

Zgodnja detekcija raka s slikovnocitometrično analizo normalnih celic

Marija Us-Krašovec

ZAKAJ POTREBUJEMO DETEKCIJSKO METODO?

S pospešenim razvojem tehničnih in naravoslovnih ved smo dobili v zadnjih desetletjih preteklega stoletja vrsto visoko specializiranih diagnostičnih naprav za ugotavljanje in zamejevanje tumorjev ter nove laboratorijske metode, vključno z najbolj obetavno gensko tehnologijo, ki omogočajo natančnejšo opredelitev maligne bolezni in njene agresivnosti. Nove terapevtske naprave, novi citostatiki ter obsežne bazične in klinične raziskave so prispevali k razvoju novih operativnih in obsevalnih postopkov, novih učinkovitih kemoterapevtskih protokolov in k razvoju pomembne podporne terapije. Posledično so se rezultati zdravljenja maligne bolezni progresivno izboljševali. Maligno bolezen danes v visokem deležu ozdravimo ali pa vsaj zazdravimo. Kljub tem nedvomnim napredkom pa je v onkologiji še vedno v veljavi osnovno pravilo: maligno bolezen najuspešneje ozdravimo ob minimalnih posledicah, če jo ugotovimo še preden postane klinično zaznavna ali pa vsaj na začetku njene klinične faze.

Maligna bolezen v začetnem stadiju običajno ne povzroča simptomov, zato jo moramo iskati aktivno. Do sedaj je bila sekundarna preventiva uspešna le pri raku materničnega vratu zaradi enostavnega dostopa in brisa Pap, ki edini izpolnjuje zahteve racionalne detekcijske metode. Diagnostične preiskave za ugotavljanje maligne bolezni notranjih organov in organskih sistemov so kompleksne, zahtevne, drage in za preiskovanca obremenilne. Zato jih ne moremo uporabiti v sekundarni preventivi, temveč samo pri osebah z bolezenskimi znaki. Kljub prizadevanjem raziskovalci še niso uspeli najti metode, s katero bi na enostaven in ne predrag način v populaciji brez simptomov identificirali potencialne nosilce maligne bolezni.

IZHODIŠČA POTENCIALNE DETEKCIJSKE METODE

V začetku preteklega stoletja je bila postavljena podmena, da so pri bolnikih z malignim tumorjem prisotne spremembe tudi v jedrih normalnih celic. Te spremembe so poimenovali označevalci malignosti ali MAC (malignancy associated changes). Po mnenju nekaterih raziskovalcev naj bi nastale zaradi učinkovanja kancerogenega dejavnika na ves organizem, drugi pa menijo, da spremembe povzroči sam tumor z izločanjem različnih substanc. Slednjo domnevo podpirajo začetne *in vitro*, na celični kulturi opravljene raziskave.

Spremembe v strukturi jedrnega kromatina normalnih celic so subtilne in so v konvencionalni svetlobni mikroskopiji

tudi ob uporabi tisočkratne povečave komaj zaznavne. Kljub spodbudnim rezultatom so zato svetlobnomikroskopske raziskave v šestdesetih letih opustili. Slikovni citometer z raziskovalno kamero visoke prostorske in svetlobne ločljivosti pa odkrije te subvizualne spremembe v organizaciji in razporeditvi kromatina v jedrih normalne celice. Tako daje možnost, da predpostavko o označevalcih maligne bolezni preverimo in preizkusimo, ali je mogoče s slikovnocitometrično analizo normalnih celic odkrivati bolnike z malignim tumorjem v predkliničnem štadiju ali v začetni fazi klinične bolezni. S kvantitativno citometrično analizo so doslej ugotovili te spremembe v jedrih normalnih celic cervikalnega in bronhalnega epitelija ter epitelija dojke ob prisotnosti malignega tumorja v teh tkivih.

NAŠE ZAČETNE RAZISKAVE IN REZULTATI

Raziskave, v katerih sodelujejo Janez Eržen (Klinika za torakalno kirurgijo), Mirela Rode (Stomatološka klinika), Mario Žganec (Fakulteta za elektrotehniko), Margareta Fležar in Jaka Lavrečak (Onkološki inštitut), smo opravili na normalnih celicah bukalne sluznice bolnikov s karcinomom pljuč, bolnic s karcinomom dojke in zdravih oseb.

Pri vseh smo odvzeli bris sluznice z lesenim loparčkom. Dobljeni material smo suspendirali v blagem fiksativu, suspenzijo filtrirali in celice, sedimentirane na filtru, z odtisom nanесли na objektna stekelca. Preparate smo barvali po modificirani Feulgnovi metodi s tioninom.

Tako pripravljene preparate smo analizirali z avtomatiziranim slikovnim citometrom. Aparat povsem samostojno analizira po 50 preparatov: z robotsko roko nalaga preparate na mikroskopsko mizico, slike celičnih jeder avtomatično zajema, nato slike digitalizira in računalniško obdela.

Doslej smo zbrali in analizirali bukalno sluznico treh skupin bolnikov:

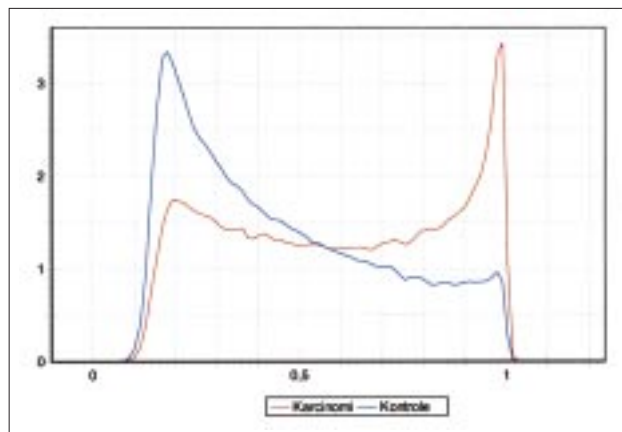
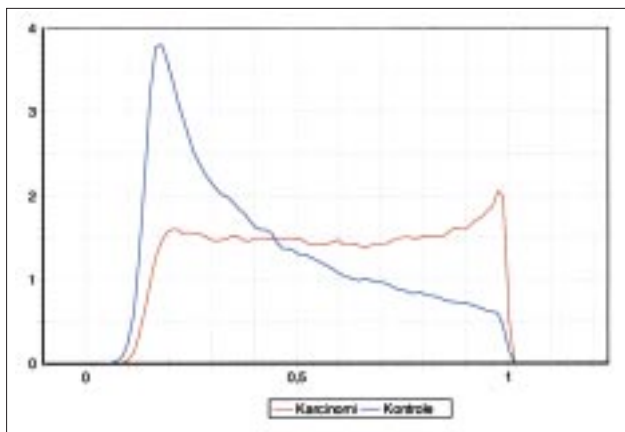
- 97 bolnikov s karcinomom pljuč, stadij I-IV;
- 122 bolnikov s karcinomom pljuč, stadij I-II;
- 103 bolnic s karcinomom dojke, stadij I-IV.

Za vsako skupino smo imeli primerjalne kontrolne brise bukalne sluznice zdravih oseb.

Ugotovili smo, da se nekatere morfometrične značilke in nekatere značilke, ki opisujejo organizacijo in razporeditev kromatina v jedru bukalne sluznice bolnikov s karcinomom pljuč in bolnic s karcinomom dojke razlikujejo od celic bukalne sluznice zdravih kontrolnih oseb.

Slika 1 prikazuje porazdelitev vrednosti značilke, ki opisuje področja z nizko vsebnostjo DNA, v jedrih celic bukalne

Zanimivo je, da je imela ista značilka – dolžinska razporeditev kromatina (avg_short_runs) diskriminacijsko



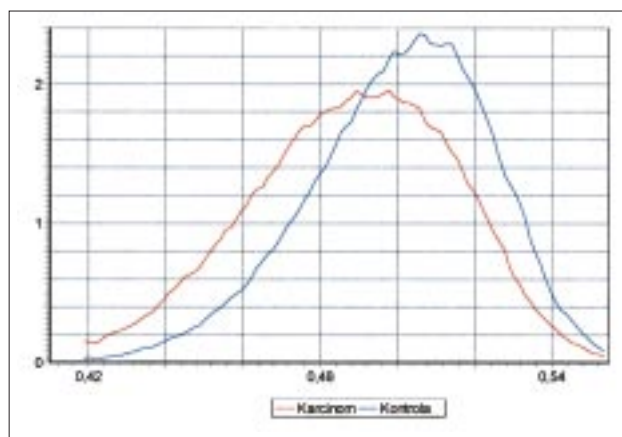
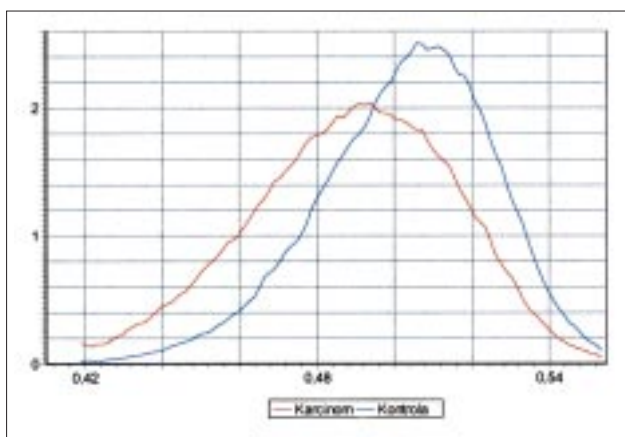
Slika 1. Porazdelitev vrednosti značilke 'lowDNAarea' v jedrih celic bukalne sluznice bolnikov s karcinomom pljuč (levo) oziroma bolnic s karcinomom dojke (desno) ter porazdelitev teh vrednosti pri zdravih osebah iz kontrolnih skupin.

sluznice bolnikov s karcinomom pljuč in bolnic s karcinomom dojke ter v jedrih celic zdravih oseb iz ustreznih kontrolnih skupin.

Na sliki 2 je prikazana druga značilka – dolžinska razporeditev kromatina – v jedrih celic bukalne sluznice

moč tudi pri bolnicah s karcinomom dojke in je v multivariatni analizi ločevala skupino bolnic od zdravih kontrolnih oseb prav tako s 85% zanesljivostjo.

Naše dosedanje slikovnocitometrične analize potrjujejo podmeno, da je v navidez zdravih celicah bolnikov z



Slika 2. Porazdelitev vrednosti značilke 'avg_short_runs' v jedrih celic bukalne sluznice bolnikov s karcinomom pljuč (levo) oziroma bolnic s karcinomom dojke (desno) ter porazdelitev teh vrednosti pri zdravih osebah iz kontrolnih skupin.

bolnikov s karcinomom pljuč in bolnic s karcinomom dojke ter pri ustreznih kontrolnih skupinah.

V multivariatni analizi je kombinacija treh značilk z 92% zanesljivostjo ločevala bolnike s karcinomom pljuč v stadiju I-IV od kontrolne skupine. V skupini bolnikov s karcinomom pljuč v kliničnem stadiju I-II pa je ena od jedrnih značilk – dolžinska razporeditev kromatina (avg_short_runs) – v multivariatni analizi v kombinaciji z dvema drugima značilkama ločevala skupino bolnih od zdravih oseb s 85% zanesljivostjo.

maligno boleznijo spremenjena struktura kromatina. Visoka diskriminacijska moč nekaterih značilk napoveduje možnost razvoja nove detekcijske metode.

■