

Zastosowanie mikromacierzy DNA w leczeniu raka piersi

Jankowski M.*, Krause A., Zegarski W.

Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej Collegium Medicum im.L.Rydygiera Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,

* Jankowski Michał, e-mail: michaljankowski@post.pl
Centrum Onkologii w Bydgoszczy,
85-796 Bydgoszcz, ul. Romanowskiej 2

Streszczenie:

W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu nowych metod, dokonał się ogromny postęp w badaniach nad ludzkim DNA. Zastosowanie mikromacierzy DNA (microarray DNA) otworzyło nowe możliwości dla poznania biologii nowotworów i daje nadzieje na udoskonalenie metod leczenia. Dla chorych z rakiem piersi jest to szansa na uzyskanie nowych czynników predykcyjnych w prognozowania przebiegu choroby i bardziej precyzyjne planowanie leczenia adjuwantowego.

Słowa kluczowe: mikromacierze DNA, rak piersi

Biologia każdej komórki żywego organizmu jest determinowana wpływem własnego DNA. Poznanie ekspresji genów nie jest możliwe bez poznania ich budowy oraz wcześniejszego ich oznaczenia, a do tego niezbędne jest posiadanie łatwego, taniego i szybkiego testu. Takim narzędziem stały się w ostatnich latach tzw. mikromacierze DNA (microarray DNA).

Technika mikromacierzy została opracowana w połowie lat 90-tych, przez Browna i współpracowników [1] i od tamtej pory jest ona stale rozwijana.

Technika ta polega na fluoroscencyjnym znakowaniu testowego DNA, pobranego z badanej tkanki, a następnie hybrydyzacji (czyli łączeniu) z wzorcowym DNA, umieszczonym w zagłębieniach kilkucentymetrowych płytek. Wzorcowe DNA zawiera znane sekwencje w postaci jednoniciowego DNA lub łańcucha oligonukleotydów tak dobrane, aby opisywały ten region, gdzie spodziewana jest mutacja. Efekt hybrydyzacji jest widzialny w mikroskopie, przy wykorzystaniu techniki laserowej, a odczytanie danych jest możliwe dzięki wykorzystaniu skomplikowanego oprogramowania [2]. Na jednej płytce można ocenić ekspresję 5-30 tys. genów, a rozwój metody powoduje, że liczba ta rośnie.

Ostatnio została rozpowszechniona nazwa chip DNA – dla macierzy DNA produkowanych przez firmę Affimetrix, wykorzystujących łańcuchy o długości 20-25 nukleotydów, w których do identyfikacji hybrydyzacji wykorzystuje się efekt fotolitografii.

Komórki nowotworowe wykazują się odmiennym metabolizmem, w porównaniu do zdrowych komórek organizmu. Dzięki możliwości wykorzystania mikromacierzy można obecnie badać nie tylko mutację genów w komórkach nowotworowych, ale także ich ekspresję. Wykorzystuje się w tym celu mRNA, wyizolowany ze świeżego materiału tkankowego. Jednoniciowy łańcuch RNA przepisuje się w procesie odwrotnej transkrypcji na DNA w obecności znaczników, a następnie poszukuje się miejsc hybrydyzacji na macierzach DNA. Uzyskuje się w ten sposób informację o ekspresji genów na poziomie RNA, co pozwala śledzić procesy metaboliczne w komórce nowotworowej.

Wyniki badania mikromacierzy na płytce są przedstawione w postaci zielonych i czerwonych pasków.

Szczególnym zadaniem jest statystyczne opracowanie wyników. Wyróżnia się tutaj dwa rodzaje metod: nadzorowane i nienadzorowane. Metody nadzorowane zostały tak nazwane z powodu braku nadrzędnego czynnika, który pozwalałby na początkowy dobór danych. Są one opisem zależności pomiędzy wynikami uzyskanymi w badaniu. Zaletami tych metod jest możliwość wykrycia nowych relacji pomiędzy zbiorami wyników lub genów. Metody nadzorowane wykorzystują do kontroli niezależne, nadrzędne czynniki, będące obrazem ekspresji genów. Mogą nimi być dane kliniczne takie jak: wielkość guza, stopień zaawansowania, odpowiedź na chemioterapię. Metody te pozwalają tym samym na ilościową ocenę własnych wyników. Dla onkologów mogą być przydatne w celu poszukiwania genów, będących markerami prognostycznymi nowotworów. Należy jednak pamiętać, że metody nadzorowane mogą zawieść w przypadku kontroli z innymi, niezależnymi grupami prób i z tego powodu niezbędne jest potwierdzanie wyników drogą licznych, krzyżowych prób z innymi danymi testowymi.

U chorych z miejscowo zaawansowanym rakiem piersi, dzięki leczeniu hormonalnemu i/lub chemioterapii, ryzyko wystąpienia przerzutów odległych jest obniżone w przybliżeniu o 30%. Z drugiej strony, 70-80% chorych otrzymujących to leczenie, prawdopodobnie przeżyłoby i bez niego (3,4,5). Wynika z tego, że część chorych z miejscowo zaawansowanym rakiem piersi, otrzymujących leczenie adjuwantowe wg dotychczasowych wskazań, nie odnosi z tego powodu korzyści, a jest narażona na działanie efektów ubocznych (5).

Analizując cDNA z komórek raka piersi, na podstawie ekspresji genów, Perou wyodrębnił 2 podtypy: podstawny i luminalny (6). Później w tym podziale uwzględniono jeszcze 3 podgrupy w obrębie podtypu luminalnego (A,B i C) oraz grupę chorych z nadekspresją genu ERBB2 i grupę o cechach nowotworu podobnych do normalnego gruczołu. Chorzy z tych grup, z miejscowo zaawansowanym rakiem piersi, różnią się przebiegiem choroby. Największy odsetek przeżyć całkowitych i przeżyć bez wznowy zaobserwowano u chorych z podtypem luminalnym A i C, najgorsze u chorych z nadekspresją genu c-erbB2 i podtypem podstawnym (7). Porównując wyniki badań mikromacierzy DNA z badaniami immunohistochemicznymi, opisano lepsze wyniki u chorych z ekspresją receptora estrogenowego, co ma znaczenie przy wyodrębnieniu grupy o lepszym rokowaniu (7,8).

Źródłem materiału może być biopsja otwarta, cienkoigłowa lub tkanki uzyskane w trakcie zabiegu chirurgicznym. Daje to szerokie możliwości zastosowania metody w postępowaniu diagnostycznym i leczniczym. Obecnie potwierdzenie skuteczności znajdują próby wykorzystania metody w prognozowaniu przebiegu raka piersi poprzez biopsję aspiracyjną, przed leczeniem onkologicznym (9).

Dotychczas stosowane w powszechnej praktyce parametry takie jak: wiek chorych, wielkość guza, stan węzłów chłonnych, rodzaj i stopień zróżnicowania nowotworu, czy obecność receptorów mają ograniczone możliwości predykcyjne. Wprowadzenie oznaczania ekspresji genów metodą mikromacierzy stwarza nadzieję na znalezienia nowego czynnika prognostycznego dla chorych z rakiem piersi oraz na wyodrębnienie grup chorych, dla których możliwe będzie opracowanie odpowiedniego modelu leczenia adjuwantowego (10).

Piśmiennictwo

1. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70;
2. Charlie C, Xiang, Yidong Chen. cDNA microarray technology and its applications *Biotechnology Advances* 2000;18:35-46;
3. Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer an overview of the randomized trials. *Lancet* 1998;352:930-42;
4. Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer an overview of the randomized trials. *Lancet* 1998;351:1451-67;
5. Isaacs C, Stearns V, Hayes DF. New prognostic factors for breast cancer recurrence. *Semin Oncol*

- 2001;28:53-67;
6. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52;
 7. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74;
 8. Carey LA, Perou CM, Dressler LG, Livasy CA, Geradts J, Cowan D, Tse C.-K, Millikan RC. Race and the poor prognosis basal breast tumor (BBT) phenotype in the populaton – based Carolina Breast Cancer Study (CBCS). *J Clin Onc* 2004 ASCO Vol.22 No 14S (July 15 Supplement), 2004:9510;
 9. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clarck E, Hess K, Stivers D, Damokosh A, Sneige N, Buchholz TA., Esteva FJ, Arun B, Cristofanili M, Booser D, Rosales M, Valero V, Adams C, Hortobagyi GN, Symmans WF. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003 Jul;9:2406-15;
 10. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A Gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;25:1999-2009;