

Populacja ludzi dotknięta rakiem jelita grubego to mieszkańcy państw wysoko uprzemysłowionych. Rocznie stwierdza się 875 tys. nowych przypadków tej choroby, a umiera 570 tys. osób. Ogromna większość chorych to przypadki sporadyczne. Jednak obecnie znane są zespoły genetyczne, związane z występowaniem raka jelita grubego. Leczenie tej trudnej jednostki chorobowej jest związane z chemioterapią adjuwantową oraz paliatywną. Od wielu lat podstawowymi lekami stosowanymi w leczeniu raka jelita grubego są 5-fluorouracyl i leukoworyna. Cały czas istnieje więc ogromna potrzeba poszukiwania nowych cytostatyków. Badania molekularne pozwalają określić rolę wybranych genów odpowiedzialnych za powstawanie i progresję tego raka. W procesach badania biologii raka jelita grubego, diagnostyki oraz powstawaniu nowych leków, mikrosiatki DNA mogą odgrywać bardzo ważną rolę. Technika molekularna z zastosowaniem mikrosiatek DNA pozwala na wielkoskalową analizę genów w jednym eksperymencie, a mianowicie jednorazowo mogą być badane tysiące lub dziesiątki tysięcy genów. Proces produkcji płytek używanych do analizy genetycznej mikrosiatkami DNA jest w pełni zautomatyzowany, tak jak i sama procedura badawcza. Takie wielkoskalowe badanie genetyczne jest w stanie określić grupy genów, które mogą się stać korzystnymi lub negatywnymi czynnikami prognostycznymi bądź predykcyjnymi. Poznanie odpowiednich genów od strony ich funkcji w powstawaniu i progresji raka jelita grubego, ale oczywiście nie tylko tego nowotworu, może mieć istotny wpływ także na leczenie. Identyfikacja poszczególnych genów odgrywających istotną rolę w progresji raka pozwoli na konstruowanie celowanego leczenia. Takie możliwości już istnieją – dzięki zastosowaniu chemii kombinatorycznej można w krótkim czasie syntezować tysiące związków chemicznych, które potencjalnie mogą się stać lekami.

Słowa kluczowe: profil genowy, mikrosiatki DNA, rak jelita grubego.

Rak jelita grubego w świetle współczesnych badań molekularnych

Molecular biology of colorectal cancer

Gabriel Wcisło, Jolanta Szenajch, Lubomir Bodnar, Agnieszka Synowiec, Katarzyna Szarlej-Wcisło, Agata Cieślak, Jan Korniluk

Klinika Onkologii, CSK MON, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

Wprowadzenie

Rak jelita grubego jest jednostką chorobową dotyczącą głównie mieszkańców krajów uprzemysłowionych. Nowotwór ten charakteryzuje się agresywnym przebiegiem – ogniska przerzutowe pojawiają się w wątrobie u ok. 50 proc. chorych [1]. Nieleczony rak jelita grubego jest bardzo groźny, a chorzy przeżywają od 4 do 21 mies., a 5 lat nie przeżywa nikt [2].

Każda komórka zawiera ok. 3 mld par zasad DNA, które kodują ok. 30 tys. genów odpowiedzialnych za powstanie struktur komórki oraz jej czynności [3]. Geny te kodują RNA, a następnie białka odpowiedzialne z kolei za odpowiedni fenotyp komórkowy. Natomiast fenotyp nowotworowy komórki pojawia się w następstwie nieprawidłowej ekspresji określonych genów. Transformacja nowotworowa jest procesem, który wymaga *sześciu diabelskich mocy* (tab. 1) [4].

Obecnie postulowane są 4 teorie powstawania nowotworu złośliwego [4]: 1) teoria standardowa, 2) zmodyfikowana teoria standardowa, 3) teoria wczesnej niestabilności, 4) paneuploidia. Krótka charakterystyka każdej z teorii została przedstawiona w tab. 2.

Przedstawione teorie wskazują na złożoność powstawania nowotworu złośliwego. W wyniku przeprowadzonych badań podstawowych na modelach doświadczalnych Vogelstein i Kinzler przedstawili sekwencje powstawania raka jelita grubego [5]. Rak jelita grubego powstaje w wyniku sekwencji zjawisk molekularnych odpowiedzialnych za transformację prawidłowego nabłonka przez hiperplazję, dysplazję do powstania ogniska raka jelita grubego. Obecnie, w wyniku badań epidemiologicznych wiadomo, że ok. 15 proc. raków jelita grubego powstaje na bazie zespołów genetycznych. Badania genetyczne ostatnich 15 lat wskazały na dwa zespoły genetycznego występowania raka jelita grubego: 1) rodzinna polipowatość (FAP – *familial adenomatous polyposis*) oraz 2) wrodzony niepolipowaty rak jelita grubego (HNPCC – *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*). Dokładna charakterystyka molekularna wskazuje na dwa niezależne mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie tych jednostek chorobowych. Nadal istnieje wielka potrzeba pogłębiania badań molekularnych nad mechanizmami powstawania sporadycznych raków jelita grubego.

Tabela 1. *Sześć diabelskich mocy* [4]

Table 1. *Six devil's forces*

1. Wzrost przy braku sygnałów inicjujących rozmnażanie
2. Wzrost mimo zakazu
3. Wyłączenie mechanizmów samozniszczenia
4. Umiejętność stymulowania rozwoju naczyń krwionośnych
5. Nieśmiertelność
6. Zdolność tworzenia przerzutów i atakowania innych tkanek

A human population affected by colorectal cancer embraces residents of the West or others but with their style of life accepted. The global morbidity and mortality represent 875 K new cases and 570 K deaths per annum, respectively. Colorectal cancer therapy is divided into two main parts, i.e. adjuvant chemotherapy and palliative counterpart. For ages the treatment of colorectal cancer has been based upon 5-fluorouracil and leucovorin. Therefore, there is a great need for new drugs to be used effectively in fighting the malignancy. Molecular investigations have shown the particular genes to have influence on development and progression of colorectal cancer, and the huge part of the cases is sporadic. Although, there have been known genetic syndromes in which colorectal cancer is a well-defined part each of them. Identification of genes that have a crucial impact on carcinogenesis, and progression of cancer would be of a great clinical interest. DNA microarray is a molecular technology which has a seminal role on studying biology of human cancers, better molecular level diagnostics, and creativity of novel drugs. This technology offers analysis of thousands of genes or oligonucleotides at the same time during one experiment. Glass slides with printed sequences are made automatically, and are available commercially, as well. The whole processing is also highly automated. High-throughput genetic analysis can detect genes that would be of clinical interest as prognostic or predictive factors. Such factors would be the same considered as a good target to new drugs which could be synthesized according to rules of combinatorial chemistry. The latter technology offers thousands of chemicals to appear within days with potential usage as new targeted drugs.

Key words: gene profile, DNA microarray, colorectal cancer.

Tabela 2. Teorie powstawania nowotworu złośliwego
Table 2. Theory of cancerogenesis

Teoria	Charakterystyka
1. Teoria standardowa	1. Kancerogeny zmieniają sekwencję DNA. 2. Mutacja genów supresorowych. 3. Mutacje onkogenów prowadzą do ich aktywacji. 4. Wzrost liczby zmutowanych komórek. 5. Inwazja i powstawanie przerzutów.
2. Zmodyfikowana teoria standardowa	1. Kancerogen uszkadza wiele genów, w tym geny naprawy DNA. 2. Nieusunięte zmutowane geny powielają się. 3. Mutacje genów supresorowych i aktywacja onkogenów. 4. Inwazja i powstawanie przerzutów.
3. Teoria wczesnej niestabilności	1. Kancerogen uszkadza kilka genów odpowiedzialnych za podział komórek. 2. Komórki potomne otrzymują niewłaściwą liczbę chromosomów. 3. Mutacje genów supresorowych i aktywacja onkogenów. 4. Inwazja i powstawanie przerzutów.
4. Paneuploidia	1. Błąd w podziale komórkowym prowadzi do powstania komórek aneuploidalnych. 2. Uszkodzone chromosomy zmieniają proporcje występowania tysięcy genów (brak naprawy DNA). 3. Aneuploidalne komórki umierają, ale część przeżywa i daje początek nowotworowi. 4. W wyniku ewolucji klonalnej dochodzi do inwazji tkanek sąsiednich oraz powstawania przerzutów.

Współczesna technologia molekularna może przyjść z pomocą dzięki badaniu profilu genowego (wielkoskalowe badanie tysięcy genów lub oligonukleotydów, przeprowadzane podczas jednego eksperymentu). Określenie wybranych genów odpowiedzialnych, których zmiana ekspresji może mieć istotne znaczenie we wskazaniu na nowe czynniki prognostyczne i predykcyjne. Dalsze badania nad tymi wybranymi genami pozwoli ustalić ich faktyczną rolę w patofizjologii raka jelita grubego, a w efekcie wskazać nowe cele, wobec których będą konstruowane leki [6].

Technologia mikrosiatek DNA

Technika mikrosiatek DNA została opisana po raz pierwszy przez Drmanac i wsp. [7, 8]. Autorzy tych doniesień zastosowali metodę hybrydyzacji cDNA (komplementarnego DNA) na wielką skalę, z zastosowaniem sond molekularnych dla poszczególnych genów. Ta technika badania ekspresji genów częściowo wynikała z potrzeb *Human Genome Project*. Mianowicie, podczas badania genomu ludzkiego pojawiła się potrzeba katalogowania, mapowania i sekwencjonowania wszystkich genów oraz określania ich ekspresji w poszczególnych populacjach komórek. W jednym z pierwszych doniesień odkrywczy tej metody badawczej zastosowali mikrosiatki zawierające 31 tys. klonów cDNA, które uzyskano po amplifikacji metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), a następnie automatycznie naniesiono na błonę nylonową z wykorzystaniem manipulatora sterowanego komputerem. Ta technika badań molekularnych została unowocześniona poprzez naniesienie cząsteczek cDNA (jedna cząsteczka zajmuje powierzchnię ok. 250 mikronów) na szkiełko podstawowe pokryte poli-L-lizyną, a następnie poddanie ich denaturacji [9]. Nowa metoda konstruowania chipów genowych przedstawiona przez firmę Affymetrix polega na zastosowaniu chipów silikonowych, dzięki którym można pomieścić ponad 400 tys. oligonukleotydów na powierzchni 1,6 cm² szklanego szkiełka podstawowego.

Technika molekularna z wykorzystaniem mikrosiatek DNA jest oparta na hybrydyzacji mRNA lub cDNA (bardziej stabilna kopia) lub oligonukleotydów odpowiadających określonym genom. Każda próbka badanego mRNA (ok. 100 mcg) jest przepisywana na cDNA za pomocą RT-PCR z użyciem UTP wyznakowanego odpowiednio cyjaniną-5 (Cy5-cDNA-materiał badany) lub

Tabela 3. Zasada działania mikrosiatek DNA**Table 3.** The principle of gene expression analysis by DNA microarray technology

Materiał komórkowy	Izolowany kwas nukleinowy	Synteza	Znakowanie	Hybrydyzacja
komórki kontrolne	mRNA	cDNA z wykorzystaniem rewertyazy	Cy3-cDNA (cyjanina 3 – zielona)	dwóch puli cDNA kontrolnego i nowotworowego na mikrosiatce cDNA
komórki nowotworowe	mRNA	cDNA z wykorzystaniem rewertyazy	Cy5-cDNA (cyjanina 5 – czerwona)	dwóch puli cDNA kontrolnego i nowotworowego na mikrosiatce cDNA

cyjaniną-3 (Cy3-cDNA-materiał kontrolny). Następnie przeprowadzana jest hybrydyzacja z mikrosiatką DNA obu połączonych puli cDNA. Końcowym etapem tej procedury jest odczytanie sygnału fluorescencyjnego w skanerze laserowym. Tab. 3. przedstawia procedurę badania z mikrosiatką DNA [10]. Teoretycznie nadekspresję określonego genu stwierdza się, gdy więcej cDNA/RNA pochodzącego z badanego guza nowotworowego hybrydyzuje z chipem mikrosiatki DNA. Fluorescencja poszczególnych genów jest określana względnie wobec ekspresji danego genu w próbce kontrolnej.

Mikrosiatki DNA mogą zawierać jednoniciowe oligonukleotydy, zawierające 20–75 nukleotydów (mikrosiatki oligonukleotydowe) lub dłuższe odcinki jednoniciowego DNA zawierające od 500 do 2 000 zasad uzyskanych metodą PCR sekwencji danego genu (mikrosiatki cDNA) [11].

Płytki z naniesionymi sekwencjami nukleotydowymi otrzymuje się automatycznie. Robot nanoszący odpowiednie sekwencje cDNA metodą drukowania strumieniowego (*ink-jet printing*), czyli bezpośrednie nanoszenie fosfamidowych pochodnych nukleotydów na płytkę szklaną, pozwala przygotować 100 płytek w ciągu 12 godz. Każda z tych płytek zawiera ok. 10 tys. cząsteczek DNA [12]. Wybrane adresy internetowe dotyczące zagadnień związanych z technologią mikrosiatek DNA zostały przedstawione w tab. 4.

Wielkoskalowe badanie genomu ludzkiego, szczególnie w odniesieniu do nowotworów złośliwych, jest obiecującym kierunkiem badań nad tymi groźnymi chorobami. Badanie genomu może być przeprowadzane kilkoma metodami: 1) sekwencjonowanie i analiza heterodupleksów są przydatne w wykrywaniu mutacji, 2) porównawcza hybrydyzacja genomowa pozwala na wykrycie aberracji chromosomowych, 3) mikrosiatki DNA lub oligonukleotydowe oraz technika SAGE (*serial analysis of gene expression*) pozwalają na określenie profilu genowego, a 4) testy badające metylację pozwalają na wykrycie braku transkrypcji poprzez metylację (wyłączenie funkcjonalne) promotora [13].

Dane z badania mikrosiatek DNA muszą być poddane odpowiedniej analizie. Uzyskane informacje, zapisane w formie elektronicznej, i tysiące danych o określonych sekwencjach, opracowuje się statystycznie. Podstawową techniką uzyskania znamienych informacji genetycznych jest RDA (*representational difference analysis* – reprezentatywna analiza różnicowa). Technika ta ma pozwolić na wykazanie różnic w ekspresji określonych genów pomiędzy komórkami [14]. Pierwszym problemem istotnym w technice mikrosiatek DNA jest normalizacja badanego cDNA. Obecnie znane są metody rozwiązania tego problemu. Główna zasada polega na normalizacji linearnej uzyskanych fluorescencji pod-

Tabela 4. Wybrane adresy internetowe dotyczące technologii mikrosiatek DNA**Table 4.** Picked websites on DNA microarray technology

1. www.affymetrix.com
2. www.genomesystem.com
3. www.clontech.com
4. www.geneticmicro.com
5. www.genscan.com
6. www.vysis.com

stawowych w dwóch kanałach (badanym cDNA pochodzi z guza nowotworowego oraz kontrolnym), która powinna być taka sama. Jednak taki zabieg jest niemożliwy do przeprowadzenia i wtedy pozostaje przeprowadzenie normalizacji nieliniowej. Przykładami tej ostatniej są iteracyjna regresja lokalna (porównywanie fluorescencji pomiędzy poszczególnymi genami i znalezienie najniższych wartości fluorescencji – *software LOCFIT*) oraz selekcja modelowa oparta na uogólnionej walidacji krzyżowej (porównywanie fluorescencji pomiędzy kanałami) [15].

W wyniku odczytania danych zawartych w mikrositakach DNA konieczna jest analiza grupująca ekspresje badanych genów. Ekspresja w obrębie genomu obejmuje ogromną liczbę danych. Grupowanie obrazów ekspresji poszczególnych genów odbywa się z zastosowaniem metryk podobieństwa genowego, z uwzględnieniem współczynnika korelacji. Grupowanie hierarchiczne polega na grupowaniu (porządkowaniu funkcjonalnym) macierzy korelacji. W ten sposób powstaje algorytm, który pozwala na stworzenie dendrogramu (wykresu drzewkowego metodą Eisena) uwzględniającego wszystkie elementy poddane analizie [16]. Niestety, tworzenie dendrogramu metodą Eisena nie pozwala uniknąć grupowania nakładającego się, dlatego szukano innych technik matematycznych, pozwalających wykryć nakładające się grupy analizowanych genów. Taką techniką jest grupowanie rozmyte średniej k. Algorytm średniej k pozwala określić geny o maksymalnej ekspresji w poszczególnych grupach. Natomiast grupowanie rozmytej średniej k dotyczy nakładających się ekspresji badanych genów [17]. Kolejną techniką grupowania jest tworzenie samoorganizujących się map SOM (*self-organizing maps*). Jest to matematyczna technika grupowania cech klasyfikujących wśród wielowymiarowych danych dotyczących tysięcy genów [18].

W chwili wykorzystania techniki mikrosiatek DNA do celów diagnostycznych, czyli wskazania grup genów odpowiedzialnych za powstawanie określonego nowotworu, istotnym

będzie stworzenie metody selekcji takich genów. Niektóre istotne geny mogą być *ukryte* w analizowanym materiale genetycznym, dlatego trzeba je znaleźć. Taką możliwość oferuje iteracyjny algorytm opierający się na zasadzie entropii. Celem tej techniki statystycznej jest wyłowienie istotnych genów w morzu nakładających się informacji genetycznych [19]. Analiza genetyczna z zastosowaniem mikrosiatek DNA może przyczynić się do funkcjonalnej diagnostyki genetycznej również w sytuacjach klinicznych, gdy guz nowotworowy jest zbudowany z małych okrągłych komórek niebieskich (dotyczy to szczególnie nowotworów dziecięcych). Analiza genetyczna materiału uzyskanego z takich nowotworów jest bardzo trudna i próbuje się stosować sieci neuronalne jako informatyczne narzędzie oceny profilowania genetycznego [20, 21].

SAGE (*serial analysis of gene expression*) jest molekularną techniką badawczą, która umożliwia określenie ekspresji tysięcy genów jednocześnie. Podstawowa różnica pomiędzy mikrosiatkami DNA a techniką SAGE polega na tym, że w przypadku tej pierwszej techniki konieczna jest znajomość sekwencji transkryptów genowych. Natomiast SAGE jest narzędziem analizy genetycznej, które może być stosowane bez dokładnej znajomości sekwencji genetycznych. Technika molekularna SAGE opiera się na dwóch podstawowych zasadach: 1) krótkie nukleotydy (10–11 par zasad), zwane także SAGE tag (wyznakowane SAGE) są wystarczającym narzędziem do identyfikacji transkryptów. Wyliczenia matematyczne wskazują, że na podstawie tej metody można zidentyfikować 80–100 tys. transkryptów pochodzących z 35 tys. genów; 2) połączone ze sobą wyznakowane sekwencje pozwalają przeprowadzić seryjną analizę transkryptów, co znacząco zwiększa skuteczność tej analizy genetycznej. Klonowanie odpowiednich połączonych ze sobą SAGE do właściwych wektorów jest bardzo dobrym źródłem materiału genetycznego do sekwencjonowania.

Tworzenie biblioteki SAGE wymaga kilku etapów enzymatycznych. Podwójna nić cDNA powstaje na podstawie mRNA pozyskanego z materiału badanego. Te cząsteczki cDNA są immobilizowane na magnetycznych kulkach pokrytych streptawidyną. Następnie to cDNA jest trawione enzymem restrykcyjnym (najczęściej NlaIII), tak, aby powstały równe fragmenty DNA, najczęściej składające się z 256 par zasad. Koniec 3 prim DNA jest łączony z linkerem, sekwencją zawierającą miejsce trawienia innym enzymem restrykcyjnym typu IIS (BsmI), do którego także może wiązać się starter konieczny do przeprowadzenia reakcji PCR. Powielone fragmenty DNA poddane trawieniu NlaIII są łączone, co następnie może być poddane analizie sekwencyjnej [22, 23].

Pozyskiwanie wybranych fragmentów tkankowych lub pojedynczych komórek jest obecnie możliwe do przeprowadzenia z wykorzystaniem dwóch technik patologicznych: LMM (*laser microbeam microdissection* – mikrowycięcie wiązką laserową) lub LCM (*laser capture microdissection* – mikrowycięcie wiązką laserową z pojmieniem wybranego materiału). Pierwsza technika polega na klasycznym wycięciu wybranego pola z materiału histopatologicznego za pomocą lasera UV w wyniku fotoablacji sąsiednich tkanek. Na-

tomiasz technika LCM polega na pozyskaniu materiału z próbki histopatologicznej z wykorzystaniem lasera oraz termoplastycznej błony etylenowo-winylowej. Ta błona jest poddawana działaniu pulsami lasera, w wyniku czego staje się plastyczna. Do tak przygotowanej błony przylegają komórki lub wybrany fragment tkankowy, który został laserowo wycięty z próbki histopatologicznej. Następnie pozyskane komórki (nawet jedna komórka) mogą być poddane następnej obróbce. Materiał pozyskany tą metodą może być wykorzystany do analizy DNA (np. badanie utraty heterogenności, czyli LOH), analizy genetycznej z wykorzystaniem mikrosiatek cDNA. W przypadku pozyskania pojedynczej komórki można poszczególne rodzaje analiz przeprowadzić na materiale pochodzącym z tej jednej komórki [24–26].

Od dawna wiadomo, że komórki wchodzące w skład guza nowotworowego nie są jednorodną grupą. Pierwszym czynnikiem rozróżniającym w przypadku raka piersi była ekspresja receptora estrogenowego. Obecnie, dysponując technikami molekularnymi można określać heterogenność nowotworów złośliwych na poziomie pojedynczych komórek. Klein i wsp. [27] wykazali heterogenność w obrębie komórek nowotworowych rezydujących w szpiku kostnym jako choroba resztkowa. Badanie przeprowadzono na grupie 474 chorych na nowotwory złośliwe przewodu pokarmowego, raka piersi i gruczołu krokowego. Komórki nowotworowe identyfikowano za pomocą przeciwciał skierowanych wobec cytokeratynie 8, 18 i 19. Technika genomowej hybrydyzacji porównawczej autorzy wykazali, że na poziomie pojedynczych komórek rakowych istnieje bardzo duża różnorodność genetyczna.

Dokładniejsza analiza komórek raka jelita grubego ze szpiku lub z krwi obwodowej wskazuje na korelacje pomiędzy obecnością tych komórek a stopniem zaawansowania i rozprzestrzenienia się tej choroby nowotworowej. Dodatkowo wykazano korelację pomiędzy obecnością tych komórek a stężeniem markera Ca19-9. Obecne komórki raka jelita grubego w szpiku kostnym stwierdzono u 36 proc. chorych z I stopniem zaawansowania raka jelita grubego, u 64 proc. – w II stopniu, u 67 proc. – w III stopniu oraz u 86 proc. chorych w zaawansowanym stadium tej choroby [28, 29].

Diagnostyka molekularna oparta na biologii ludzkiego raka jelita grubego

Rozpoznanie raka jelita grubego, jak i innych nowotworów, opiera się na potwierdzeniu histopatologicznym danej jednostki chorobowej. Zdarza się jednak, że postawienie takiego rozpoznania nie jest procesem łatwym do przeprowadzenia. Wiele czynników ma wpływ na taki stan. Największy problem stanowi biologia określonego raka, dlatego tak ważne jest zbieranie danych z zakresu nowotworów ludzkich. Kolejnym problemem jest rozpoznawanie nowotworów we wczesnym stadium zaawansowania. Pierwszą próbę postawienia rozpoznania raka jelita grubego na podstawie nieinwazyjnej diagnostyki molekularnej przeprowadził Sidransky i wsp. [30]. Badanie miało charakter pilotażowy i obejmowało tylko 9 chorych. W stolcu chorych szukano mutacji w kodonie 12 lub 13 onkogenu ras. U 8 chorych stwierdzono taką mutację.

Wczesne rozpoznanie raka jelita grubego jest bardzo trudnym wyzwaniem z powodu braku istotnych objawów. Technika poszukiwania raka jelita grubego poprzez znalezienie krwi utajonej w stolcu jest akceptowanym postępowaniem. Do tego celu wykorzystuje się test Hemocult II. Zgromadzone dane dotyczące badań DNA pochodzącego ze śluzówki jelita grubego wskazują czułość 62–91 proc. w przypadku raka jelita oraz 27–82 proc. w przypadku zaawansowanych gruczolaków. Imperiale i wsp. [31] przeprowadzili badanie kliniczne porównujące przydatność testów molekularnych dotyczących DNA oraz testu Hemocult II. Do badania zrekrutowano 5 486 osób, a oceniono 4 404. Badanie molekularne DNA obejmowało wykazanie mutacji w genie k-ras, genie APC oraz p53. Dodatkowo określano niestabilność mikrosatelitarną z zastosowaniem markera BAT-26.

Metodą molekularną stwierdzono 16 inwazyjnych raków jelita grubego spośród 31 chorych wybranych z grupy 4 404 osób biorących udział w badaniu. Natomiast test Hemocult II wykrył 4 przypadki raka jelita grubego spośród 31 chorych. Ta różnica była istotnie statystyczna (51,6 proc. vs 12,9 proc., $p=0,003$). Dokładniejsza analiza patologii w obrębie śluzówki jelita wykazała wykrycie 29 chorych na raka jelita grubego i gruczolaka spośród 71 o wysokim stopniu dysplazji metodą molekularną, a test Hemocult II wykazał te patologie u 10 osób spośród 71. Ta różnica także była istotna statystycznie (40,8 proc. vs 14,1 proc., $p<0,001$).

Jedną z cech nowotworów złośliwych jest powstawanie odległych przerzutów. Nadal trwa spór, czy komórki inicjujące przerzuty odległe pojawiają się w guzie pierwotnym w miarę rozwoju choroby, czy też są od samego początku. Badania molekularne z użyciem mikrosiatek DNA mogą być bardzo pomocne. Istotnym elementem będzie stwierdzenie odpowiedniego podpisu genowego obejmującego wybrane grupy genów odpowiedzialne za powstawanie przerzutów odległych. Golub i wsp. [32] badali różne guzki przerzutowe pochodzące z raka płuca, piersi, gruczołu krokowego, jelita grubego, macicy i jajnika, pod względem ekspresji grupy genów. Takie samo badanie przeprowadzono na materiale obejmującym guzy pierwotne. Określono 128 genów stanowiących podpis genowy świadczący o skłonności do tworzenia przerzutów odległych. Chorzy z guzami pierwotnymi, które wykazują ekspresję genów z grupy podpisu genowego przerzutowania są w złej grupie rokowniczej co do długości życia i to zjawisko jest istotne statystycznie ($p<0,003$).

Przez ostatnie 8 lat prowadzono badania kliniczne, których celem jest stworzenie nowej klasyfikacji molekularnej nowotworów złośliwych. Wcześniejsze, 30-letnie doświadczenia pozwoliły identyfikować nowe klasy nowotworów, ale brak jest jednolitego narzędzia badawczego. Nadal istnieje potrzeba stworzenia takiego narzędzia, które pozwoli na wczesne zakwalifikowanie konkretnego guza nowotworowego do odpowiedniej klasy [33, 34]. Stworzenie algorytmów diagnostycznych na podstawie badań molekularnych z użyciem mikrosiatek DNA może zmienić przyszłość w diagnozowaniu i leczeniu chorych na nowotwory złośliwe.

Nowoczesna chemia kombinatoryczna umożliwia tworzenie leków w zależności od celu, wobec którego dany specyfik ma działać, stąd tak wielka potrzeba odkrywania no-

wych czynników prognostycznych i predykcyjnych. Te czynniki będą miały istotne znaczenie w rokowaniu, a dodatkowo powinny nimi być substancje biologicznie czynne, które jednocześnie będą celami dla nowych leków. Wielkoskalowe badania molekularne mogą odegrać bardzo ważną rolę na tym polu [35, 36].

Geny związane z powstawaniem przerzutów odległych

Badania epidemiologiczne wskazują, że u połowy chorych na raka jelita grubego pojawią się przerzuty odległe, dlatego badanie tego problemu z zastosowaniem mikrosiatek DNA jest tak ważne. Pierwszym miejscem, w którym pojawiają się przerzuty jest wątroba. To tam u 60 proc. chorych na raka jelita grubego lokalizują się śmiertelne przerzuty [37].

Technika molekularna pojedynczych genów był stosowana do określenia roli danego genu jako korzystnego lub niekorzystnego czynnika prognostycznego. Tullo i wsp. [38] określili rolę zmutowanego p53 w powstawaniu przerzutów raka jelita grubego do wątroby. Badanie przeprowadzono na grupie 40 chorych. Autorzy wykazali, że mutacja w obrębie genu p53 jest niekorzystnym czynnikiem usposabiającym do powstawania liczniejszych przerzutów do wątroby. 41 proc. z mutacją p53 miało więcej niż 3 ogniska przerzutowe, a 14 proc. miało taką liczbę ognisk przerzutowych z prawidłowym p53 ($p<0,05$). Także u 70 proc. chorych z mutacją p53 stwierdzono synchroniczne przerzuty do wątroby w porównaniu do 29 proc. chorych z prawidłowym p53 (0,025). Dodatkowo u chorych z mutacją p53 stwierdzono częściej nawrót raka jelita grubego w porównaniu z grupą bez mutacji (73 proc. vs 33 proc., $p<0,001$).

Wielkoskalowa analiza ekspresji genów powinna pozwolić na rozróżnienie podpisu genowego odpowiedzialnego za powstawanie przerzutów do wątroby. Saha i wsp. [39] określili globalną ekspresję genów techniką SAGE (uzyskano 95 tys. znakowanych fragmentów DNA, które odpowiadały przynajmniej 17 324 transkryptomom) z materiału pochodzącego z ognisk przerzutowych oraz z guzów pierwotnych. Wynik tego porównania wskazał gen PRL-3 jako ten, który koduje fosfatazę tyrozynową i jest odpowiedzialny za powstawanie przerzutów odległych. Wskazanie nowego genu odpowiedzialnego za powstawanie ognisk przerzutowych pozwala na dokładne pogłębienie badań. W przypadku genów kodujących enzymy odpowiedzialne za fosforylację tyrozyny wykryto liczne mutacje w ich obrębie [40].

Metody określania stopnia zaawansowania raka jelita grubego mają już długą historię. Jednak nadal istnieje potrzeba stworzenia precyzyjnego narzędzia, które pozwoli dokładniej określić rokowanie u chorych. Takim narzędziem są mikrosiatki DNA. Eschrich i wsp. [41] postawili hipotezę, że odpowiedni profil genowy określony metodą mikrosiatek DNA powinien lepiej scharakteryzować chorych z dobrym i złym rokowaniem co do przeżycia. Badacze wykorzystali 32 tys. sekwencji cDNA do przeanalizowania 78 próbek raka jelita grubego. W tym doniesieniu określono grupę 43 genów, które precyzyjniej niż system klasyfikacji Dukesa wskazały odpowiednie grupy chorych z lepszym i gorszym rokowaniem (93 proc. czułość, 84 proc. specyficzność, $p=0,03878$).

Chemioterapia raka jelita grubego z uwzględnieniem wyników badań genetycznych z użyciem mikrosiatek DNA

We współczesnej onkologii od kilku lat obserwuje się stale wzrastającą liczbę nowych preparatów przeciwnowotworowych. Jednym z czynników takiego stanu rzeczy należy szukać w rozwoju technik molekularnych, które umożliwiają określanie nowych i istotnych zjawisk odpowiedzialnych za powstawanie i progresję guzów nowotworowych. Takim narzędziem, które przyczynia się do pozyskiwania tych ważnych informacji, są mikrosiatki DNA. Na początku lat 90. XX w. w NCI (*National Cancer Institute*) przetestowano ok. 60 tys. substancji chemicznych wobec panelu 60 linii komórkowych raków ludzkich. Po zastosowaniu tych substancji badano zależności oddziaływania tych środków z komórkami nowotworowymi i ustalano mechanizmy działania tych potencjalnych leków. Ważnym elementem takiego postępowania jest określenie tzw. *clusterd correlation* – CluCor (korelacja grupowana). Ten algorytm postępowania umożliwia prześledzenie wielu ważnych biologicznych szlaków i ich zmian po zastosowaniu określonych substancji chemicznych [42, 43].

Ważnym czynnikiem przydatnym przy kwalifikacji chorych do leczenia chemicznego jest ustalenie mikrosatelitarnej niestabilności. Mikrosatelity to fragmenty DNA, zawierające krótkie sekwencje, najczęściej od 1 do 5 nukleotydów, które powtarzają się kilka razy. Typowym przykładem powtórzeń jednonukleotydowych jest 13 cząsteczek adeniny (A)₁₃. Natomiast najczęściej spotykaną sekwencją dwunukleotydową jest cytozyna i adenina (CA)_n. Mikrosatelitarna niestabilność to zjawisko molekularne, w którym obserwuje się zwiększenie lub zmniejszenie liczby mikrosatelitów. To zjawisko może być zauważone, jeżeli odpowiednio duża liczba komórek ma podobną zmianę porządku mikrosatelit. Nieprawidłowości dotyczące mikrosatelit często mają związek z nieprawidłowo funkcjonującym systemem naprawy genów (*mismatch-repair genes*, np. MSH2, MLH1). To zjawisko po raz pierwszy odkryto w przebiegu wrodzonego raka jelita grubego niepolipowatego (zespół Lynch). W przebiegu raka jelita grubego niestabilności mikrosatelitarne występują u ok. 15 proc. przypadków. Częściej, bo w 85 proc. przypadków, obserwuje się niestabilności chromosomalne. To zjawisko przejawia się w występowaniu utraty określonych alleli, amplifikacji chromosomów lub ich fragmentów i translokacjach [44–46].

Tak ważne zjawisko molekularne, jakim jest niestabilność mikrosatelitarna, może mieć istotne znaczenie w skuteczności chemioterapii. Ribic i wsp. [47] przedstawili analizę, której celem było pokazanie skuteczności chemioterapii adjuwantowej z zastosowaniem 5FU w zależności od niestabilności mikrosatelitarnej. W badaniu przeanalizowano 570 próbek raka jelita grubego. W 95 przypadkach (16,7 proc.) stwierdzono niestabilność mikrosatelitarną występującą bardzo często. Spośród 287 chorych, którzy nie byli poddani chemioterapii, a mieli stwierdzoną niestabilność mikrosatelitarną, większy odsetek chorych przeżyło 5 lat w porównaniu do chorych z mikrosatelitarną stabilnością lub niestabilnością o niskiej częstości występowania ($p=0,004$). Natomiast wśród chorych leczonych chemicznie mikrosatelitarna niestabilność nie korelowała z wydłużeniem życia po tej formie

terapii, ale korzyści z chemioterapii zaobserwowano u chorych ze stabilnością mikrosatelitarną ($p=0,01$).

Leczenie systemowe chorych na raka jelita grubego jest prowadzone z zastosowaniem 5FU, leukoworyny, kamptotecyny, oksaliplatyny, cisplatyny, które mogą być stosowane w trybie adjuwantowym lub jako postępowanie paliatywne. Po leczeniu każdym z wymienionych leków istnieje wysokie prawdopodobieństwo pojawienia się klonów komórkowych wykazujących oporność na stosowane leczenie. W takiej sytuacji mikrosiatki DNA także mogą okazać się pomocne w przeprowadzeniu charakterystyki genetycznej komórek raka jelita grubego poddanych działaniu odpowiednich leków.

Skuteczność chemioterapii może być mierzona za pomocą wykładników genetycznych. Mariadson i wsp. [48] określili grupę genów pozwalających przewidzieć skuteczność za pomocą 5FU i irinotekanu. W przypadku tego pierwszego leku określono 50 genów, które najlepiej korelowały z pojawieniem się apoptozy. Natomiast w przypadku irinotekanu badacze określili 149 genów, które korelowały z apoptozą indukowaną przez ten lek. Innym istotnym genem odpowiedzialnym za hydrolizę irinotekanu jest gen CES2, który koduje karboksylesterazę [49]. Chemiowrażliwość ognisk przerzutowych raka jelita grubego zlokalizowanych w wątrobie jest związana z *indeksem odpowiedzi*. Ten indeks obejmuje 3 geny: TNFRSF1B, SLC35F5 oraz OPRT. Geny te zostały wybrane spośród puli 81 genów, które były związane z enzymami metabolizującymi 5FU. Spośród 11 chorych z dobrym indeksem odpowiedzi poddanych leczeniu 5FU metodą HAI (*hepatic arterial infusion* – wlewy przez tętnicę wątrobową) u 9 stwierdzono odpowiedź na zastosowane leczenie [50].

Tak jak podjęto próbę określenia korzystnego dla chorego podpisu genowego, który jest dobrym czynnikiem predykcyjnym, to ta sama technika badawcza może pomóc w określeniu genów odpowiedzialnych za pojawienie się oporności. Porównawcze badania pomiędzy liniami komórkowymi ludzkiego raka jelita grubego wrażliwymi na 5FU i opornymi umożliwiły określenie genów (33) związanych z opornością pojawiającą się po stosowaniu 5FU. We wczesnej fazie pojawiania się tej oporności zaobserwowano zmiany w obrębie genów odpowiedzialnych za syntezę białek cytoszkieletu [51].

Dokładne badania doświadczalne nad rakiem jelita grubego wskazują na dwóch bardzo ważnych kandydatów genetycznych odpowiedzialnych za oporność na 5FU. Tymi genami jest p53 oraz TYMS (*thymidylate synthase*). Utrata prawidłowego p53 oraz amplifikacja TYMS zlokalizowanego na chromosomie 18p11.32 były odpowiedzialne za rozwój oporności na 5FU [52, 53]. Jednak oferowana metoda badawcza ma swoje ograniczenia. Ograniczona liczba markerów predykcyjnych nie we wszystkich badaniach została jednoznacznie potwierdzona. Taka sytuacja występuje w przypadku syntazy tymidylanowej (TYMS). Z drugiej strony pojedyncze markery nie są w stanie wskazać alternatywnego sposobu leczenia, dlatego tak ważnym jest zaadaptowanie mikrosiatek DNA do praktyki klinicznej.

Podobne badania podjęto po zastosowaniu pochodnych platyny (cisplatyny i oksaliplatyny) [54, 55]. W obu bada-

niach określano grupy genów odpowiedzialne za indukcję apoptozy. Wśród tych genów znalazło się wiele znanych z wcześniejszych badań (GAD 67, p19, cyklina D1, ATM etc). Dodatkowe badania dotyczące mechanizmów powstawania oporności na pochodne platyny będą bardzo istotne w budowaniu odpowiedniej strategii koniecznej do dalszej kontroli raka jelita grubego po wyczerpaniu możliwości leczenia lekami standardowymi. Wszystkie te badania dążą do uzyskania najlepszej kontroli nad rakiem jelita grubego w różnych fazach jego zaawansowania.

Zakończenie

W przedstawionym artykule omówiliśmy wzrastającą rolę wielkoskalowych badań genetycznych z zastosowaniem mikrosiatek DNA w odniesieniu do raka jelita grubego z uwzględnieniem technicznych aspektów tej techniki molekularnej. Jednak jest to tylko jedna z nowoczesnych technik molekularnych, które będą się rozwijać w XXI w. Nadal jeszcze jest daleka droga do stworzenia standardów diagnostycznych z zastosowaniem mikrosiatek DNA. To samo dotyczy ich wykorzystania w monitorowaniu leczenia zaawansowanej choroby nowotworowej. Należy pamiętać, że pojawiają się następne techniki badawcze, takie jak wykorzystanie interferencyjnego RNA oraz rozwijająca się proteomika, czyli wielkoskalowe badania białek.

Cząsteczki RNA są bardzo poważnym narzędziem służącym do wyłaczania genów. Informacyjne (*messenger*) RNA jest odpowiedzialne za ekspresję genu i powstawanie białka. Natomiast krótkie odcinki podwójnego RNA, w wyniku interferencji (dlatego RNAi) z określoną sekwencją są w stanie wyłączyć tę odpowiednią sekwencję. Obecnie wiadomo, że zjawisko RNAi jest związane z 4 klasami cząsteczek RNA: 1) siRNA (*short interfering RNA* – są to cząsteczki o podwójnej nici i długości 21–11 nukleotydów, które mają aktywność katalityczną i wycinają odpowiednie fragmenty mRNA); 2) miRNA (*microRNA* – krótkie 19-25 nukleotydów, jednoniciowe cząsteczki, które blokują syntezę białek); 3) tncRNA (*tiny non-coding RNA* – drobne cząsteczki, ewolucyjnie konserwatywne i nie jest znana ich funkcja); 4) smRNA (*small modulatory RNA* – odkryte w 2005 r. dwuniciowe cząsteczki, które umożliwiają ekspresję specyficznych genów tylko w neuronach dojrzałych myszy) [56].

Proteomika to dziedzina obejmująca wielkoskalową analizę białek, prowadzoną w podobny sposób jak w przypadku mikrosiatek DNA, nie na płytce, a na żelach, co bardzo utrudnia stworzenie gotowych zestawów do analizy. Technika spektrometrii masowej także mogłaby pozwolić na określenie sekwencji izolowanych białek czy peptydów, jest jednak bardzo droga. Mimo to można ją nazwać techniką jutra [57, 58].

Piśmiennictwo

1. Steele G, Ravikumar TS. Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. Biologic perspective. *Ann Surg* 1989; 210: 127-38.
2. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg* 1990; 77: 1241-6.
3. Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, et al. A gene map of the human genome. *Science* 1996; 274: 540-6.
4. Gibbs WW. Poszukiwanie korzeni raka. *Świat Nauki* 2003; sierpień: 24-33.
5. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70.
6. Alekshun T, Barrett C. Targeted therapies in the treatment of colorectal cancers. *Cancer Control* 2005; 12: 105-10.
7. Drmanac S, Drmanac R. Processing of cDNA and genomic kilobase-size clones for massive screening, mapping and sequencing by hybridization. *Biotechniques* 1994; 17: 328-9, 332-6.
8. Drmanac S, Stavropoulos NA, Labat I, Vonau J, Hauser B, Soares MB, Drmanac R. Gene-representing cDNA clusters defined by hybridization of 57,419 clones from infant brain libraries with short oligonucleotide probes. *Genomics* 1996; 37: 29-40.
9. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
10. Khan J, Saal LH, Bittner ML, Chen Y, Trent JM, Meltzer PS. Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis* 1999; 20: 223-9.
11. Ramsay G. DNA chips: state-of-the art. *Nature Biotech* 1998; 16: 40-4.
12. Graves DJ, Su HJ, McKenzie SE, Surrey S, Fortina P. System for preparing microhybridization arrays on glass slides. *Anal Chem* 1998; 70: 5085-92.
13. Weber BL. Cancer genomics. *Cancer Cell* 2002; 1: 37-47.
14. Welford SM, Gregg J, Chen E, Garrison D, Sorensen PH, Denny CT, Nelson SF. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3059-65.
15. Futschlik M, Crompton T. Model selection and efficiency testing for normalization of cDNA microarray data. *Genome Biol* 2004; 5: R60.
16. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14863-8.
17. Gasch AP, Eisen MB. Exploring the conditional coregulation of yeast gene expression through fuzzy k-means clustering. *Genome Biology* 2002; 3: 59.1-59.22.
18. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2907-12.
19. Liu X, Krishan A, Mondry A. An entropy-based gene selection method for cancer classification using microarray data. *BMC Bioinformatics* 2005; 6: 76.
20. Kahn J, Wi JS, Ringer M, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001; 7: 673-9.
21. Liu B, Cui Q, Jiang T, Ma S. A combinatorial feature selection and ensemble neural network method for classification of gene expression data. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: 136.
22. Polyak K, Riggins GJ. Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2948-58.
23. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270: 484-7.
24. Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 2000; 53: 666-72.
25. Rubin M. Understanding disease cell by cell. *Science* 2002; 296: 1329-30.
26. Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997; 278: 1481-93.
27. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002; 360: 683-9.
28. Weihrauch MR, Skibowski E, Koslowsky TC, et al. Immunomagnetic enrichment and detection of micrometastases in colorectal cancer: correlation with established clinical parameters. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4338-43.
29. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sreter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4080-5.

30. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256: 102-5.
31. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME; Colorectal Cancer Study Group. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; 351: 2704-14.
32. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003; 33: 49-54.
33. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-7.
34. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15149-54.
35. Liu ET. Mechanism-derived gene expression signatures and predictive biomarkers in clinical oncology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3531-2.
36. Krajewska M, Kim H, Kim C, et al. Analysis of apoptosis protein expression in early-stage colorectal cancer suggests opportunities for new prognostic biomarkers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5451-61.
37. Tzimas GN, Chevet E, Jenna S, et al. Abnormal expression and processing of the proprotein convertases PC1 and PC2 in human colorectal liver metastases. *BMC Cancer* 2005; 5: 149.
38. Tullo A, D'Erchia AM, Honda K, Mitry RR, Kelly MD, Habib NA, Saccone C, Sbisa E. Characterization of p53 mutations in colorectal liver metastases and correlation with clinical parameters. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3523-8.
39. Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 2001; 294: 1343-6.
40. Wang Z, Shen D, Parsons DW, et al. Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* 2004; 304: 1164-6.
41. Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3526-35.
42. Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, et al. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 1997; 275: 343-9.
43. Deboucq C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet* 1999; 21: 48-50.
44. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 69-77.
45. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systemic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-18.
46. De la Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med* 2003; 349: 209-10.
47. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-57.
48. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, et al. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res* 2003; 63: 8791-812.
49. Sanghani SP, Quinney SK, Fredenburg TB, et al. Carboxylesterases expressed in human colon tumor tissue and their role in CPT-11 hydrolysis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4983-91.
50. Matsuyama R, Togo S, Shimizu D, et al. Predicting 5-fluorouracil chemosensitivity of liver metastases from colorectal cancer using primary tumor specimens: Three-gene expression model predicts clinical response. *Int J Cancer* 2006; in press.
51. Schmidt WM, Kalipciyan M, Dornstaeder E, et al. Dissecting progressive stages of 5-fluorouracil resistance in vitro using RNA expression profiling. *Int J Cancer* 2004; 112: 200-12.
52. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104: 263-9.
53. Wang TL, Diaz LA Jr, Romans K, et al. Digital karyotyping identifies thymidylate synthase amplification as a mechanism of resistance to 5-fluorouracil in metastatic colorectal cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3089-94.
54. Huerta S, Harris DM, Jazirehi A, Bonavida B, Elashoff D, Livingston EH, Heber D. Gene expression profile of metastatic colon cancer cells resistant to cisplatin-induced apoptosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 663-70.
55. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2004; 91: 1931-46.
56. Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. *Nature* 2004; 430: 161-4.
57. Mann M – Quantitative proteomics? *Nature Biotechnol* 1999; 17: 954-958
58. Abbott A. Betting on tomorrow's chips. *Nature* 2002; 415: 112-14.

Adres do korespondencji

dr med. **Gabriel Wcisto**
Klinika Onkologii
CSK MON
Wojskowy Instytut Medyczny
ul. Szaserów 128
00-909 Warszawa
e-mail: Gabriel.9318030@pharmanet.com.pl