

# Pomen pretočnicometrične analize DNA pri načrtovanju zdravljenja karcinoma dojke

Tanja Čufer, Marija Us-Krašovec

Že desetletja so znani tako imenovani klasični napovedni dejavniki raka dojke, kot so velikost tumorja, histološki gradus, število prizadetih pazdušnih bezgavk, steroidni receptorji in drugi. Na podlagi teh dejavnikov načrtujemo zdravljenje bolnic. Vendar s klasičnimi napovednimi dejavniki ne moremo vedno zanesljivo opredeliti agresivnosti tumorja in s tem prognoze bolezni. Zato analiziramo nove lastnosti tumorja, ki bi nam natančneje napovedale potek bolezni in omogočile izbor najustreznejšega zdravljenja za vsako posamezno bolnico.

## DNA PLOIDIJA

O DNA ploidiji tumorjev, ki jo opredelimo s citometrično analizo, smo v Onkologiji že pisali (2/98). Zato za osvežitev spomina samo nekaj osnovnih podatkov.

Normalna somatska celica je diploidna in ima 23 parnih kromosomov. Količino DNA, ki ustreza normalnemu številu kromosomov, označujemo kot diploidno. Vrednosti, ki so večje ali manjše od diploidne, so aneuploidne – hiperdiploidne ali hipodiploidne. Označimo jih z indeksom DNA, ki kaže relativno stopnjo odklona od normalne vrednosti. Po definiciji je indeks DNA normalne, diploidne celice 1. Iz frekvenčnega histograma, s katerim pretočni citometer grafično prikaže količino DNA, ugotovimo tudi delež celic v fazi S, tj. v fazi priprave celic na delitev. Ta delež opredeljuje proliferativno aktivnost tumorja.

## NAŠE RAZISKAVE

Na Onkološkem inštitutu analiziramo vsebnost DNA tumorjev dojke s pretočnim citometrom od leta 1989. Opravili smo začetne primerjalne raziskave iz tkivnih vzorcev in vzorcev aspiracijske biopsije. Od leta 1992 so podatki o DNA ploidiji in deležu celic v fazi S sestavni del predoperativne diagnoze tumorjev dojke, ki jo postavimo iz vzorca aspiracijske biopsije.

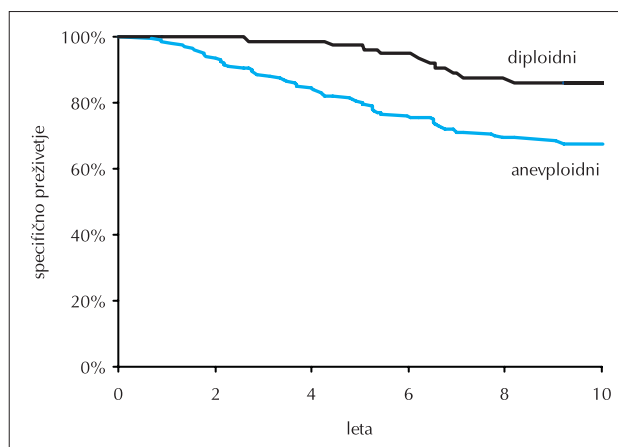
Pomen DNA ploidije in proliferativne aktivnosti pri karcinomu dojke smo analizirali v štirih skupinah bolnic:

1. skupina: bolnice z operabilnim karcinomom, stadij I in II, srednja opazovalna doba 10 let;
2. skupina: bolnice z operabilnim karcinomom, stadij I-III, srednja opazovalna doba 9 let;
3. skupina: prognostično neugodna skupina bolnic z operabilnim karcinomom z več kot tremi metastatskimi bezgavkami, srednja opazovalna doba 5 let;
4. skupina: bolnice s karcinomom, stadij I-IV, konzervativno zdravljenje s tamoksifonom, srednja opazovalna doba 4 leta.

## REZULTATI

1. skupina: retrospektivna analiza v skupini 169 bolnic, starih od 29 do 70 let, s srednjo starostjo 51 let. Vsebnost DNA smo analizirali v suspenziji celic, pripravljene iz več kot 10 let starega, v parafinski blok vklapljenega tumorskega tkiva. Za opredelitev napovednega pomena novega dejavnika je pomembno daljše opazovanje poteka bolezni, kar nam omogočajo raziskave arhiviranih tkivnih vzorcev. Žal pa je kakovost meritev DNA v starih vzorcih tkiva slabše kot v svežih. Zato nismo mogli analizirati deleža celic v fazi S. Delež aneuploidnih tumorjev je bil nizek, 49-odstoten. Napovednega pomena DNA ploidije v tej skupini bolnic nismo mogli potrditi, čeprav je bilo 5-letno preživetje bolnic z diploidnimi tumorji boljše. Ugotovili pa smo, da so aneuploidni tumorji pogostejši kot diploidni zasevali v plevro (26% proti 8%) in v jetra (25% proti 8%).

2. skupina: prospektivna analiza v skupini 303 bolnic s starostnim razponom od 31 do 81 let in srednjo starostjo 55 let. Vsebnost DNA smo analizirali v celični suspenziji, pripravljene iz sveže zmrznjenega tumorskega tkiva. V tej skupini je bilo 70,6% aneuploidnih tumorjev. Multivariatna analiza je pokazala, da je DNA ploidija poleg histološkega gradusa, števila metastatskih bezgavk in velikosti tumorja statistično značilen neodvisen napovedni dejavnik ponovitve bolezni in preživetja (slika 1). Delež celic v fazi S, ki je bil v univariatni analizi prav tako povezan s preživetjem, je v multivariatni analizi izgubil samostojno napovedno vrednost.



Slika 1. Specifično preživetje (upoštevane so le smrti zaradi karcinoma dojke) pri bolnicah z diploidnimi ( $n = 89$ ) in aneuploidnimi ( $n = 214$ ) tumorji. Razlika je statistično signifikantna ( $P = 0.0014$ ).

3. *skupina*: v tej prognostično neugodni skupini je bilo 146 bolnic starosti od 30 do 82 let, njihova srednja starost je bila 56 let. DNA ploidijo smo analizirali v suspenziji, pripravljeni iz zmrznjenega tkiva ali vzorca aspiracijske biopsije tumorjev dojke. Aneuploidne vrednosti DNA smo izmerili v tumorjih 70,5% bolnic. V skupini z diploidnimi tumorji je 5 let brez ponovitve bolezni preživel 56% bolnic, v skupini z aneuploidnimi tumorji pa le 36%. Multivariatna analiza, v kateri smo upoštevali patološko velikost tumorja, histološki gradus, stanje pazdušnih bezgavk, odstotek MIB1- pozitivnih celic in DNA ploidijo, je pokazala, da je DNA ploidija poleg patološke velikosti tumorja statistično značilen neodvisen napovedni dejavnik. Prognoza bolnic je bila povezana tudi z deležem celic v fazi S in se je z rastočim deležem celic v tej fazi progresivno slabšala. Delež celic v fazi S je bil v multivariatni analizi močnejši napovedni dejavnik poteka bolezni kot število bezgavk z metastazami.

4. *skupina*: skupina konzervativno zdravljenih bolnic je bila majhna, ker smo vse potrebne podatke lahko zbrali le za 79 bolnic. Bolnice so bile stare od 70 do 96 let, srednja starost je bila 91 let. Analizo smo opravili v vzorcih aspiracijske biopsije. Pri 40% bolnic je bila bolezen v stadiju III, pri 38% v stadiju II, pri 18% v stadiju IV in le pri 4% bolnic v stadiju I. Aneuploidne tumorje je imelo 63% bolnic. Z multivariatno analizo smo proučili napovedni pomen DNA ploidije, stadija bolezni in starosti na preživetje brez bolezni in celotno preživetje. DNA ploidija je bila pri bolnicah z nemetastatskim rakom neodvisen napovedni

dejavnik preživetja brez progressa bolezni in celotnega preživetja. Odstotek lokalno napredovale bolezni je bil pri bolnicah z diploidnimi tumorji statistično značilno nižji kot pri bolnicah z aneuploidnimi tumorji.

#### SKLEP

Iz rezultatov naših raziskav lahko povzamemo, da je DNA ploidija neodvisen napovedni dejavnik poteka bolezni pri bolnicah z operabilnim karcinomom dojke v stadiju I-III, v prognostično neugodni skupini bolnic z več kot tremi metastatskimi bezgavkami in pri starejših bolnicah, ki jih zdravimo le konzervativno s tamoksifenom. Naši izsledki kažejo, da je DNA ploidija tudi napovedni dejavnik prvega razsoja bolezni in odgovora na hormonsko zdravljenje. Delež celic v fazi S pa je bil v prognostično neugodni skupini bolnic z več kot tremi metastatskimi bezgavkami celo pomembnejši od klasičnega napovednega dejavnika – števila pozitivnih bezgavk.

Zato menimo, da sta DNA ploidija in delež celic v fazi S pri bolnicah s karcinomom dojke dobra napovedna dejavnika poteka bolezni, morda pa tudi odgovora na zdravljenje. Njena dodatna prednost je, da ju lahko, za razliko od številnih drugih bioloških lastnosti, določamo na vzorcih, dobljenih z aspiracijsko biopsijo v predoperativnem diagnostičnem postopku. Zato omogočata smotrnejše načrtovanje zdravljenja pri vsaki posamezni bolnici.

