

*Janusz A. Siedlecki

Diagnostyka molekularna nowotworów

Genetic and molecular diagnostics of cancer

Zakład Biologii Molekularnej w Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Janusz A. Siedlecki

Streszczenie

W przedstawionym artykule omówiono różne aspekty wykorzystania zdobyczy biologii molekularnej nowotworów do celów diagnostycznych. Pokrótkę przedstawiono opis najczęściej stosowanych metod, ich wady i zalety, a także omówiono zagadnienia związane z wykrywaniem zmian w materiale genetycznym. Szerzej omówiono związki pomiędzy terapią celowaną a nowoczesną diagnostyką genetyczną. Wskazano też na konieczność wypracowania nowych standardów postępowania diagnostycznego, szczególnie w zakresie diagnostyki genowej.

Słowa kluczowe: diagnostyka molekularna, markery molekularne, prognozowanie, terapia celowania

Summary

Based on general biological features of tumor cell various aspects of molecular diagnostics of cancer are discussed. Briefly the most commonly used methods are described and their advantages and disadvantages are discussed. The issues relating to the detection of changes in the genetic material are presented. The article also discussed in details the relationship between targeted therapy and the modern genetic diagnosis. The necessity of development of new standards for the diagnosis, especially in terms of gene diagnosis are underlined.

Key words: molecular diagnostic, molecular markers, prognosis, directed therapy

Nowotwór jest wynikiem zmian w materiale genetycznym komórki (1, 2). Każda zmiana niesie ze sobą mniejsze lub większe prawdopodobieństwo zaburzenia w ścieżkach metabolicznych. Białkowe produkty uszkodzonych genów zmieniają przebiegi podstawowych procesów zachodzących w komórkach takich jak proliferacja, różnicowanie, zmiana właściwości adhezyjnych i umieranie komórek. Najczęściej zmiany te mają jednak ilościowy charakter. Oznacza to, że aby odróżnić fenotyp prawidłowy od nowotworowego należy stosować normy. Tak właśnie dzieje się z tzw. markerami nowotworowymi. Są to głównie białka lub ich fragmenty. Do ich wykrycia wykorzystuje się głównie przeciwciała poli- lub monoklonalne oraz reakcje enzymatyczne. Tego typu markery biologiczne stosowane są rutynowo w praktyce klinicznej, jednak rzadko kiedy stanowią podstawę decyzji diagnostycznych (3). W przeciwieństwie do markerów nowotworowych markery genowe mają charakter zero-jedynkowy. Oznacza to, że zawsze mamy do czynienia z sytuacją obecności lub braku zmiany. Problem leży w fakcie, że nie wszystkie zmiany w materiale genetycznym są równocenne. Jednak ich suma prowadzi

do nabycia zdolności do nieograniczonego dzielenia się i utraty zdolności do umierania. Pytania o ilość zmian koniecznych do zmiany fenotypu, jak i o wagę poszczególnych zmian ciągle jeszcze pozostają bez odpowiedzi.

Markery genetyczne znajdują zastosowanie w badaniach predyspozycji rodzinnych do zapadania na choroby nowotworowe, w niewielkim stopniu w diagnozowaniu chorób nowotworowych, coraz częściej w prognozowaniu przebiegu choroby, a także jak wykazano ostatnio w podejmowaniu decyzji terapeutycznych (3).

PREDYSPOZYCJE DO ZAPADANIA NA CHOROBY NOWOTWOROWE

Choroby nowotworowe nie są chorobami dziedzicznymi. Dziedziczy się jedynie pewne predyspozycje do zachorowania. Predyspozycje do zachorowań związane są dwoma kategoriami zmian w genomie: predyspozycjami silnymi i słabymi. **Predyspozycje silne** są wynikiem uszkodzeń w genach supresorowych i genach kodujących elementy systemu naprawy DNA. Mówimy o takich genach, że cechuje je duża penetracja.

Przykładami takich genów są: *BRCA1* i *BRCA2* w przypadku raka piersi i/lub raka piersi i jajnika, *MTS1* (inaczej *p16* lub *INK4*) w przypadku czerniaka czy *MSH2* i/lub *MLH1* w raku jelita grubego bez polipowatości. **Predyspozycje słabe** związane ze zjawiskiem polimorfizmu genowego. Genom ludzki cechuje stosunkowo niewielka zmienność sięgająca w obszarze sekwencji kodujących 0,1%. Są jednak w genomie obszary, gdzie zmienność dochodzi nawet do kilkunastu procent. W genomie człowieka można wyróżnić dwie grupy genów, w których polimorfizm genetyczny może rzutować na osobniczą odporność/wrażliwość do zapadania na różne choroby, w tym również na choroby nowotworowe. Pierwsza to geny, których produkty związane są z procesami detoksykacyjnymi. Komórki są wyposażone w dwa różne systemy usuwające genotoksyczne związki chemiczne ze swojego środowiska – system oporności wielolekowej, zwany też systemem aktywnego transportu ABC (4) i system detoksykacyjny (5). W procesach detoksykacji bierze udział około 20-25% wszystkich genów komórki. Druga grupa, choć znacznie mniejsza, ale równie ważna to geny kodujące elementy systemów naprawczych. Jeżeli substancje kancerogenne pomimo wszystko spowodują powstanie zmian (mutacji) w genomowym DNA, to produkty tej klasy genów podejmują próby usunięcia tych zmian. Komórka ma siedem podstawowych systemów naprawczych i około 15 systemów ratunkowych (6).

Zarówno w przypadku genów detoksykacyjnych, jak i genów naprawy DNA każda nawet niewielka zmiana może być przyczyną zmiany wrażliwości na kancerogeny. Pojedyncza zmiana w genie może jedynie w niewielkim stopniu wpływać na wrażliwość na dany kancerogen, ale zmiany w wielu genach mogą się sumować. Oznacza to, że podatność na obecność substancji kancerogennych w wielkim stopniu związana jest z osobniczym tłem genetycznym.

Istnieje wiele testów genetycznych pozwalających na określenie indywidualnych predyspozycji do zachorowania na choroby nowotworowe. Testy te pozwalają na zbadanie stopnia uszkodzenia zarówno genów o dużej penetracji (przykładowo test na obecność mutacji w genie *BRCA1* oceniający trzy podstawowe mutacje w populacji polskiej), jak i testów pozwalających na badanie konkretnych polimorfizmów w genach detoksykacyjnych i/lub genach naprawy DNA. W tej ostatniej grupie badane są obecnie testy oparte o techniki pozwalające na jednoczesne zbadanie polimorfizmów (tzw. SNP) w wielu różnych genach (7).

WCZESNE ROZPOZNANIE – IDENTYFIKACJA MUTACJI

Analiza materiału genetycznego komórki umożliwia identyfikację zmian genetycznych (zmiany w materiale genetycznym nie zawsze oznaczają mutację) charakterystycznych dla komórki nowotworowej. Podstawowym problemem z jakim spotykamy się w przypadku komórki o fenotypie nowotworowym jest mnogość zmian w

jej genomie. Nie znaczy to wcale, że pojedyncza zmiana nie może służyć jako molekularny marker nowotworowy. Ale trzeba sobie zdawać sprawę, że badana zmiana może występować na wczesnych etapach kancerogenezy. W większości typów komórek nowotworowych obserwuje się nawet do kilkunastu zmian. Dodatkowym utrudnieniem jest duża niestabilność genomu komórki nowotworowej, co w konsekwencji prowadzi do powstania wielu klonów komórek o fenotypie nowotworowym. W wyniku presji selekcyjnej guz nowotworowy jest zwykle oligoklonalnym rozrostem komórek nowotworowych. Każdy klon ma jednak swoją własną sygnaturę molekularną. Oznacza to, że guz nowotworowy w zależności od proporcji klonów może mieć zmienną sygnaturę molekularną. Jest to główna przyczyna, dla której prowadzone od kilku lat badania z wykorzystaniem techniki mikromacierzy DNA nie doprowadziły jak dotychczas do ustalenia diagnostycznej sygnatury danego nowotworu.

Badania mikromacierzowe mogą jednak posłużyć do wyselekcjonowania pewnej puli zmienionych genów, których status może być następnie badany niezależnie. Tego typu badania można prowadzić wieloma metodami. Do najpopularniejszych należą techniki PCR, PCR-RFLP, SSCP oraz sekwencjonowanie. Status tych genów może dostarczyć wielu informacji zarówno o przebiegu choroby, jak i wskazywać na wybór odpowiedniej terapii. Klasycznym przykładem jest tu rak jelita grubego. Mutacja w genie *K-RAS* oznacza bardziej agresywny przebieg choroby, a ich obecność determinuje wybór terapii (8). Równie istotnym markerem w raku jelita grubego jest uszkodzenie supresora *DCC* (ang. *deleted in colon cancer*) (9). Tego typu obserwacji w trakcie badań nad biologią komórki nagromadzono bardzo dużo.

Znalezienie związku między zmianami (mutacjami) w określonym genie, czy nawet w określonej pozycji danego genu, a jednostką chorobową oraz agresywnością przebiegu choroby zdarza się rzadko. Dotychczas udało się rozpoznać tylko kilka takich przypadków.

Większość dotychczasowych doświadczeń wskazuje, że podobne mutacje występują w torach mutacyjnych prowadzących do powstawania różnych typów nowotworów. Przykładem znowu mogą być mutacje we wspomnianym już genie *K-RAS*, które są charakterystyczne dla wielu chorób nowotworowych (1). Zmiany w tym genie obserwuje się w około 90% przypadków raka trzustki (niestety zmiany w tym genie obserwuje się także w stanach zapalnych trzustki), 40% przypadków raka jelita grubego i 30% raka płuca (jednak aż w 57% przypadków niedrobnokomórkowego raka płuca i tylko w 21% przypadków płaskonabłonkowego raka płuca). Podobne dane zgromadzono dla genu *TP53* (10). Zmiany w tym genie obserwuje się w ponad 55% wszystkich nowotworów. Zmiany w genie *RB* są charakterystyczne dla 25% komórek nowotworowych.

PROGNOZOWANIE PRZEBIEGU CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Markery molekularne wykorzystywane są dziś dość powszechnie jako narzędzia prognostyczne. W ciągu wielu lat badań nagromadzono ogromną ilość informacji o związkach pomiędzy przebiegiem choroby a obecnością pewnych zmian w materiale genetycznym (11, 12).

Amplifikacja niektórych onkogenów to często obserwowane zjawisko w komórkach nowotworowych. Najczęściej wiąże się ono ze wzrostem agresywności nowotworu, a więc jest wskaźnikiem złej prognozy. Zmiany wywołane amplifikacją genu są możliwe do wykrycia metodami immunochemicznymi przy pomocy przeciwciał monoklonalnych albo molekularnymi z wykorzystaniem odpowiednich sond lub techniki PCR.

Przykładem związku pomiędzy amplifikacją genu a procesem nowotworowym jest rak piersi. Amplifikacje proto-onkogenu *ERB-B2* obserwuje się w około 20% przypadków i jest ona wskaźnikiem złej prognozy (13). Podobną zależność obserwuje się w *neuroblastoma*, gdzie amplifikacja genu *N-MYC* jest świadectwem agresywności choroby. W praktyce uważa się, że jeżeli liczba kopii genu *N-MYC* przekracza 10, rokowanie dla pacjenta jest złe i należy stosować radykalne sposoby leczenia (11).

Równie dobrym przykładem zastosowania markera molekularnego do celów prognostycznych wydają się być delecje. Za przykład może tu posłużyć delecja w chromosomie 18q gdzie zlokalizowany jest już wcześniej wspomniany gen *DCC*. Okazuje się, że w grupie pacjentów z drugim stopniem zaawansowania klinicznego, którzy przeżyli pięć lat, brak delecji w regionie 18q obserwowano aż w 93% przypadków. Natomiast w grupie pacjentów z trzecim stopniem choroby, którzy przeżyli podobny okres, brak delecji 18q obserwowano natomiast jedynie u 53% przypadków (9).

Wykrywanie obecności komórek nowotworowych w węzłach chłonnych oraz płynach i wydzielinach ustrojowych

Aby wykryć obecność komórek nowotworowych w otoczeniu składającym się z innych, trzeba znaleźć marker, który będzie w stanie odróżnić tę komórkę od komórek otoczenia. **Tego typu markery zaliczamy do klasy markerów tkankowo-specyficznych.**

Przykładowo w przypadku melanocyty takim tkankowo-specyficznym procesem jest synteza melaniny. Kluczowym enzymem w szlaku syntezy melaniny jest tyrozynaza – enzym katalizujący utlenianie tyrozyny do DOPA i dalej do dopachinonu. Gen tyrozynazy jest więc aktywnie transkrybowany jedynie w melanocytach i komórkach czerniaka (melanina syntetyzowana jest jeszcze w komórkach Schwanna). Tak więc mRNA tyrozynazy jest idealnym kandydatem do wykorzystania jako marker obecności komórek czerniaka w otaczającym je mikrośrodowisku. Czerniak jest nowotworem cechującym się bardzo dużą agresywnością. Oznacza to, że już w bardzo wczesnej fazie rozwoju choroby może dochodzić do migracji komórek nowotworowych i przemieszczania się ich w inne regiony organizmu.

Dzięki technice RT-PCR możliwe jest otrzymanie nawet ponad miliarda kopii szukanego mRNA. Tak duże wzmocnienie stwarza szansę na znalezienie komórek czerniaka zarówno w tkance, jak i w płynach ustrojowych, do których komórki te się przedostały (14, 15).

Technika RT-PCR może być wykorzystana do poszukiwania komórek krążących w krwi obwodowej i chłonce. Dotychczas opracowano wiele testów opartych o metodę RT-PCR. Są one bardzo czułe i najczęściej wysoce specyficzne. Wykorzystuje się w nich albo pojedynczy marker, albo dwa markery lub więcej markerów równocześnie. Dodanie kolejnego markera poprawia zwykle czułość testu o kolejne kilka procent, czyniąc go znacznie bardziej precyzyjnym. Jednocześnie jednak rosną koszty testu i stopień jego skomplikowania. Dlatego większość użytecznych, stosowanych w praktyce testów zawiera nie więcej niż dwa, trzy markery. Należy jednak zaznaczyć, że praktycznie bezwartościowe jest przeprowadzenie testu na obecność komórek krążących tylko raz. Nie ma bowiem statystycznie istotnego związku pomiędzy dodatnim wynikiem testu a przebiegiem choroby. Dlatego najkorzystniej jest powtarzać to badanie wielokrotnie. Najlepiej w trakcie każdej wizyty kontrolnej (16).

W Centrum Onkologii we współpracy między Kliniką Nowotworów Tkanek Miękkich i Kości prowadzoną przez prof. Piotra Rutkowskiego i Zakładem Biologii Molekularnej prowadzonym przez prof. J. Siedleckiego wykorzystano opracowany wcześniej wielomarkerowy test do przewidywania przebiegu choroby u pacjentów w trzecim stopniu zaawansowania po terapeutycznej limfadenektomii. W tej grupie pacjentów przeżycia wahają się od 24 do 65%. Do badania użyto płynu z drenażu pobranego między 24 a 48 godziną od zabiegu chirurgicznego. Dotychczas zebrane dane w grupie około 250 pacjentów wskazują, że chorzy, w płynie których wykryto obecność komórek czerniaka, mają znacznie gorsze rokowanie niż ci, w płynie których takich komórek nie znaleziono (16).

W mięsaku Ewinga najczęściej, bo w ponad 80% przypadków, obserwowana jest translokacja t(11;22)(q24;q12). W jej efekcie gen *EWS* zlokalizowany na chromosomie 22q12 o nieznannej jeszcze funkcji ulega fuzji z genem *FLI-1* kodującym czynnik transkrypcyjny z rodziny ETS. Rodzina ta składa się z 5 członków: *FLI1*, *ERG*, *ETV*, *FEV*, *E1AF*. W mięsakach Ewinga obserwuje się też inne rzadsze translokacje np. t(11;22)(p13;q12), w której dochodzi do fuzji między genem *EWS* a genem *WT1* czy t(21;22)(q22;q12), gdy obserwuje się fuzję genu *EWS* z innym członkiem rodziny *ETS* – genem *ERG* (17, 18). Ponieważ mięsaki rozsiewają się drogą krwionośną, wykrycie mRNA zawierającego translokację jest markerem obecności komórek krążących w krwioobiegu, a więc rozsiewu nowotworu.

Badanie choroby resztkowej

Kolejnym ciekawym obszarem działalności diagnostycznej jest badanie

choroby resztkowej. W wielu nowotworach po remisji klinicznej obserwuje się po pewnym czasie wznowę choroby. Przyczyną tego zjawiska jest przetrwanie pewnej niewielkiej populacji komórek nowotworowych w niektórych domenach organizmu (węzeł chłonny, krew, szpik, płyn mózgowo-rdzeniowy). Obecność tej małej populacji komórek nowotworowych można śledzić, jeżeli zna się wystarczająco dobrze zmiany, jakie występowały w nowotworze pierwotnym. Dobrym przykładem jest tu chłoniak grudkowy. Jedną ze zmian w komórkach chłoniaka grudkowego jest translokacja t(14;18). W jej wyniku antyapoptyczny gen *BCL-2* dostaje się pod promotor genu immunoglobulinowego. Obecność genu hybrydowego (właściwie obecność złącza) można wykryć, badając DNA izolowane z krwi obwodowej lub szpiku kostnego. W tym przypadku najlepszą metodą badawczą jest ilościowy PCR. Metoda ta pozwala dokładnie obliczyć ilość kopii złącza. Jeżeli ilość kopii jest poniżej doświadczonego wyznaczonego poziomu, oznacza to remisję molekularną, czyli brak choroby resztkowej. **W przypadku gdy liczba kopii złącza jest większa od punktu odcięcia, należy kontynuować terapię, aż do osiągnięcia remisji molekularnej (19, 20).**

Wybór terapii

Coraz częściej informacje o zmianach w genomie wykorzystywane są przy wyborze metod terapii. Stały wzrost komórek nowotworowych, ich zdolność do indukowania neoangiogenezy oraz zdolność do wymykania się spod kontroli mechanizmów inhibicji kontaktowej są głównymi celami klasycznej chemioterapii. Większość stosowanych obecnie cytostatyków wywołuje poważne uszkodzenia w materiale genetycznym komórki. W odpowiedzi w komórce wzrasta stężenie białka TP53 i zostają uruchomione systemy naprawcze. Jeżeli uszkodzenia są zbyt duże, a tak właśnie działają cytostatyki, białko TP53 powinno skierować komórkę na drogę apoptozy. Tą drogą eliminowane są bowiem uszkodzone i niesprawne komórki. Jednak w nowotworach, w których gen *TP53* uległ delecji lub jest uszkodzony (np. zmutowany), produkt tego genu jest nieaktywny i nie może spełniać swojej funkcji. Taka sytuacja występuje prawie w 55% nowotworów. Wtedy należy rozważyć inną formę chemioterapii. Jako przykład może tu służyć chemioterapia z użyciem 5FU, którego mechanizm działania polega głównie na hamowaniu transkrypcji, lub zastosowanie taksolu, którego mechanizm działania polega na hamowaniu tworzenia się wrzeciona podziałowego.

Znajomość zmian w genomie jest podstawą doboru leków w tzw. terapii nakierowanej na cele molekularne zwanej też terapią celowaną. Ten rodzaj terapii nastawiony jest na zahamowanie konkretnego szlaku metabolicznego, co najczęściej pociąga za sobą zahamowanie wzrostu guza. Klasycznym lekiem tego typu jest monoklonalne przeciwciało ha-

mujące zdolność do przewodzenia sygnału przez receptor HER2. Nadekspresja HER2 jest często wynikiem amplifikacji genu kodującego ten receptor. W obecności nadmiaru produktu następuje dimeryzacja receptora i samoaktywacja prowadząca do stałego przekazywania sygnału do proliferacji. Przeciwnie, łączęc się z receptorem, hamuje jego zdolność do przewodzenia sygnału.

W ostatnich latach wiele wysiłku skierowano na tworzenie nowej klasy leków, których celem jest hamowanie bądź aktywowanie konkretnych szlaków przekazywania sygnałów. Przykładem tego typu leku jest imatinib. Lek ten opracowany jako inhibitor hybrydowej kinazy ABL/BCR, która powstaje w wyniku translokacji t(9;22) (tzw. chromosom Filadelfia) w przewlekłej białaczce szpikowej, okazał się niezwykle skuteczny nie tylko w terapii przewlekłej białaczki szpikowej, ale także mięsaków podścieliska przewodu pokarmowego (GIST). Okazało się, że w GIST mutacji ulegają dwie kinazy receptorowe KIT i PDGFRA należące do tej samej rodziny co kinaza ABL. Mutacje w genach *KIT* i *PDGFR* prowadzą do trwałej aktywacji kinazy receptora. Tak więc wykrycie obecności mutacji *KIT* lub *PDGFRA* w GIST jest istotne dla przewidywania odpowiedzi na leczenie imatinibem. Dodatkowo w badaniu klinicznym wykazano, że osoby mające mutacje w eksonie 11 reagują na leczenie imatinibem już przy dawce 400 mg na dobę, podczas gdy pacjenci z mutacją w eksonie 9 oraz w obu najczęściej zmutowanych eksonach *PDGFR* dla skutecznej terapii wymagają dawki 800 mg na dobę. Jak dotychczas, jest to jedyny znany przypadek, dla którego wykazano, że umiejscowienie mutacji może determinować sposób leczenia (21, 22).

Niskocząsteczkowy inhibitor EGFR – gefitinib oraz monoklonalne przeciwciało hamujące EGFR – cetuksymab uzyskały rejestrację w leczeniu opornego na chemioterapię niedrobnokomórkowego raka płuca. Okazało się jednak, że zarówno gefitinib, jak i cetuksymab są skuteczne jeżeli EGFR uległ mutacji w eksonach 18, 19 i 21. Natomiast mutacja w eksonie 20 sprzyja pojawieniu się oporności na te leki (23).

Rodzina związków, inhibitorów aktywności kinazowej, które poddawane są obecnie badaniom klinicznym, jest coraz szersza. Szacuje się, że obecnie różnego rodzaju próbom klinicznym poddawanych jest około 200 różnego rodzaju leków celowanych. W tym kontekście diagnostyka molekularna staje się coraz potężniejszym narzędziem wyboru terapii.

Obecnie testuje się też cały panel leków należących do klasy inhibitorów procesów naprawy DNA. Należy się spodziewać, że i w tym przypadku konieczne będzie ustalenie statusu genów naprawczych.

METODYKA OZNACZANIA MARKERÓW GENETYCZNYCH

Biologia molekularna oferuje cały panel metod pozwalających na oznaczanie obecności markera gene-

tycznego. Starsze techniki takie jak hybrydyzacja czy RFLP praktycznie nie są już dziś stosowane. Często dla skrócenia procedur diagnostycznych wykorzystuje się metody przesiewowe (SSCP, heterodupleksy czy DHPLC) pozwalające na wstępną selekcję materiału do szczegółowego badania. Najczęściej posługujemy się dziś technikami opartymi o reakcję łańcuchową polimerazy (PCR). Materiałem amplifikowanym jest zawsze DNA, ale analizowanym materiałem może być zarówno RNA (RT-PCR), jak i DNA (PCR, LCR, PCR-RFLP, MS-PCR). Techniki te umożliwiają w stosunkowo prosty sposób wykazanie obecności zmian charakterystycznych dla danego typu nowotworu. Materiał genetyczny do analizy może być izolowany zarówno bezpośrednio z guza (biopsje cienko- i gruboigłowe, materiał operacyjny), ale może też być izolowany z innych źródeł pod warunkiem, że komórki nowotworowe mogą przedostać się do tych źródeł (krew, mocz, chłonnka, kał). Dzięki technice PCR możliwa jest nawet analiza zmian w pojedynczej komórce (24)

Human Genome Project (HGP) stworzył podwaliny pod techniki pozwalające na jednoczesne skanowanie zmian w wielu genach. Chociaż już wcześniej istniały możliwości analizy wielu zmian w pojedynczych genach, to dopiero stworzenie mikromacierzy DNA (czasami używa się terminu mikrochip) pozwoliło na obserwacje zmian w wielu genach równoległe. Mikromacierze pozwalają nie tylko na analizę zmian w genach. Możemy dzięki nim obserwować również zmiany w obrazie ekspresji, a co za tym idzie określać różnice pomiędzy komórką prawidłową i nowotworową. Wraz z narodzeniem się nowych technik pojawiło się pytanie, na ile obraz ekspresji charakteryzuje dany nowotwór. Rozrost nowotworowy składa się przecież z co najmniej kilku klonów komórek o różnym stopniu uszkodzenia, a co za tym idzie o różnym profilu ekspresji. Dodatkowo komórki nowotworowe nie mają charakteru hodowli zsynchronizowanej, a wiadomo, że ekspresja wielu genów ulega zmianom w zależności od fazy cyklu komórkowego. Ponadto w obrębie guza poza komórkami nowotworowymi znajdują się limfocyty oraz fibroblasty. Tak więc otrzymany wynik jest zawsze wyrazem pewnego uśrednienia. Dlatego coraz częściej do analizy wykorzystuje się komórki nowotworowe wyodrębnione z guza za pomocą mikrodysektora.

Interpretacja tak ogromnej ilości danych, które jednorazowo otrzymuje się z mikromacierzy opiera się na komputerowej analizie przeprowadzonej za pomocą wysublimowanych programów statystycznych. W znacznym stopniu wynik takiej analizy zależy od doboru programu interpretacyjnego. **Mimo tych man-**

kamentów w oparciu o mikromacierze podejmowane są nie tylko próby wyodrębnienia nowych markerów, ale również stworzenia nowej molekularnej klasyfikacji nowotworów (24, 25).

Czy zatem możemy się spodziewać rewolucji w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu choroby, a co za tym idzie odwrócenia się od klasycznej patologii i klasycznych czynników rokowniczych? Raczej nie, a przynajmniej nie przez najbliższe kilkanaście lat. Na razie mikromacierze dostarczają ogromnej ilości danych, które musimy nauczyć się w odpowiedni sposób interpretować.

Metody wykorzystujące techniki PCR stwarzają ogromne możliwości dla wczesnej diagnostyki. Wykorzystując je, należy jednak pamiętać, że są one technikami nadczuły. Z faktu, że wykryje się pojedynczą komórkę o zmienionym genomie nie wynika, że stanie się ona załącznikiem zmiany nowotworowej. Wykrycie zmiany nie musi oznaczać czynnej choroby nowotworowej. Konieczne jest zatem wypracowanie pewnych standardów postępowania. W wysokorozwiniętych krajach zachodnich, w których diagnostyka molekularna jest już stosowana rutynowo (przynajmniej w niektórych typach nowotworów), nadczułość technik PCR stała się powodem kondensacji badań molekularnych w wyspecjalizowanych jednostkach. Tylko takie jednostki są w stanie zapewnić pełną standaryzację oznaczeń. Jednocześnie opracowano wspólne międzynarodowe programy badawcze grupujące wiele ośrodków. Pozwala to na porównywanie otrzymywanych wyników i dalszą standaryzację metod wykorzystujących różne techniki reakcji łańcuchowej polimerazy.

PODSUMOWANIE

Diagnostyka molekularna chorób nowotworowych coraz częściej staje się niezbędnym elementem procesu diagnostycznego. Coraz większa dostępność metod wielkoskalowych pozwoli na poprawę znajomości mechanizmów nowotworzenia. Jeszcze przez długie lata będą prowadzone prace nad poszukiwaniem odpowiednich markerów. Miejmy nadzieję, że będą one w sposób precyzyjny wiązać określoną jednostkę chorobową (określony typ nowotworu) z badaną zmianą, ułatwiać prognozę i wskazywać wybór najskuteczniejszej terapii. Zapewne jednak nie będzie pojedynczego testu zdolnego do wykrycia wszystkich typów nowotworów. Każdy rodzaj nowotworu ma bowiem swój własny „podpis molekularny”, a więc będzie wymagać odrębnego opracowania. Wydaje się jednak, że w chorobach nowotworowych w XXI wieku diagnostyka molekularna będzie częścią rutynowego badania lekarskiego.

PIŚMIENNICTWO

1. Siedlecki JA, Limon J: Choroby nowotworowe. [W:] Bala J (red.): Biologia molekularna w medycynie. PWN, Warszawa 2007; 336-397.
2. Benson JR, Song-Seng Liou: Cancer Genetics: A primer for surgeons. *Surg Clin N Am* 2008; 88: 681-704.
3. Fabisiwicz A, Siedlecki JA: Diagnostyka molekularna chorób nowotworowych. [W:] Na pograniczu chemii i biologii 2006. Wyd. Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu XIV: 133-152.
4. Sharom FJ: ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance.. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 105-127.

5. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York & London, 2008.
6. Strachan T, Read AP: *Human molecular genetics*. Bios Scientific Publishers 1999; wyd. 2.
7. Flores-Obando RE, Gollin SM, Ragin CC: Polymorphisms in DNA damage response genes and head and neck cancer risk. *Biomarkers* 2010; 15: 379-99.
8. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F et al.: Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *B J Cancer* 2007; 96: 1166-69.
9. Jen J, Kim H, Piantadosi S et al.: Allelic loss of Chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 213-221.
10. Steels E, Peasmans M, Berghmans T et al.: Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Eur Respir J* 2001; 18: 705-719.
11. Inoue A, Hasan Z, Hemmi H et al.: Competitive PCR for the quantification of N-MYC gene copy number in neuroblastoma. *Tumor Biology* 1996; 17: 262-270.
12. Bujko M, Kober P, Matyja E et al.: Prognostic Value of IDH1 Mutations Identified with PCR-RFLP Assay in Glioblastoma Patients. *Mol Diagn Ther* 2010; 14: 163-9.
13. Sahiu AA: Biological and clinical significance of HER2/NEU (c ERB B2) in breast cancer. *Adv Anat Pathol* 2000; 7: 158-166.
14. Kulik J, Nowecki ZI, Rutkowski P et al.: Detection of circulating melanoma cells in peripheral blood by two marker RT-PCR assay. *Melanoma Res* 2001; 11: 65-73.
15. Szenajch J, Jasiński B, Synowiec A et al.: Prognostic value of multiple RT-PCR tyrosinase testing for circulating neoplastic cells in malignant melanoma. *Clinical Chemistry* 2003; 49: 1450-1457.
16. Rutkowski P, Nowecki ZI, Kulik J et al.: Molecular staging by multimer reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of lymphatic drainage and blood from melanoma patients after lymph node dissection. *Melanoma Res* 2008; 18: 246-52.
17. Nilsson G, Skytting B, Xie Y et al.: The SYT-SSX1 variant of synovial sarcoma is associated with a high rate of tumor cell proliferation and poor clinical outcome 1999; 59: 3180-3184.
18. Yang K, Lui WO, Xie Y et al.: Co-existence of SYT-SSX1 and SYT-SSX2 fusions in synovial sarcomas. *Oncogene* 2002; 21: 4181-4190.
19. Paszkiewicz-Kozik E, Kulik J, Fabisiewicz A et al.: Presence of t(14;18) positive cells in blood and bone marrow does not predict outcome in follicular lymphoma. *Med Oncol* 2008; 26: 16-21.
20. Tysarowski A, Fabisiewicz A, Paszkiewicz-Kozik E et al.: Usefulness of real-time PCR in long-term follow-up of follicular lymphoma patients. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 135-42.
21. Ruka W, Rutkowski P, Szawłowski A et al.: Surgical resection of residual disease in initially inoperable imatinib-resistant/intolerant gastrointestinal stromal tumor treated with sunitinib. *Eur J Surg Oncol* 2008; 35: 87-91.
22. Rutkowski P, Symonides M, Zdzienicki M, Siedlecki JA: Developments in targeted therapy of advanced gastrointestinal stromal tumors. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2008; 3: 88-99.
23. Penzel R, Sers C, Chen Y et al.: *Virchows Arch*. E-pub 2010 Nov. 06.
24. Tysarowski A, Fabisiewicz A, Kolasa I et al.: Walidacja wybranych technik molekularnych oznaczania mutacji w kodonie 12 i 13 genu K-RAS przeprowadzona w pięciu ośrodkach badawczo-naukowych Polski. *Okol Prakt Klin* 2008; 4: 232-244.
25. Manolio TA: Genomewide association studies and assessment of risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 166-176.
26. Ferro GW, Guttmacher AE and Collins FS: Genomic medicine – an updated primer. *N Engl J Med* 2010; 363: 2001-2011.

otrzymano/received: 21.12.2010
 zaakceptowano/accepted: 10.01.2011

Adres/address:
 *Janusz A. Siedlecki
 Zakład Biologii Molekularnej,
 Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
 ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa
 e-mail: jas@coi.waw.pl