

4. Streszczenie w języku polskim

Zastosowanie techniki mikromacierzy tkankowych w poszukiwaniu nowych markerów nowotworowych w rakach gruczołu piersiowego

Badania przeprowadzono na archiwalnym materiale 51 przypadków inwazyjnego przewodowego raka gruczołu piersiowego (IDC), zabezpieczonym w postaci bloczków parafinowych, pochodzących z Zakładu Patomorfologii Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu. Dla każdego przypadku wykonano barwienie topograficzne hematoksylina-eozyna na klasycznych skrawkach parafinowych celem wybrania obszarów referencyjnych do przygotowania TMA. Bloczki mikromacierzy przygotowano z użyciem aparatu do manualnego przygotowania TMA z wykorzystaniem igły o średnicy 0,6 mm. Na parafinowych pełnych skrawkach (WS, *whole slides*) jak i skrawkach TMA przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne (IHC) z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko:

- 1) białku SATB1 (sugerowany marker proliferacji i przerzutowania komórek nowotworowych);
- 2) białku MCM-2 (sugerowany marker proliferacji komórek nowotworowych);
- 3) antygenowi proliferacyjnemu Ki-67 (uznany marker proliferacji komórek nowotworowych);
- 4) receptorowi progesteronowemu (PR) i estrogenowemu (ER) (uznane czynniki prognostyczne i predykcyjne IDC).

Z użyciem mikroskopów świetlnych BX-41 oraz BX-42 (Olympus) oraz skal półilościowych, określona została lokalizacja oraz nasilenie ekspresji badanych antygenów w komórkach nowotworowych. Celem weryfikacji metody, w jednym z badań przeanalizowano wyniki uzyskane metodą klasyczną (WS) jak i z zastosowaniem TMA. Otrzymane rezultaty odniesiono ponadto do danych kliniczno-patologicznych a całość poddano analizie statystycznej.

Analiza statystyczna pomiędzy ekspresją tego samego markera na skrawkach parafinowych WS oraz TMA wykazała silną dodatnią korelację w przypadku antygeny Ki-67: Ki-67 (TMA) vs. Ki-67 (WS) ($r=0,91$; $p<0,05$) jak również białka MCM-2: MCM-2 (TMA) vs. MCM-2 (WS) ($r=0,87$; $p<0,05$). Analiza statystyczna wykazała również znaczące dodatnie korelacje obu badanych antygenów na skrawkach WS i TMA ze stopniem złośliwości histologicznej G: Ki-67 (TMA) ($r=0,50$); Ki-67 (WS) ($r=0,51$); MCM-2 (TMA) ($r=0,44$);

MCM-2 (WS) ($r=0,38$), we wszystkich przypadkach $p<0,05$. Ponadto test Mann-Whitney'a nie wykazał żadnych znaczących różnic pomiędzy odsetkami komórek nowotworowych wykazujących ekspresję Ki-67 i MCM-2 analizowanych z wykorzystaniem metody WS jak i TMA. Analizując ekspresję obu badanych antygenów w odniesieniu do stopnia złośliwości, wykazano podobną ekspresją Ki-67 i MCM-2 w każdym ze stopni G. Dla porównania metody WS i TMA zastosowano test Blanda-Altmana. Ujawnił on niski poziom błędu pomiędzy obydwoma metodami w odniesieniu do ekspresji Ki-67 i MCM-2. Odchylenie standardowe błędu dla Ki-67 (WS) vs. Ki-67 (TMA) wyniosło 9,52%, podczas gdy dla MCM-2 (WS) vs. MCM-2 (TMA) 11,67%. Analiza ta bezpośrednio pokazuje wysoką niezawodność metody TMA (Kobierzycki *et al.*, Tissue microarray technique in evaluation of proliferative activity in invasive ductal breast cancer. *Anticancer Res.*, 2012).

Kolejne reakcje IHC przeciwko SATB1 i Ki-67 oraz ER, PR przeprowadzono już wyłącznie na skrawkach TMA. W oparciu o zalecenia kliniczno-patologiczne ocenie poddano ekspresję receptorów ER i PR. 62,5% guzów zostało sklasyfikowanych jako estrogeno-dodatnie a 47,92% jako progesterono-dodatnie. Pomędzy białkami SATB1 i Ki-67 wykazano umiarkowaną korelację ($r=0,291$; $p=0,045$ bez odniesienia do statusu receptorowego oraz $r=0,392$; $p=0,032$ w nowotworach estrogeno-negatywnych). Dodatkowo, ekspresja antygeny Ki-67 wzrastała wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej (G). Różnice istotnie statystyczne stwierdzono pomiędzy wszystkimi stopniami G: G1 vs. G2 ($p=0,0002$), G2 vs. G3 ($p=0,0253$) oraz G1 vs. G3 ($p=0,0184$). Podobną tendencję zaobserwowano w odniesieniu do ekspresji białka SATB1, ale poziom istotności statystycznej nie został osiągnięty. (Kobierzycki *et al.*, Expression of SATB1 protein in the ductal breast carcinoma tissue microarrays – preliminary study. *Folia Histochem Cytobiol.*, 2013).

W trzeciej prezentowanej pracy, w formie przeglądowej zostały przedstawione możliwości wykonania i oceny mikromacierzy tkankowych, zalety i wady ich użytkowania oraz wyniki niektórych badań wykorzystujących technikę TMA. (Kobierzycki *et al.*, Zastosowanie techniki mikromacierzy tkankowych (TMA) w badaniach nad markerami nowotworowymi w rakach gruczołu piersiowego. *Post.Biol.Kom.*, 2012).