zablokowania lub uaktywnienia szlaku sygnałowego komórki, w którym uczestniczą między innymi p83, PI3K, p110, powodujące zaburzenia apoptozy i proliferacji komórek nowotworowych [27].

GENY SUPRESOROWE

■ **BRCA1**

Gen supresorowy *BRCA1* koduje białko odpowiedzialną za regulację prawidłowej homeostazy komórki. Białko BRCA1 może aktywować transkrypcję i jest zaangażowane w procesy naprawy DNA i regulację cyklu komórkowego. Utrata funkcji białka BRCA1, na przykład w wyniku mutacji, skutkuje niestabilnością chromosomową, co w konsekwencji prowadzi do rozpoczęcia procesu nowotworowego. Mutacja *BRCA1* jest bardzo często wykrywana u kobiet chorych na raka piersi. Nowotwory piersi ze stwierdzoną mutacją genu

BRCA1 wykazują ekspresję cytokeratyn 5/6 oraz 14 oraz brak receptorów estrogenowych. Dodatkowo stwierdza się w nich zazwyczaj zaburzenia w ekspresji EGFR, a także wysoki odsetek mutacji w genie supresorowym *p53* (zespół predyspozycji do wystąpienia nowotworów — Li-Fraumeni). Kobiety, u których wykryto mutację genu *BRCA1*, cechuje zwykle gorsze rokowanie. Ponadto proces nowotworowy rozpoczyna się u nich w młodszym wieku niż u osób z dzikim typem genu [27].

Wszystkie te obserwacje czynią z oznaczania mutacji w genie *BRCA1* użyteczne badanie w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu raka sutka. Nie można też zapominać, że wysoka zdolność komórek nowotworowych do naprawy DNA, w którym uczestniczy białko BRCA1, jest jedną z przyczyn nieskuteczności cytostatyków, działających na zasadzie uszkodzenia podwójnej helisy. Wysoka ekspresja BRCA1 oraz enzymu egzonukleazy o nazwie ERCC1, jest czułym, niekorzystnym czynnikiem predykcyjnym w terapii cisplatyną i karboplatyną oraz skłania do zastosowania chemioterapii opartej na cytostatykach, blokujących wrzeciono podziałowe (alkaloidy *vinca* i taksany). Co więcej, mutacje w genie *BRCA1* są jednym z najpowszechniej używanych markerów ryzyka wystąpienia raka sutka i narządów rodnych u kobiet, które posiadały krewnie z tym typem nowotworu. Diagnostyka zespołu dziedzicznego (rodzinnego) (FCA, *familial cancer aggregation*) występowania nowotworów (CFS, *cancer family syndrome*) pozwala na bardzo wczesne rozpoznanie raka sutka oraz podjęcie działań prewencyjnych, niedopuszczających do rozwoju tej choroby. Wśród innych genów, których mutacje sprzyjają rozwojowi FCA oraz chorób o podłożu autoimmunologicznym, należy wymienić: *CHEK2* — rak sutka i prostaty, *NOD2* — nieswoiste zapalenie jelit, *MSH2* i *MLH1* — dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością [28–30].

■ p53

Gen supresorowy *p53* koduje czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za prawidłową ekspresję wielu innych genów zaangażowanych między innymi w regulację cyklu komórkowego, procesy apoptozy oraz naprawy DNA. W prawidłowych warunkach stężenie tego czynnika jest niskie, jednak pod wpływem uszkodzenia DNA przez karcynogeny stabilizuje się i akumuluje, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy. Dzięki procesowi apoptozy możliwa jest eliminacja uszkodzonych komórek i utrzymanie homeostazy organizmu. W komórkach nowotworowych *p53* jest nieaktywne, co prowadzi do zahamowania apoptozy, wzrostu proliferacji, a w konsekwencji powoduje niekontrolowany wzrost zmienionej nowotworowo tkanki. Gen *p53* podlega częstym mutacjom, w wyniku czego ekspresji ulega białko o nieprawidłowej strukturze i upośledzonej zdolności wiązania się do DNA. Mutacje w genie *p53* zostały zidentyfikowane niemal w każdym typie nowotworu. W wielu chorobach nowotworowych zmutowany gen *p53* był wykrywany jeszcze w stanie przednowotworowym (dotyczy to szczególnie schorzeń rozwijających się w wyniku działania karcynogenów). Mutacje w genie *p53* podlegające dziedziczeniu objawiają się zespołem chorobowym Li-Fraumeni.

Wartość prognostyczna mutacji genu *p53* została potwierdzona między innymi w raku piersi i płuca. Jej obecność wiąże się z dwoma podtypami nowotworu o najgorszym rokowaniu. Trwają badania nad terapiami ukierunkowanymi molekularnie, których działanie skierowane jest na zmutowane białko *p53* (PRIMA-1 oraz RITA). Leki te pozwalają przywrócić zdolność czynnika *p53* do działania supresyjnego, powodując zmianę konformacji zmutowanego białka w konformację zbliżoną do czynnika powstałego w wyniku ekspresji dzikiego genu *p53*. W przyszłości oznaczanie mutacji genu *p53* może się okazać kluczowe w doborze odpo-

wiedniej, zindywidualizowanej i skutecznej terapii [31, 32].

MARKERY RÓŻNICOWANIA

■ ER i PgR

Ekspresja receptorów dla estrogenu (ER) i progesteronu (PgR) jest oznaczana w raku piersi. Nieprawidłowa budowa i funkcja tych receptorów jest czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój hormonozależnych nowotworów piersi. Ze względu na niski procent odpowiedzi na terapię endokrynną (ok. 33%) zaistniała potrzeba wyselekcjonowania grupy pacjentek, które odniosą korzyść z terapii. Do metod oznaczania ER i PgR w tkance nowotworowej, które znalazły zastosowanie w praktyce klinicznej, należą: metoda LBA — próba wiązania liganiu oraz badanie IHC. Terapia antyestrogenowa (np. tamoksyfen) prowadzi do zmniejszenia syntezy czynników wzrostu komórek oraz wzmacnia tworzenie receptorów progesteronowych. Skutkuje to zmniejszeniem zdolności do podziału komórek nowotworowych estrogenozależnych. Jest to obecnie najskuteczniejsza metoda leczenia w raku piersi. Obecność receptorów ER i PgR ma wysoką wartość predykcyjną w monitorowaniu odpowiedzi na terapię hormonalną [33].

MOLEKULARNA DIAGNOSTYKA ONKOLOGICZNA W POLSCE

W Polsce zanotowano około 0,5–1 miliona nosicieli mutacji genowych, ściśle powiązanych z nowotworami o potwierdzonym podłożu genetycznym. Prawdopodobieństwo, że u tych osób rozwinię się nowotwór dziedziczny, sięga aż 90%. Często jednak jest ono niższe, co jest uwarunkowane typem mutacji, obecnością genów modyfikujących, czynnikami środowiskowymi czy wreszcie rodzajem genu, który uległ mutacji. Szacuje się, że wśród chorych na nowotwory złośliwe 5–10% stanowią osoby obciążone rodzinnie pewnymi cechami dziedzicznymi w sposób autosomalnie dominujący (co implikuje

50-procentowe ryzyko wystąpienia nowotworu u członków rodziny). Do tej grupy należą między innymi rak jelita grubego, rak sutka i rak jajnika. Kolejne 20–30% stanowią chorzy na nowotwory, których patogenezą zależy od dziedziczenia wielogenowego. W przypadku osób, u których proces nowotworowy jest wynikiem dziedziczenia zaburzeń więcej niż jednego genu, ryzyko zachorowania członków rodziny wynosi mniej niż 10%. Członkowie rodzin dotkniętych zespołem dziedzicznej predyspozycji do nowotworów wymagają stosowania rozszerzonych programów badań kontrolnych rozbudowanych o specjalistyczne badania molekularne, wnikliwe badania kliniczne oraz obowiązkowe badanie rodowodów [34].

Onkologiczna diagnostyka molekularna wydaje się być obiecującym kierunkiem. Przykładem wykorzystania możliwości badań molekularnych w diagnostyce jest działalność Międzynarodowego Centrum Nowotworów Dziedzicznych Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie. Jednak przy obecnym stanie służby zdrowia w Polsce w najbliższym czasie diagnostyka molekularna nie będzie miała zastosowania do wykonywanych na szeroką skalę badań przesiewowych. W dobie światowego kryzysu tylko nieliczne, bogate państwa są w stanie stosować bardzo drogie, wysoko specjalistyczne badania diagnostyczne w profilaktyce nowotworów. Ponieważ stosunkowo niewielki odsetek chorych z nowotworami wymaga dokładnej analizy molekularnej, stosowanie zaawansowanych metod diagnostycznych w celach profilaktycznych skutkowałoby ponoszeniem ogromnych kosztów. W ujęciu

ekonomicznym nie miałyby to i tak przełożenia na konkretne wyniki stosowanej terapii. Jeżeli jednak rozważymy liczbę osób, u których rokrocznie wykrywa się nowe nowotwory, wówczas wczesne wykrycie nawet niewielkiego procenta chorych stanowi ogromną liczbę ludzi, którzy zdiagnozowani we wczesnym stadium mają ogromne szanse na radykalną terapię. Dodatkowo biorąc pod uwagę koszty wielomiesięcznego leczenia chorych na nowotwory (nawet kilkadziesiąt tys. złotych), zastosowanie diagnostyki molekularnej (od kilkuset złotych do około 2 tys. złotych) wydaje się uzasadnione zarówno z punktu widzenia zdrowia pacjenta, jak i ekonomii. Niestety, obecnie w naszym kraju tylko kilka laboratoriów istniejących poza Centrami Onkologii prowadzi profesjonalną diagnostykę molekularną.

Kolejny problem to brak odpowiedniej podstawy prawnej. Podmioty te są zazwyczaj zlokalizowane w ośrodkach akademickich, a diagnostyka molekularna jest tam prowadzona dodatkowo w ramach wykonywanych statutowo badań naukowych. Z tego względu prowadzone tam badania molekularne nie podlegają procedurom standaryzacji i nie posiadają pełnoprawnej wartości diagnostycznej (jak ma to miejsce w przypadku laboratoriów diagnostycznych). Ze względu na niedostateczną regulację prawną zasad finansowania oraz rozliczania kosztów analiz z ewentualnym usługobiorcą, badania molekularne w dalszym ciągu nie mają racji bytu poza lokalnymi szpitalami specjalistycznymi, przy których dany ośrodek akademicki jest zlokalizowany [35].

PIŚMIENNICTWO

1. Curado M.P., Edwards B., Shin H.R. i wsp. Cancer Incidence in Five Continents. IARC Scientific Publication 2007; 9: 1–101.
2. Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku. Biuletyn Krajowego Rejestru Nowotworów 2008: 1–145.

3. Horner M.J., Ries L.A.G., Krapcho M. i wsp. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2006, National Cancer Institute. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/
4. Micheli A., Coebergh J.W., Mugno E. i wsp. European health systems and cancer care. *Ann. Oncol.* 2003; 14 (5): 41–60.
5. Pawlicki M., Michalczyk A. Badania przyczyn opóźnień leczenia chorych na nowotwory złośliwe. *Współczesna Onkologia* 2005; 9 (5): 191–195.
6. Radzikowska E., Roszkowski K., Głaz P. Rak płuca — opóźnienia w procesie diagnostyczno-lecniczym. *Pneumol. Alergol. Pol.* 2001; 69 (11–12): 600–610.
7. Pawlicki M., Żuchowska-Vogelgesang B., Rysz B., Rachtan J., Brandys A. Wyniki badań nad przyczynami opóźnień w leczeniu u chorych na raka piersi z próbą oceny wpływu czynników psychologicznych. *Współczesna Onkologia* 1999; 6: 253–258.
8. Lindblom A., Liljegren A. Tumour markers in malignancies. *Clin. Rev.* 2000; 320: 424–427.
9. Magdalenat H. Tumours markers in oncology: past present and future. *J. Immun. Meth.* 1992; 150: 133–143.
10. Duffy MJ., Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clinical Chemistry* 2008; 54 (11): 1770–1779.
11. Pamies R.J., Crawford D.R. Tumor markers — an update. *Cancers Screening and Diagnosis* 1996; 1 (80): 185–199.
12. Sarandakou A., Protonotariou E., Rizos. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2007; 44 (2): 151–178.
13. Bogusz D., Andrusiewicz M. Markery nowotworowe — podział i zastosowanie. *Onkologia info* 2009; 1 (27): <http://onkologia.resmedica.pl/2009/08/11/>
14. Paduch R., Klatka J. Markery nowotworowe. *Onkol. Pol.* 2003; 2: 77–82.
15. Ławicki S., Mroczo B., Szmikowski M. Markery nowotworowe raka piersi. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2004; 58: 292–300.
16. Zhou L., Liu J., Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12 (8): 1175–1181.
17. Duffy M.J. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clinical Chemistry* 2001; 47 (4): 624–630.
18. Fry LC., Mönkemüller K., Malfertheiner P. Molecular markers of pancreatic cancer: development and clinical relevance. *Langenbecks Arch. Surg.* 2008; 393 (6): 883–890.
19. Molina R., Barak V., van Dalen A. i wsp. Tumor markers in breast cancer — European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol.* 2005; 26 (6): 281–293.
20. Seregni E., Coli A., Mazzucca N. Italian Group RIA-IRMA Test, Italian Association of Nuclear Medicine. Circulating tumour markers in breast cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2004; 1: 15–22.
21. Goonewardene T.I., Hall M.R., Rustin G.J. Management of asymptomatic patients on follow-up for ovarian cancer with rising CA-125 concentrations. *Lancet Oncol.* 2007; 8 (9): 813–821.22.
22. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975; 94 (3): 441–448.
23. Bartlett J.M., Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 2003; 226: 3–6.
24. Ličvre A., Bachet J.B., Boige V. i wsp. Mutacje KRAS jako niezależny czynnik prognostyczny u chorych z zaawansowanym rakiem okrężnicy leczonych cetuksymabem. *J. Clin. Onkol.* 2008; 6 (3): 199–206.
25. Zhu CQ., da Cunha Santos G., Ding K. i wsp. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26 (26): 4268–4275.
26. Prat A., Baselga J. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2008; 5 (9): 531–542.
27. Rosell R., Taron M., Reguart N., Isla D., Moran T. Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12 (24): 7222–7231.
28. Ferla R., Calo V., Cascio S. i wsp. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. *Ann. Oncol.* 2007; 18 (6): 93–98.
29. James C.R., Quinn J.E., Mullan P.B., Johnston P.G., Harkin D.P. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *Oncology* 2007; 12 (2): 142–150.
30. Pasz-Walczak G., Jesionek-Kupnicka D., Kubiak R., Kordek R. Podstawowe mechanizmy kancerogenezy w jelicie grubym. *Współczesna Onkologia* 2004; 8 (6): 303–307.
31. Almazov V.P., Kochetkov D.V., Chumakov P.M. The use of p53 as a tool for human cancer therapy. *Mol. Biol. (Mosk).* 2007; 41 (6): 947–963.
32. Bertheau P., Espié M., Turpin E. i wsp. TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology* 2008; 75 (2): 132–139.
33. Van Den Bossche B., Van Belle S., De Winter F., Signore A., Van de Wiele C. Early prediction of endocrine therapy effect in advanced breast cancer patients using 99mTc-depreotide scintigraphy. *J. Nucl. Med.* 2006; 47 (1): 6–13.
34. Jakubowska A., Dębniak T., Byrski T. i wsp. Genetyka we wczesnej diagnostyce nowotworów. *Współczesna Onkologia* 2000; 4 (5): 186–189.
35. Pierzchalski P., Zazula M., Stój A. i wsp. Czy onkologiczna diagnostyka molekularna jest potrzebna? *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska* 2009; 6 (1): 65–67.