

Diagnostyka nowotworów coraz bardziej przesuwana w kierunku wykrywania choroby resztkowej, czyli niedostępnej wykryciu i badaniu za pomocą klasycznych metod. Wprowadzenie techniki RT-PCR pozwoliło wykrywać pojedyncze komórki nowotworowe w badanej próbce krwi lub tkanki i obniżyć poziom wykrywalności do ok. 10^3 w całej objętości krwi obwodowej. Jednakże uwolnienie aż 1 tys. komórek do krwi dla wielu nowotworów może być zjawiskiem bardzo rzadkim i do jego oceny potrzebne są czulsze metody. Sprawa ta stała się szczególnie kontrowersyjna w przypadku czerniaka złośliwego, gdzie wyniki badań molekularnych wydawały się nie korelować z zaawansowaniem choroby. Nasze wcześniejsze badania posłużyły do weryfikacji hipotezy, że dzieje się tak, dlatego że liczba krążących we krwi komórek czerniaka znajduje się i zmienia w miarę progresji choroby, stale pozostając znacznie poniżej dolnej granicy wykrywalności. W chorobie niezaawansowanej przeciętnie jedno na pięć badań jest dodatnie (ok. 200 krążących komórek), a w zaawansowanej średnio jedno na trzy badania jest dodatnie (ok. 333 krążących komórek). Zostało to stwierdzone dzięki wielokrotnemu powtarzaniu testów u każdego pacjenta oraz zastosowania odpowiednich analiz statystycznych. W ten sposób powstała najczulsza obecnie dostępna metoda badania choroby resztkowej, pozwalająca wykrywać nawet mniej niż 100 krążących we krwi komórek nowotworowych, którą autorzy nazwali MR-RT-PCR. Dla dalszej jej weryfikacji powinno się ją obecnie spróbować wykorzystać w innych schorzeniach nowotworowych, takich jak przewlekła białaczka szpikowa, chłoniak płaszczka czy rak prostaty. Powinno to zaowocować technologią wykrywania bardzo rzadkich komórek, występujących rzadziej niż w pojedynczej próbce badanego materiału, a także dostarczyć nowych informacji na temat biologii wielu nowotworów.

Słowa kluczowe: krążące komórki nowotworowe, wielokrotnie powtarzana reakcja RT-PCR, czerniak.

Wielokrotnie powtarzana reakcja PCR wsparta reakcją odwrotnej transkrypcji (MR-RT-PCR)

jako nowa metoda wykrywania nowotworowej choroby resztkowej w czerniaku złośliwym oraz potencjalnie w innych nowotworach

Multiplied repeated reverse transcriptase PCR (MR-RT-PCR) as a new method to diagnose residual neoplastic disease in malignant melanoma and potentially in other tumors

Wiesław Wiktor Jędrzejczak¹, Jolanta Szenajch²

¹Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Warszawie; ²Laboratorium Onkologii Molekularnej, Klinika Onkologii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie

WSTĘP

Istotną rolę w postępowaniu z chorym na nowotwór odgrywa coraz lepsza diagnostyka, która przekroczyła granice wykrywalności klasycznych metod oscylujące wokół miliarda komórek nowotworowych (tab. 1.). Zasadniczą zmianę stanowiło wprowadzenie w 1984 r. przez Kary Mullisa łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) [1], pozwalającej wykryć pojedyncze kopie genu w badanym materiale, a następnie wsparcie tej metody reakcją odwrotnej transkrypcji (RT), co pozwoliło wy-

kryć pojedyncze kopie transkryptu takiego genu, a więc badać geny, które rzeczywiście ulegają ekspresji w badanych komórkach, a nie tylko takie, które w nich są. Z kolei zrozumienie, że choroby nowotworowe są nabytymi chorobami genetycznymi, a więc chorobami, które są spowodowane mutacjami określonych genów, a także są związane z wtórnie zaburzoną ekspresją wielu innych genów zwróciło uwagę na możliwość wykorzystania tych zmian genetycznych jako znaczników chorób nowotworowych, czyli ich swoistych wizerunków. To wszystko spowo-

Tab. 1. Porównanie dolnych granic wykrywalności różnych metod wykrywania komórek nowotworowych we krwi obwodowej

Table 1. The comparison of lower detection limits of various methods of detection of neoplastic cells in the peripheral blood

Liczba komórek nowotworowych w całej objętości krwi obwodowej	Dolna granica wykrywalności metody
10^9	morfologia krwi
10^8	cytometria przepływowa
10^5	PCR w czasie rzeczywistym
10^3	RT-PCR
10^2	MR-RT-PCR

Molecular diagnosis of cancer is gradually shifting towards diagnosis of minimal disease i. e. disease that avoids detection and investigation using classical methods. Introduction of RT-PCR allowed to detect individual cancer cells in tested sample of blood or tissue and to lower the limit of detection to about 10^3 in the entire blood. However, release of 1000 cells to the blood may be for many tumors an extremely rare event and such situation requires yet more sensitive methods. The problem became particularly controversial in malignant melanoma, where results of molecular investigations appeared not to correlate with the disease stage. Studies performed by our group have been used to verify a hypothesis that it was due to the fact that the number of circulating melanoma cells (CMCs) is and fluctuates in the course of the disease significantly below the lowest detection level of RT-PCR. Therefore, on average, in the early disease only one out of five samples tests positive (approximately 200 CMCs), while in the advanced disease, on average, one out of three samples tests positive (approximately 333 CMCs). These conclusions have been reached after employing multiply repeated tests in each patient and utilization of the appropriate statistical analyses. We have developed the most sensitive available method of diagnosis of residual disease in the peripheral blood that allows to detect even less than 100 CMCs. We termed this method multiply repeated RT-PCR or MR-RT-PCR. This method should be now explored in other neoplastic disorders such as chronic myelocytic leukemia, mantle cell lymphoma or prostate cancer. It should provide a technology to detect very rare cells, present in less than one evaluated sample, and allow to study novel aspects of neoplastic disorders.

Key words: circulating tumor cells, multiply repeated RT-PCR, melanoma.

dowało, że medycyna może obecnie badać występowanie choroby nowotworowej w stadium choroby minimalnej (a więc poniżej granicy wykrycia klasycznymi metodami), oraz minimalnej choroby resztkowej (a więc jej przetrwania po leczeniu w takiej liczbie komórek). Chociaż jednak pojawiły się takie możliwości, to są one ciągle bardzo dalekie od pełnego wykorzystania, a próby ich badania ujawniły także nowe, nieprzewidziane wcześniej problemy.

TESTY MOLEKULARNE W DIAGNOSTYCE CHOROÓB NOWOTWOROWYCH – STAN OBECNY

Wizytówką nowotworu może być, np. mutacja punktowa, amplifikacja, zmiana struktury lub ekspresji jakiegoś genu, charakterystyczna tylko dla komórek danego nowotworu, a często wręcz odpowiedzialna za zmianę nowotworową. Na przykład w przewlekłej białaczkę szpikowej (CML) funkcję wizytówki pełni charakterystyczny tylko dla tej choroby chromosom Filadelfia, powstały na skutek wzajemnej translokacji długich ramion chromosomów 9 i 21. Prowadzi to do fuzji genów *BCR* i *ABL* i powstania genu fuzyjnego *BCR/ABL*, którego produktowi przypisuje się spowodowanie nowotworowego zachowania komórek posiadających ten gen [2]. W przypadku większości nowotworów nie są jednakże znane znaczniki molekularne charakterystyczne tylko dla nich, pochodzące od zmienionych onkogenów lub antyonkogenów, ponieważ mutacje występujące w komórkach danego nowotworu występują również w innych nowotworach. W takiej sytuacji można wykorzystywać znaczniki swoiste tkankowo, tzn. badać ekspresję takich genów, których transkrypty są obecne w normalnych komórkach tkanki, z której wywodzi się nowotwór i także komórkach tego nowotworu. Jeżeli oznaczenie wykonuje się w innych tkankach niż macierzysta tkanka nowotworu (a w odróżnieniu od większości normalnych komórek komórki nowotworowe mogą się przemieścić w inne miejsce w organizmie), to dysponuje się wtedy znacznikiem charakterystycznym dla komórek danego nowotworu. Znacznikami tkankowo-specyficznymi są, np. tyrozynaza w czerniaku i PSA w raku prostaty. Nie są one przydatne

do badania nowotworów w miejscu naturalnego występowania komórek, z których nowotwór się wywodzi, ale mogą być wykorzystane, np. do wykrywania komórek nowotworowych we krwi, gdzie normalne komórki odpowiednich tkanek nigdy nie trafiają.

Z praktycznego punktu widzenia, tj. z punktu widzenia dostępności materiału do badania, najważniejsze wydaje się rozwijanie metod wykorzystujących krew obwodową. Materiał ten ma oczywiście również i wady. W szczególności zależność między liczbą komórek nowotworowych we krwi oraz w całym organizmie jest różna dla każdego nowotworu i prawdopodobnie bardzo zróżnicowana u różnych chorych z tym samym rodzajem nowotworu. To zastrzeżenie dotyczy jednak również wszystkich innych lokalizacji dostępnych badaniu, ale dostęp do nich jest jednorazowo trudniejszy, a powtarzanie badań jest często niemożliwe.

W 1988 r. Kawasaki i wsp. [3] po raz pierwszy zastosowali RT-PCR do wykrywania ekspresji genu fuzyjnego *BCR/ABL* w krążących komórkach nowotworowych w przewlekłej białaczkę szpikowej. W 1991 r. Smith i wsp. [4], wykorzystując do badania czerniaka znacznik tyrozynazę (test TYR), udowodnili po raz pierwszy, że również w przypadku guzów litych ich komórki mogą krążyć we krwi obwodowej. W 1992 r. ukazała się pierwsza praca Moreno i wsp. [5], poświęcona wykrywaniu krążących we krwi komórek raka prostaty przy pomocy RT-PCR dla PSA (test mPSA), oparta na podobnych założeniach i metodyce, jak praca Smith i wsp. [4] o czerniaku.

Rozpoczął się szybki rozwój tej dziedziny badań i do tej pory pojawiło się wiele prac, opartych na rozmaitych znacznikach molekularnych w różnych chorobach nowotworowych. Przykładowo są to hydroksylaza tyrozyny w neuroblastoma [6]; cytokeratyny w raku piersi [7], w raku jelita grubego [8] i raku trzustki [9]; antygen rakowo-płodowy, czyli CEA (ang. *carcinoembryonic antigen*) w raku jelita grubego [10] i raku żołądka [11]; CD44 w raku żołądka [12] i raku jelita grubego [13] oraz maspina w raku piersi [14] (zacytowano tylko pierwsze publikacje, które pojawiły się na dany temat; obecnie na każdy z tych tema-

tów istnieje kilka, kilkanaście lub nawet kilkadziesiąt pozycji).

NIEROZWIĄZANE PROBLEMY ZE STOSOWANIEM TESTÓW MOLEKULARNYCH W KLASYFIKACJI I MONITOROWANIU PRZEBIEGU CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Te wszystkie osiągnięcia mogłyby umożliwić rutynowe wykorzystanie metod molekularnych przede wszystkim do monitorowania leczenia wybranych chorób nowotworowych. Obecnie, monitorując molekularnie leczenie chorób nowotworowych używa się terminów PCR-dodatni i PCR-ujemny, które oznaczają, że u chorego badaniem RT-PCR wykryto lub nie krążące we krwi komórki nowotworowe. Badanie z reguły wykonuje się w ten sposób, że pobiera się od chorego 5–10 ml krwi, preparuje RNA, przepisuje na cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy i następnie poddaje podwójnej reakcji PCR (najpierw z parą starterów zewnętrznych, a potem wewnętrznych), co pozwala wykryć nawet pojedynczą komórkę zawierającą poszukiwany transkrypt w badanym materiale. Następnie chory PCR-ujemny jest z reguły traktowany jako osoba zdrowa, a chory PCR-dodatni jest poddawany dalszej analizie i ewentualnie leczeniu.

Tymczasem wynik określający, że ktoś jest PCR-ujemny oznacza tylko, że chory ma mniej niż 1 komórkę w badanej próbce, np. 5 ml krwi, a to oznacza, że ma mniejszą liczbę poszukiwanych komórek we krwi niż objętość krwi całkowitej podzielona przez objętość krwi badanej. Przykładowo, dla wspomnianej próbki o objętości 5 ml będzie to mniej niż 1 000 (objętość krwi, czyli ok. 5 000 ml dzielone przez objętość próbki, czyli 5 ml, równa się 1 000). Tysiąc komórek to ciągle dość duża liczba, a jeżeli się weźmie pod uwagę, że jest to tylko niewielka część komórek obecnych w miejscu, w którym ulegają one podziałom i z którego są uwalniane do krwi, oznacza to, że potrzebne są możliwości zwiększenia tej czułości. Taka potrzeba jest istotna nie tylko do zwiększenia możliwości monitorowania leczenia chorób nowotworowych, ale także do wykonania badań podstawowych określających, jak czę-

sto komórki nowotworowe wydostają się z ognisk pierwotnych i wtórnych do krwi, oraz w jakich ilościach krążą we krwi. Jest to o tyle istotne, że u chorych z większością guzów litych komórki nowotworowe są niewykrywalne we krwi obecnie stosowanymi metodami lub metody te dają nie do końca zrozumiałe wyniki.

Zagadnienie to zostanie omówione na przykładzie badań czerniaka testem TYR i badań raka prostaty testem mPSA, ponieważ na te tematy ukazało się do tej pory najwięcej prac. Test TYR charakteryzuje się bardzo dobrą specyficznością, tzn. jedynie sporadycznie daje wyniki dodatnie we krwi osób, które nie są chore na czerniaka. Według metaanalizy 23 prac dotyczących testu TYR, wykonanej przez Tsao i wsp. [15], tylko 2 spośród 521 kontroli negatywnych dały wynik dodatni (0,4 proc.). PSA nie jest tak ściśle swoisty tkankowo dla prostaty i raka prostaty – jego ekspresja zachodzi również w innych tkankach. Według metaanalizy 28 prac dotyczących testu mPSA, wykonanej przez Su i wsp. [16], 61 spośród 1 231 kontroli negatywnych dały wynik dodatni (5 proc.).

Jednakże okazało się, że występują duże rozbieżności w wynikach wykrywania krążących komórek nowotworowych (CTCs) w różnych stadiach choroby. Po pierwsze, generalnie wszystkie zespoły badawcze z większą częstością wykrywają CTCs w bardziej zaawansowanych stadiach, lecz podawane częstości wykrywania dramatycznie różnią się zarówno w stadiach zlokalizowanych, jak i rozsianych. Wynoszą one w stadiach zlokalizowanych od zera do 76 proc. w raku prostaty [17] i dla porównania od zera do ponad 30 proc. w czerniaku [15, 18]; a w stadiach rozsianych – od 13 do 100 proc. w raku prostaty [16] i dla porównania od zera do 100 proc. w czerniaku [15, 18].

Po drugie, w stosunku do obu testów (tj. testu TYR i testu mPSA) pojawia się zarzut zbyt niskiej czułości diagnostycznej – pojawia się pytanie: dlaczego dość często zdarza się, że w ewidentnie rozsianej chorobie CTCs nie są wykrywane [19, 20]?

Po trzecie, sprzeczne są również wyniki prac różnych zespołów, dotyczące wartości prognostycznej testów TYR i mPSA. W badaniach dotyczących czerniaka kilkanaście grup badaczy ob-

serwowało znacząco skrócony czas przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od nawrotu choroby u osób z dodatnim wynikiem testu TYR, lecz parę innych zespołów badawczych nie potwierdziło tej korelacji [15, 21]. W badaniach dotyczących raka prostaty też nie ma zgodności co do gorszego rokowania dla pacjentów dodatnich w teście mPSA [20, 22]. Pewien pogląd na panujący między różnymi laboratoriami rozrzut wyników dają tab. 2. i 3.

Zatem w miarę zwiększania liczby publikacji i po ukazaniu się paru przeglądowych artykułów zaczęło wydawać się, że idea wykrywania za pomocą PCR krążących we krwi obwodowej komórek nowotworowych właściwie nie spełniła pokładanych w niej nadziei. Tak duże niezgodności między zespołami badawczymi w otrzymywanych wynikach i wyciąganych wnioskach deprymowały badaczy, a klinicystów wręcz zniechęcały do ewentualnego zastosowania wyników tych badań w praktyce.

METODA WIELOKROTNIE POWTARZANEJ REAKCJI RT-PCR (MR-RT-PCR) DAJE SZANSĘ ROZWIĄZANIA PROBLEMÓW

Wykonana przez nasz zespół analiza, wykorzystująca statystyczne opracowanie powtarzanych kilkakrotnie testów u 150 chorych, była próbą wyjaśnienia przyczyny tego stanu rzeczy. Zastanawiając się, jak to jest możliwe, zaproponowano i poddano ocenie statystycznej 2 teoretyczne modele [47]. Pierwszy model sprowadzał się do hipotezy, że chorzy na czerniaka dzielą się na 2 grupy: chorych, u których komórki czerniaka krążą we krwi obwodowej i chorych, u których nie krążą one we krwi obwodowej. Jeżeli ten model byłby prawdziwy, to wielokrotne badanie komórek krążących we krwi powinno doprowadzić do określenia proporcji obu grup chorych, czyli po wykryciu wszystkich chorych należących do pierwszej grupy dalsze powtarzanie badań nie powinno dostarczać nowych dodatnich wyników. Drugi model zakładał, że komórki czerniaka krążą we krwi u wszystkich chorych, ale z częstością znacznie poniżej dolnego poziomu wykrywalności metody. Jeśli ten model byłby prawdziwy, to każde kolejne powtórzenie badania powinno

Tab. 2 Rozbieżności w wynikach badań testem TYR między różnymi zespołami badawczymi
Table 2. The discrepancies of TYR test results between various published studies

Autor ^a , rok	Kontrole negatywne bez czerniaka	Pacjenci z czerniakiem (N) ^b	TYR+/N (proc. TYR+)			Korelacja TYR+ ze stadium	Wartość prognostyczna testu TYR	
			Stadium I/II (miejscowe)	Stadium III (regionalne)	Stadium IV (rozsiane)		DFS ^c	OS ^d
Mellado ²³ , 1996	0/50	91	14/39 (23 proc.)	7/17 (41 proc.)	33/35 (94 proc.)	TAK	TAK	NIE
Glaser ²⁴ , 1997	0/35	102	1/43 (2 proc.)	0/15 (0 proc.)	12/44 (27 proc.)	NIE	nb ^e	nb
Farthmann ²⁵ , 1998	0/20	123	6/46 (13 proc.)	7/41 (17 proc.)	16/36 (44 proc.)	TAK	nb	nb
Ghossein ²⁶ , 1998	0/25	73	2/16 (12 proc.)	6/40 (15 proc.)	1/17 (6 proc.)	NIE	nb	TAK/NIE ^f
Hanekom ²⁷ , 1999	0/1	165	10/143 (7 proc.)	0/10 (0 proc.)	0/12 (0 proc.)	NIE	NIE	nb
Palmieri ²⁸ , 1999	0/41	235	53/154 (34 proc.)	24/49 (49 proc.)	24/32 (75 proc.)	TAK	NIE	nb
Proebstle ²⁹ , 2000	nb	212	22/162 (14 proc.)	8/26 (31 proc.)	16/24 (67 proc.)	TAK	TAK	TAK
Gogas ³⁰ , 2002	0/16	60	16/ 21 (76 proc.)	26/39 (66 proc.)	nb	NIE	TAK	NIE
Mellado ³¹ , 2002	0/58	120	21/55 (38 proc.)	24/50 (48 proc.)	8/15 (53 proc.)	NIE	TAK	TAK
Palmieri ²¹ , 2003	nb	200	62/153 (41 proc.)	13/24 (54 proc.)	15/23 (65 proc.)	NIE	NIE	nb

Objaśnienia:
^a – podano tylko nazwisko pierwszego autora
^b – uwzględniono tylko te prace, w których zbadano co najmniej 50 pacjentów
^c – DFS – przeżycie wolne od choroby (ang. disease-free survival)
^d – OS – przeżycie całkowite (ang. overall survival)
^e – nb – nie badano
^f – TAK w stadium I/II i III; NIE w stadium IV

Tab. 3. Rozbieżności w wynikach badań testem mPSA między różnymi zespołami badawczymi
Table 3. The discrepancies of mPSA test results between various published studies

Autor ^a , rok	Kontrole negatywne bez raka prostaty	Pacjenci z rakiem prostaty (N) ^b	mPSA+/N (proc. mPSA+)		Stadium klinicznie zlokalizowane	Korelacja mPSA+ ze stadium	Stadium rozsiane
			pT1-pT2	pT3			
Sokoloff ³² , 1996	1/19 (5 proc.)	102	30/51 (59 proc.)	13/18 (72 proc.)		NIE	29/33 (88 proc.)
Corey ³³ , 1997	0/20 (0 proc.)	75	8/37 (22 proc.)	4/25 (16 proc.)		NIE	6/13 (46 proc.)
Ennis ³⁴ , 1997	nb	227			61/227 (27 proc.)	TAK	nb
Ignatoff ³⁵ , 1997	0/6 (0 proc.)	93			17/ 82 (21 proc.)	NIE	11/11 (100 proc.)
Ellis ³⁶ , 1998	1/56 (2 proc.)	196	13/75 (17 proc.)	10/46 (21 proc.)		NIE	28/75 (37 proc.)
De la Taille ³⁷ , 1999 ^c	0/65	347	50/218 (23 proc.)	51/101 (50 proc.)		TAK	24/28 (88 proc.)

Autora, rok	Kontrole negatywne bez raka prostaty	Pacjenci z rakiem prostaty (N) ^b	Wartość prognostyczna testu mPSA DFS ^d	OS ^e
Ghossein ⁴⁴ , 1997	0/41 (0 proc.)	84	nb	TAK
Hara ⁴⁵ , 2002	1/71 (1,4 proc.)	58	TAK	nb
Shariat ⁴⁶ , 2002	1/14 (7,1 proc.)	224	NIE	nb

Objaśnienia:
^a – podano tylko nazwisko pierwszego autora
^b – uwzględniono tylko te prace, w których zbadano co najmniej 50 pacjentów
^c – połączone dane, otrzymane przez grupę badaczy z Uniwersytetu Kolumbia [38–43]
^d – DFS – przeżycie wolne od choroby (ang. disease-free survival)
^e – OS – przeżycie całkowite (ang. overall survival)
^f – nb – nie badano

zwiększać liczbę chorych, u których chociaż raz uzyskano wynik dodatni i wreszcie doprowadzić do sytuacji, kiedy praktycznie wszyscy chorzy chociaż raz wykażą reakcję dodatnią.

Statystyczna analiza naszych wyników wykazała dość jednoznacznie, że prawdziwy jest drugi model, oraz że po wykonaniu ok. 10 kolejnych badań niemal wszyscy chorzy uzyskali przynajmniej jeden dodatni wynik. Okazało się więc, że komórki czerniaka krążą u chorych bezobjawowych z częstością średnio ponad 5 razy mniejszą od dolnej granicy czułości metody. To powodowało, że u tych chorych średnio 1/5 badań jest dodatnia, a u niektórych spośród tych pacjentów nawet tylko 1/10 badań była dodatnia. Natomiast u chorych z zaawansowaną chorobą liczba krążących komórek zwiększała się do poziomu ok. 3 razy mniejszego od dolnej granicy czułości metody i u tych chorych średnio co 3. test był dodatni, czyli 2/3 testów jest ujemnych. Wyjaśniło to, dlaczego u takich chorych zdarzają się wyniki ujemne. Taką metodą polegającą na wykonaniu badania RT-PCR wielu (kilku-kilkunastu) próbek krwi pobieranej od tego samego chorego nazwano kilka-kilkakrotnie powtarzanym RT-PCR, czyli po angielsku *multiply repeated* RT-PCR, w skrócie MR-RT-PCR.

Dalsze badania metodą MR-RT-PCR wykazały statystycznie istotny związek między częstością dodatnich wyników w teście TYR i stadiem choroby. Ryzyko nawrotu choroby statystycznie istotnie zwiększało się wraz ze wzrostem liczby dodatnich wyników w teście TYR u badanego pacjenta [48]. Zatem metoda MR-RT-PCR okazała się przydatna w klasyfikowaniu i przewidywaniu nawrotu choroby u pacjentów z czerniakiem [49].

Jeżeli uznamy, że jest istotne zbadanie, czy u chorego z danym nowotworem w krążeniu znajduje się jedna, kilka lub kilkadziesiąt komórek nowotworowych w całym krążeniu, to oczywiście nie można tego zrealizować, pobierając od chorego całą jego krew i badając ją, a przynajmniej nie można tego zrobić za pomocą techniki RT-PCR. Chociaż pomysł, żeby w takich sytuacjach, kiedy celem jest wykrycie komórek występujących

z taką rzadkością w całym krążeniu wykorzystywać badanie mniejszych próbek, za to wielu i pobieranych w różnych odstępach czasu (czyli pomysł na MR-RT-PCR) może nie wydawać się zbyt odkrywczy, to nie był on do tej pory przedstawiany i badany. Pojawił się dopiero w wyniku naszej analizy statystycznej pozornie niezrozumiałych wyników uzyskanych u chorych na czerniaka. W zależności od liczby powtórzeń zwiększa on czułość badania molekularnego o kilka do kilkunastu razy (tab. 1.).

PODSUMOWANIE

O ile nasze badania dotyczyły wyłącznie czerniaka, to wydaje się, że ten rodzaj analizy powinien być zastosowany także do innych schorzeń nowotworowych, a ściślej – w pierwszej kolejności powinno się zbadać, czy wyniki tej analizy można uogólnić na inne nowotwory. Tak więc celowe wydaje się podjęcie próby wykorzystania MR-RT-PCR do zbadania zjawiska krążenia komórek nowotworowych we krwi w innym nowotworze niż dotychczas badany czerniak.

Można sobie tutaj wyobrazić 2 rodzaje badań: badania podstawowe i badania diagnostyczne. Po pierwsze, MR-RT-PCR może zostać wykorzystany do poznania zjawiska dostawiania się komórek nowotworowych do krwioobiegu w wielu innych nowotworach. Do takich celów można sobie wyobrazić powtórzenie badania u jednego chorego nawet kilkadziesiąt razy, co pozwoli zidentyfikować nowotwory, w których niemal nigdy nie dochodzi do przedostawiania się komórek nowotworowych do krwi. Pozwoli także zbadać zjawisko w tych nowotworach, gdzie jest ono rzadsze niż w czerniaku. Oczywiście, sytuacja, w której dla uzyskania wiarygodnego wyniku trzeba będzie powtórzyć badanie kilkadziesiąt razy eliminuje praktycznie test z wykorzystania diagnostycznego. Jednakże w tych nowotworach, gdzie okaże się, że liczba krążących komórek nowotworowych jest większa i gdzie konieczne będzie co najwyżej kilkakrotne powtórzenie badania, tam można sobie wyobrazić zastosowanie diagnostyczne.

Odrębnym zagadnieniem jest relacja pomiędzy klasycznym RT-PCR, MR-RT-PCR i ilościowym PCR. Obecnie nie

ma bezpośrednich badań porównujących te metody. Jednakże wiadomo, że ilościowy PCR jest metodą mniej czułą niż badanie jakościowe i w naszym nie ułatwia dookreślenia chorych ujemnych w RT-PCR [50]. Z kolei, jak wyżej omówiono, MR-RT-PCR jest sposobem na zwiększenie czułości RT-PCR. Można, więc przypuszczać, że w przyszłości podstawowym badaniem molekularnym pozostanie RT-PCR. Zależnie od wyniku badania tą metodą chorzy PCR-dodatni zostaną dookreśleni ilościowym PCR, który odpowie, czy mają oni 10, 100, 1 000 itd. komórek nowotworowych w badanym materiale. Z kolei chorzy PCR-ujemni zostaną dookreśleni za pomocą MR-RT-PCR, jako tacy, którzy pozostaną ujemni w badaniu powtarzanym wielokrotnie albo jako tacy, którzy okażą się dodatni, ale poniżej progu wykrywalności RT-PCR.

Wykaz skrótów używanych w artykule

RT (ang. *reverse transcription*) – reakcja odwrotnej transkrypcji; PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy; PSA (ang. *prostate specific antigen*) – antygen specyficzny dla prostaty; CMCs (ang. *circulating melanoma cells*) – krążące komórki czerniaka; CTCs (ang. *circulating tumor cells*) – krążące komórki nowotworowe

PIŚMIENNICTWO

1. Mullis KB, Fallona F, Scharf SJ, et al. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1986; 51: 263-73.
2. Lee JA, LeMaistre A, Kantarjian H, et al. *Detection of two alternative bcr/abl mRNA junction and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction*. Blood 1989; 73: 2165-70.
3. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, et al. *Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequence amplified in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 5698-702.
4. Smith B, Selby P, Southgate J, et al. *Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction*. Lancet 1991; 38: 1227-9.

5. Moreno JG, Croce CM, Fischer R, et al. *Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer.* *Cancer Res* 1992; 52: 6110-2.
6. Naito H, Kuzumaki N, Uchino J, et al. *Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction.* *Eur J Cancer* 1991; 27: 762-5.
7. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, et al. *Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction.* *J Clin Oncol* 1994; 12: 475-82.
8. Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, et al. *Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase polymerase chain reaction.* *Br J Cancer* 1995; 71: 278-81.
9. Soeth E, Roder C, Juhl H, et al. *The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase chain reaction is related to the stage of disease.* *Int J Cancer* 1996; 69: 278-82.
10. Neumaier M, Gerhard M, Wagener C. *Diagnosis of micrometastases by amplification of tissue-specific genes.* *Gene* 1995; 159: 43-7.
11. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al. *Specific detection of carcinoembryonic antigen expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction.* *J Clin Oncol* 1994; 12: 725-9.
12. Yokozaki H, Ito R, Nakayama H, et al. *Expression of CD44 abnormal transcripts in human gastric carcinomas.* *Cancer Lett* 1994; 83: 229-34.
13. Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, et al. *CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR-based study of splice variants.* *Int J Cancer* 1995; 64: 347-54.
14. Luppi M, Morselli M, Bandieri E, et al. *Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin genes.* *Ann Oncol* 1996; 7: 619-24.
15. Tsao H, Nadiminti U, Sober AJ, et al. *A meta-analysis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA as a marker for circulating tumor cells in cutaneous melanoma.* *Arch Dermatol* 2001; 137: 325-30.
16. Su SL, Boynton AL, Holmes EH, et al. *Detection of extraprostatic prostate cells utilizing reverse transcription-polymerase chain reaction.* *Sem Surg Oncol* 2000; 18: 17-28.
17. Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. *Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors.* *Cancer* 1998; 82: 1419-42.
18. Keilholz U. *Meeting Highlight: Diagnostic PCR in melanoma, methods and quality assurance.* Epalinges, Switzerland, 26/27 January 1996. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1661-3.
19. Burchill SA, Selby PJ. *Molecular detection of low-level disease in patients with cancer.* *J Pathol* 2000; 190: 6-14.
20. Gomella LG, Raj GV, Moreno JG. *Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen in the management of prostate cancer.* *J Urol* 1997; 158: 326-37.
21. Palmieri G, Ascierto PA, Perrone F, et al. *Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction.* *J Clin Oncol* 2003; 21: 767-73.
22. Shariat SF, Gottenger E, Nguyen C, et al. *Preoperative blood reverse transcriptase-PCR assays for prostate specific antigen and human glandular kallikrein for prediction of prostate cancer progression after radical prostatectomy.* *Cancer Res* 2002; 62: 5974-9.
23. Mellado B, Colomer D, Castel T, et al. *Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: association with clinical stage and prognosis.* *J Clin Oncol* 1996; 14: 2091-7.
24. Gläser R, Rass K, Seiter S, et al. *Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two-center study.* *J Clin Oncol* 1997; 15: 2818-25.
25. Farthmann B, Eberle J, Krasagakis K, et al. *RT-PCR for tyrosinase-mRNA-positive cells in peripheral blood: evaluation strategy and correlation with known prognostic markers in 123 melanoma patients.* *J Invest Dermatol* 1998; 110: 263-7.
26. Ghossein RA, Coit D, Brennan M, et al. *Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma.* *Clin Cancer Res* 1998; 4: 419-28.
27. Hanekom GS, Stubbings HM, Johnson CA, et al. *The detection of circulating melanoma cells correlates with tumor thickness and ulceration but is not predictive of metastasis for patients with primary melanoma.* *Melanoma Res* 1999; 9: 465-73.
28. Palmieri G, Strazullo M, Ascierto PA, et al. *Polymerase chain reaction-based detection of circulating melanoma cells as an effective marker of tumor progression.* *J Clin Oncol* 1999; 17: 304-11.
29. Proebstle TM, Jiang W, Hogel J, et al. *Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors.* *Br J Cancer* 2000; 82: 118-23.
30. Gogas H, Kefala G, Bafaloukos D, et al. *Prognostic significance of the sequential detection of circulating melanoma cells by RT-PCR in high-risk melanoma patients receiving adjuvant interferon.* *Br J Cancer* 2002; 87: 181-6.
31. Mellado B, del Carmen Vela M, Colomer D, et al. *Tyrosinase mRNA in blood of patients with melanoma treated with adjuvant interferon.* *J Clin Oncol* 2002; 20: 4032-9.
32. Sokoloff MH, Tso CL, Kaboo R, et al. *Quantitative polymerase chain reaction does not improve preoperative cancer staging: a clinico-pathological molecular analysis of 121 patients.* *J Urol* 1996; 156: 1560-6.
33. Corey E, Arfman EW, Oswim MM, et al. *Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen messages.* *Urology* 1997; 50: 184-8.
34. Ennis RD, Katz AE, De Vries DM, et al. *Detection of circulating prostate carcinoma cells via an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in patients with early stage of prostate carcinoma. Independence from other pretreatment characteristics.* *Cancer* 1997; 79: 2402-8.
35. Ignatoff JM, Oefelein MG, Watkin W, et al. *Prostate-specific antigen reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in preoperative staging of prostate cancer.* *J Urol* 1997; 158: 1870-5.
36. Ellis WJ, Vessella RL, Corey E, et al. *The value of reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in preoperative staging and follow-up of patients with prostate cancer.* *J Urol* 1998; 159: 1134-8.
37. De la Taille A, Olsson CA, Katz AE. *Molecular staging of prostate cancer: dream or reality?* *Oncology* 1999; 13: 187-94.
38. Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ, et al. *Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse-transcriptase-polymerase chain reaction assay for prostate-specific antigen.* *Urology* 1994; 43: 765-75.
39. Katz AE, de Vries GM, Benson MC, et al. *The role of the reverse transcriptase-*

- polymerase chain reaction assay for prostate-specific antigen in the selection of patients for radical prostatectomy.* Urol Clin North Am 1996; 23: 541-9.
40. Olsson CA, de Vries GM, Benson MC, et al. *The use of RT-PCR for prostate-specific antigen assay to predict potential surgical failures before radical prostatectomy: Molecular staging for prostate cancer.* Br J Urol 1996; 77: 411-7.
41. Olsson CA, de Vries GM, Raffo AJ, et al. *Preoperative reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for prostate-specific antigen predicts treatment failure following radical prostatectomy.* J Urol 1996; 155: 1557-62.
42. Nejat RJ, Katz AE, Olsson CA. *The role of reverse transcriptase polymerase chain reaction for staging patients with clinically localized prostate cancer.* Semin Urol Oncol 1998; 16: 40-5.
43. Nejat RJ, Katz AE, Benson MC, et al. *Enhanced RT-PCR for PSA combined with serum PSA predict pathologic stage and outcome in 300 radical prostatectomy patients.* J Urol 1998; 159: 291A.
44. Ghossein RA, Rosai J, Scher HI, et al. *Prognostic significance of detection of prostate-specific antigen transcripts in the peripheral blood of patients with metastatic androgen-independent prostatic carcinoma.* Urology 1997; 50: 100-5.
45. Hara N, Kasahara T, Kawasaki T, et al. *Reverse transcription-polymerase chain reaction detection of prostate-specific antigen, prostate-specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in one milliliter of peripheral blood: value for staging of prostate cancer.* Clin Cancer Res 2002; 8: 1794-9.
46. Shariat SF, Gottenger E, Nguyen C, et al. *Preoperative blood reverse transcriptase-PCR assay for prostate-specific antigen and human glandular kallikrein for prediction of prostate cancer progression and radical prostatectomy.* Cancer Res 2002; 62: 5974-9.
47. Szenajch J, Jasiński B, Kozak A, et al. *Multiple RT-PCR tyrosinase testing reveals that melanoma cells circulate in the blood of melanoma patients at the frequency more than 10 times below the detection threshold (letter).* Melanoma Res 2002; 12: 399-401.
48. Szenajch J, Jasiński B, Synowiec A, et al. *Prognostic value of multiple RT-PCR tyrosinase testing for circulating neoplastic cells in malignant melanoma.* Clin Chem 2003; 49: 1450-7.
49. Wong IHN. *The sporadic nature of shedding cells in blood: multiple RNA diagnostic testing and prognostication of cancer progression (editorial).* Clin Chem 2003; 49: 1429-31.
50. Hochhaus A. *Molecular response and resistance to imatinib (Glivec®).* Hematol J 2003; 4 suppl. 3: 15-20.

ADRES DO KORESPONDENCJI

prof. dr hab. med. **Wiesław W. Jędrzejczak**
 Klinika Hematologii, Onkologii
 i Chorób Wewnętrznych AM
 SP CSK
 ul. Banacha 1a
 02-097 Warszawa
 tel./faks 0 (prefiks) 22 659 75 77
 e-mail: wiktora@amwaw.edu.pl