

Molekularna patologija - zakaj jo rabimo?

Rastko Golouh

V zadnjih dveh desetletjih je postalo patologovo delo pri diagnozi tumorskih procesov v primerjavi s prejšnjim obdobjem zahtevnejše.

Med pomembnejšimi razlogi za te korenite spremembe so predvsem zapleteni terapevtski postopki onkologov, ki zahtevajo pred svojimi odločitvami natančno opredelitev tumorja, saj celo malignomi iste histološke vrste variirajo tako v svojem biološkem poteku kot v reakcijah na zdravljenje.

Na drugi strani imajo tudi patologi mnogo večje možnosti zaradi tehničnega in konceptualnega razvoja v biologiji, posebej zaradi odkritja specifičnih protiteles in zaradi nove tehnologije rekombinantne DNA. Z novimi tehnikami smo dobili nove možnosti za natančnejše odgovore na klasična vprašanja, ki si jih zastavlja patolog ob analizi tumorskega tkiva. Med najpogostejšimi so: kam naj uvrstimo posamičen tumor glede na veljavne klasifikacijske sheme, do kod je tumor razširjen, ali sta prognoza bolezni in predvideni odgovor na zdravljenje odvisna od morfoloških značilnosti primarnega tumorja, ali je mogoče sklepati na etiološke dejavnike.

Še nekaj let nazaj je slonela tumorska diagnoza na grobih fenotipskih značilnostih, ki smo jih določili z analizo zgradbe tkiva in celičnih značilnosti. Danes je tak način diagnosticiranja še vedno veljaven, vendar ga lahko dopolnimo z imunohistokemičnimi metodami, s katerimi v celicah s specifičnimi protitelesi dokazujemo različne strukturne proteine. Ker so mnoge beljakovine bolj ali manj značilne za posamične vrste človekovih celic, lahko z dokazom specifičnih beljakovin natančneje opredelimo smer, v katero se diferencirajo tumorske celice, ki so sicer brez posebnih morfoloških značilnosti, in tako utemeljeno sklepamo o fenotipu. Ker uporabljamo približno 120 različnih protiteles, so diagnoze natančnejše, v mnogih primerih pa se lahko izognemo zamudni elektronski mikroskopiji ali manj natančnim posebnim histokemičnim metodam barvanja.

V diagnostični patologiji lahko z novimi načini dokažemo v celicah poleg beljakovin tudi druge, pomembnejše vrste makromolekul, predvsem RNA ali DNA. Še več, odkrili so tudi načine za odkrivanje minimalnih sprememb v DNA, torej načine za odkrivanje sprememb v genotipu.

Na eni strani lahko v tumorju odkrivamo spremembe v jedrnem dednem zapisu in na drugi strani ekspresijo tega zapisa, torej vse tisto, kar določa diagnostično tako pomemben fenotip.

S sodobnimi metodami lahko tako določamo najpomembnejše razloge za nastanek ali spremembe fenotipskih značilnosti tumorske celice. Odkrivamo motnje v onkogenih in v tumorskih supresorskih genih ter v dejavnikih, ki vplivajo na celični ciklus, na genske preustroje in druge spremembe. Ker so prav spremembe celičnega genotipa razlog za nastanek tumorjev, nam nove metode omogočajo tudi neposredno preučevanje mehanizmov onkogeneze.

V letošnjem letu smo postavili na Oddelku za patologijo Onkološkega inštituta laboratorij za molekularno patologijo, ki je tako najmlajša podenota inštituta. Zlasti v raziskovalnem delu smo povezani še z Inštitutom za patologijo, Medicinskim centrom za molekularno biologijo, Oddelkom za medicinsko genetiko Medicinske fakultete v Ljubljani in z Mednarodnim centrom za genetski inženiring in biotehnologijo v Trstu.

Kakšna je torej praktična vrednost molekularne patologije? Oglejmo si nekaj pomembnejših načinov uporabe.

RAZLIKOVANJE MED KLONSKIMI IN NEKLONSKIMI PROLIFERACIJAMI

Eden izmed na videz skoraj nerešljivih problemov patologije je določiti naravo biološko različnih, a med sabo na videz enakih procesov. Sem sodijo posebej hematopoetske tumorske proliferacije, kot so limfomi in levkemije, ki so si med sabo lahko zelo podobne, podobne pa so tudi drugim, reaktivnim procesom. V takih primerih si pomagamo z danes veljavnim postulatoma, da je večina neoplastičnih procesov klonalnih, enovrstnih, saj izhajajo iz ene patološko spremenjene celice. Diagnostični problem bi torej rešili tako, da bi odkrili marker, genski zapis, ki je v klonalnih celicah, torej v vseh celicah tumorja enak (monoklonski), v zdravih celicah telesa ali v celicah reaktivnih procesov pa v

vsaki nekoliko drugačen (poliklonski). Ko definiramo marker, nam ostane le še to, da izberemo način, kako določiti klonalnost neznane celične populacije.

S sodobnimi metodami odkrivamo motnje v onkogenih in v tumorskih supresorskih genih ter v dejavnikih, ki vplivajo na celični ciklus, na genske preustroje in druge spremembe. Ker so prav spremembe celičnega genotipa razlog za nastanek tumorjev, nam nove metode omogočajo tudi neposredno preučevanje mehanizmov onkogeneze.

Pri nas uporabljamo metodo, ki temelji na pomnoževanju specifično preurejenih genov, ki kodirajo posamezne polipeptidne verige antigenih receptorjev na površini limfocitov B in T. Pomnožene genske sekvence nato ločimo z gelsko elektroforezo in opredelimo klonalnost in vrsto (B ali T) limfoidne proliferacije. Če je pomnožena le ena genska sekvenca, je celična proliferacija monoklonska. Če je testna celična proliferacija monoklonska, bo proces, ki jo povzroča, verjetno neoplastičen, če pa je poliklonska, gre verjetneje za reaktivno bolezen. Poudariti je treba, da metoda ne da vedno povsem zanesljivih rezultatov, tako da moramo povezati laboratorijske, klinične, morfološke in druge značilnosti. Tudi ob molekularnobioloških metodah je odgovornost za diagnozo še vedno izključno patologova.

Problem diferenciacije med reaktivnimi in neoplastičnimi limfoidnimi infiltrati je še posebej zahteven v igelnih biopsijah kostnega mozga, saj so biopsijski vzorci zaradi narave posega majhni, zaradi zajete kostnine pa jih moramo še dekalcinirati. Ugotovili smo, da lahko reakcijo verižne polimerizacije izvajamo tudi v dekalciniranih vzorcih, in to metodo s pridom uporabljamo v vsakdanji praksi.

Poleg določanja klonalnosti in vrste limfoidnih proliferacij lahko z molekularno genetskimi metodami odkrivamo tudi druge tumorske značilnosti. Sem sodijo nekatere kromosomske translokacije, ki so značilne za posamične limfome in so obenem vezane na znane onkogene. Takšni sta na primer translokaciji t(11;14) pri bcl-1 ter t(14;18) pri bcl-2. Na podoben način lahko dokažemo tudi viruse, npr. EB virus pri Burkittovem limfomu ali pri limfomu T naravnih celic ubijalk. Za odkrivanje translokacij uvajamo metodo polimerazno verižne reakcije, za odkrivanje EBV pa metodo hibridizacije in situ.

MOLEKULARNE SPREMEMBE IN BIOLOŠKI POTEK TUMORJEV

Sprva se je zdelo, da so tumorji ene vrste homogeni, vendar je vse več podatkov, da se tudi tumorji enakega fenotipa na molekularni ravni med seboj razlikujejo. Ob tej ugotovitvi si lahko povsem logično zastavimo vprašanje, ali so molekularne razlike v tumorskih celicah tiste, ki pri različnih bolnikih z enakim tumorjem vplivajo na prognozo bolezni.

Na vprašanje smo skušali odgovoriti z molekularno biološko raziskavo serije sinovijskih sarkomov. Kako ločiti med manj in bolj agresivnimi sinovijskimi sarkomi, je vprašanje, na katerega ni zanesljivih odgovorov. Klasični napovedni znaki, ki naj bi veljali pri sarkomih (mitoze, pleomorfizem, nekroze, histološki tip, lega, lokalizacija) so se pri sinovijskem sarkomu izkazali za veljavne le v nekaterih raziskavah, v drugih pa ne. V naši študiji smo uporabili novo metodo za kvantitativno določanje ekspresije mRNA iz formalinsko fiksiranih parafinskih blokov. Ker lahko

na ta način študiramo serije arhiviranih tumorjev, je ta metoda v patologiji idealna posebej za velike retrospektivne klinično-patološke raziskave.

V skupini 31 bolnikov s sinovijskimi sarkomi, za katere smo imeli vse morfološke in klinične podatke, smo kvantitativno določili ekspresijo mRNA za dva supresorska gena. Prvi je bil p16, klasični inhibitor ciklinskih kinaz 4 in 6, drugi pa nm23, gen, ki so mu pripisovali zanimivo lastnost, da zavira metastaziranje. Oba gena sta vpletena v modificiranje celičnega ciklusa preko osi ciklini - ciklinske kinaze - retinoblastomski supresorski protein, osi, ki velja za centralni vzvod regulacije celičnega ciklusa.

Medtem ko povezave med ekspresijo mRNA za p18 in potekom bolezni v naši raziskavi nismo mogli potrditi, je bilo preživetje bolnikov s tumorji, v katerih je bila ekspresija mRNA za nm23 povečana, signifikantno slabše. Multivariatna je pokazala, da sta bila v naši skupini med številnimi raziskovanimi lastnostmi tumorjev samostojna napovedna dejavnika le ekspresija mRNA za nm23 in obsežnost tumorskih nekroz.

MOLEKULARNOGENETSKA ANALIZA DEDNIH IN SPORADIČNIH OBLIK KOLOREKTALNEGA KARCINOMA

Kolorektalni karcinom je vsaj iz dveh razlogov konceptualno in klinično pomembna bolezen. Eden od razlogov je prav gotovo jasen tumorski progres od zdravega epitela preko displastičnih sprememb v polipih do invazivnega karcinoma. Drugi razlog je ta, da so odkrili celo vrsto genetskih sprememb, ki so jih povezali s posameznimi stopnjami tega razvoja in prevedevali, da se pojavljajo specifične molekularne spremembe vzporedno s posameznimi histološkimi značilnostmi. Danes prevladuje hipoteza, da je za nastanek karcinoma pomembnejša akumulacija multiplih lezij in ne vrstni red njihovega pojavljanja. Ker so molekularne spremembe različne, jih je treba določiti v vsaki populaciji posebej.

V raziskavi 230 naključno izbranih kolorektalnih tumorjev pri naših bolnikih smo z analizo mikrosatelitne nestabilnosti in z mutacijsko analizo genov hMLH1 in hMLH2 odkrili 11 dednih sprememb v prvem in 6 sprememb v drugem genu. Gre za prve ugotovitve, ki bodo omogočile, da sestavimo nacionalni register družin z dedno obliko nepolipoznega kolorektalnega karcinoma. Šele ko bomo imeli register, bomo lahko začeli učinkovito odkrivati dedno obremenjene družinske člane in jih vključevati v preventivne programe zdravljenja.

IZGUBA HETEROZIGOTNOSTI V PREDELU TUMORSKIH SUPRESORSKIH GENOV BRCA1, BRCA2 IN BRCA3

Z molekularnogenetskimi študijami so odkrili, da so mehanizmi nastanka sporadičnih in hereditarnih oblik

V raziskavi 230 naključno izbranih kolorektalnih tumorjev smo z analizo mikrosatelitne nestabilnosti in z mutacijsko analizo genov hMLH1 in hMLH2 odkrili 11 dednih sprememb v prvem in 6 sprememb v drugem genu. Gre za prve ugotovitve, ki bodo omogočile, da sestavimo nacionalni register družin z dedno obliko nepolipoznega kolorektalnega karcinoma.

karcinoma dojke komplicirani, saj so vanje vpleteni številni onkogeni in tumorski supresorski geni. Med pomembnejše tumorske supresorske gene štejemo predvsem tri, BRCA1, BRCA2 in BRCA3. Če bomo želeli začeti z genetskim svetovanjem pri družinah z bolnicami s karcinomom dojke, bomo morali pred tem obvladati tudi tehnike genetskega presejanja.

V začetni domači raziskavi smo pri 50 naključno izbranih bolnicah s karcinomom dojke iskali za vse tri izgubo heterozigotnosti. DNA smo ekstrahirali iz tumorskih vzorcev, vklopljenih v parafin, in iz levkocitov krvi. Z verižno polimerazno reakcijo smo določili 6 mikrosatelitnih markerjev in odkrili izgubo heterozigotnosti za BRCA1 pri 59 %, za BRCA2 pri 29 % in za BRCA3 pri 49 % tumorjev.

KAKO NAPREJ?

Prizadevamo si, da bi začeli raziskave v zvezi z aktivnostjo telomeraze pri humanih tumorjih. Dolžina telomernih koncev kromosomov je posledica ravnotežja med

podaljševanjem telomerov s telomerozo in procesov, ki telomere krajšajo. Današnja telomerno-telomerazna hipoteza nastanka malignomov sloni na odkritju, da imajo skoraj vsi malignomi, v nasprotju z običajnimi somatskimi celicami, izrazito telomerazno aktivnost.

Izkazalo se je že, da bomo lahko z določanjem telomeraze presejali ogrožene skupine in tako skušali odkriti zgodnje oblike karcinoma, uporabljali pa jo bomo lahko tudi pri odkrivanju rezidualne bolezni po standardni kirurški ali po adjuvantni terapiji. Zdi se tudi, da bomo iz višine telomerazne aktivnosti lahko sklepali o prognozi bolezni. Od tu ni daleč do hipoteze, da bi z inhibicijo telomeraze dosegli postopno erozijo telomerov in s tem zavrli celično proliferacijo ali celo povzročili smrt tumorskih celic. Ob vseh teh napovedih pa je še brez odgovora ključno vprašanje, kako s predvidenimi manipulacijami doseči selektivno staranje in smrt karcinomskih celic, pa vseeno dopustiti, da se zdrave celice še naprej delijo.

■