

Received: 2012.01.25  
Accepted: 2012.04.25  
Published: 2012.06.11

## Rola profilowania genowego z zastosowaniem macierzy DNA w diagnostyce, określaniu rokowania i odpowiedzi na leczenie w raku jelita grubego

DNA microarray-based gene expression profiling in diagnosis, assessing prognosis and predicting response to therapy in colorectal cancer

Przemysław Kwiatkowski<sup>1</sup>, Piotr Wierzbicki<sup>2</sup>, Andrzej Kmieć<sup>3</sup>, Janusz Godlewski<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Katedra Histologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>3</sup> Zakład Propedeutyki Onkologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>4</sup> Oddział Kliniczny Chirurgii Onkologicznej Wydziału Nauk Medycznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

### Streszczenie

Rak jelita grubego to najczęstszy nowotwór przewodu pokarmowego. Nowotwór ten rozpatrywany jest jako biologiczny model kancerogenezy, w którego przemianie od wczesnego do późnego gruczolaka, a następnie do późnego raka towarzyszą wyraźne zmiany genetyczne. Stosowane klinicznie i patologiczne parametry oceny chorych są obecnie niewystarczające do personalizacji sposobu leczenia w dotychczas klasyfikowanych grupach pacjentów, a wiarygodne markery molekularne o dużej wartości prognostycznej nie zostały jak dotąd poznane. Badania molekularne z użyciem techniki mikrosiatek wskazały wiele genów zaangażowanych w proliferację i różnicowanie komórkowe w procesie kancerogenezy. Jednocześnie określanie profilu genowego komórek raka za pomocą techniki mikromacierzy może być użytecznym narzędziem w wyodrębnianiu pacjentów o różnym przebiegu klinicznym, dla których leczenie uzupełniające może być zindywidualizowane.

Ponadto białkowe produkty tych genów mogłyby stanowić cel nowych leków przeciwnowotworowych.

Głównym celem pracy jest przedstawienie obecnego stanu wiedzy na temat praktycznego zastosowania profilowania genowego z użyciem techniki mikromacierzy w diagnostyce, określaniu rokowania i odpowiedzi na leczenie w raku jelita grubego.

### Słowa kluczowe:

rak jelita grubego • mikromacierze • profilowanie genowe • określanie rokowania • określanie odpowiedzi na leczenie

### Summary

Colorectal cancer is the most common cancer of the gastrointestinal tract. It is considered as a biological model of a certain type of cancerogenesis process in which progression from an early to late stage adenoma and cancer is accompanied by distinct genetic alterations.

Clinical and pathological parameters commonly used in clinical practice are often insufficient to determine groups of patients suitable for personalized treatment. Moreover, reliable molecular

markers with high prognostic value have not yet been determined. Molecular studies using DNA-based microarrays have identified numerous genes involved in cell proliferation and differentiation during the process of cancerogenesis. Assessment of the genetic profile of colorectal cancer using the microarray technique might be a useful tool in determining the groups of patients with different clinical outcomes who would benefit from additional personalized treatment.

The main objective of this study was to present the current state of knowledge on the practical application of gene profiling techniques using microarrays for determining diagnosis, prognosis and response to treatment in colorectal cancer.

**Key words:** colorectal cancer • DNA microarray • gene profiling • assessing prognosis • predicting response to therapy

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=999919>

**Word count:** 3328

**Tables:** 2

**Figures:** 1

**References:** 68

**Adres autora:** dr Przemysław Kwiatkowski, Katedra Histologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, ul. Warszawska 30; e-mail: przemyslaw.kwiatkowski@uwm.edu.pl

## 1. WPROWADZENIE

Klasyfikacja TNM nowotworów złośliwych, oparta na rozpoznaniu histopatologicznym jest powszechnie stosowana we wszystkich ośrodkach medycznych. Przyporządkowanie do określonej grupy opiera się na opisie takich cech nowotworu jak: wielkość guza, obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz obecność przerzutów odległych. Ten dotychczas stosowany system klasyfikacji nie jest zadowolający w odniesieniu do wymaganej obecnie personalizacji leczenia, ponieważ nie daje pełnej wiedzy dotyczącej zróżnicowanej biologii nowotworu w przebiegu kancerogenezy.

Ze względu na to, iż u podstaw rozwoju każdego nowotworu leżą zaburzenia na poziomie molekularnym, poszukiwane są precyzyjne systemy klasyfikacji, które koncentrują się na nowoczesnych metodach obejmujących analizę mutacji materiału genetycznego; genomika – dla genomowego i mitochondrialnego DNA, transkryptomika – analiza informacyjnego RNA (mRNA). Mutacje te mogą mieć pośrednie lub bezpośrednie przełożenie na jakość i/lub ilość finalnych produktów białkowych, stąd też kolejnym narzędziem jest proteomika – jako analiza profili białkowych w komórce. Podobnie badanie interakcji białek w obrębie szlaków metabolicznych (metabolomika), pozwala badaczom poznać aktywność i czynność komórek nowotworowych. Natomiast główne narzędzia systemiki koncentrują się na opracowywaniu swego rodzaju „molekularnych portretów” komórek nowotworowych i wyróżnianiu grup w określonych histologicznie typach nowotworów.

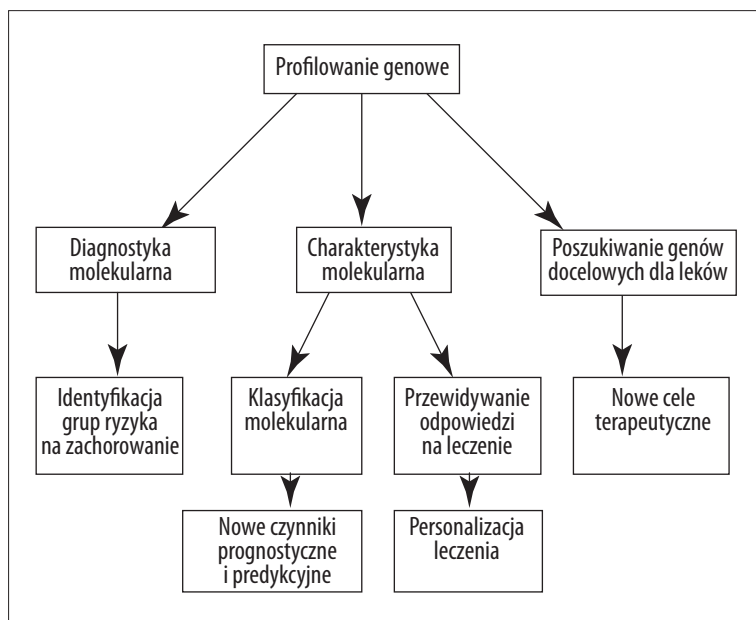
Najnowsze badania w dziedzinie biologii molekularnej nowotworów koncentrują się na transkryptomice pod kątem jakościowej i ilościowej analizy mRNA. Tradycyjne metody badania poziomu ekspresji genów, takie jak hybrydyzacja RNA (Northern blotting) [5], różnicowego namnażania (differential display) [38], SAGE (serial analysis of

gene expression) [59], hybrydyzacja „dotblot” [37] mają wspólną wadę – pozwalają na jednoczesne badanie ekspresji niewielkiej liczby genów, ponadto wymagają dużych ilości materiału wyjściowego.

W przeciwieństwie do wymienionych wyżej, innowacyjna technika mikromacierzy (mikrosiatek – microarray) pozwala na symultaniczną analizę ekspresji tysięcy genów, umożliwiając przez to określenie aktywności konkretnych genów w danych warunkach przy stosunkowo niewielkiej ilości materiału wyjściowego. Niekiedy do dalszej klasyfikacji lub określenia prognozy badane pole zawęża się do kilku wybranych genów i dalsze analizy mogą być prowadzone tańszymi i mniej skomplikowanymi technikami biologii molekularnej, np. ilościowy PCR (QPCR – quantitative PCR, real-time PCR – PCR w czasie rzeczywistym).

Metoda mikromacierzy jest nowoczesną techniką, która zyskała szczególne uznanie po opublikowaniu w 1999 r. na łamach „Science” pracy poświęconej profilowi molekularnemu blastów białaczkowych [28]. Wykazano wówczas, że za pomocą techniki mikromacierzy można odróżnić ostrą białaczkę szpikową od białaczki limfoblastycznej w oparciu o dane dotyczące ekspresji odpowiednich grup genów. Wyniki tych badań dały także podstawy do wprowadzenia kilku nowych terminów w onkologii, mianowicie „odkrywania klas” (class discovery) czyli identyfikacji nieznanymi podtypów nowotworów, „przewidywania klas” (class prediction) – przyporządkowywania nowotworów do zdefiniowanych grup oraz „porównywania klas” (class comparison) – zestawiania różnych profili ekspresji w obrębie dobrze zdefiniowanych grup [28].

Ze względu na możliwość jednoczesnego badania ekspresji ogromnej liczby genów przy stosunkowo niewielkiej ilości materiału wyjściowego, to właśnie technika mikromacierzy znajduje obecnie największe zastosowanie w analizach profili genowych.



Ryc. 1. Potencjalne możliwości wykorzystania profilowania genowego w onkologii

## 2. SYSTEMY MIKROMACIERZY

Mikromacierze ze względu na budowę, sposób otrzymywania oraz działanie można podzielić na dwa odrębne systemy różniące się długością sond, a przez to swoistością do wykrywanych fragmentów RNA.

Pierwsze z nich, mikromacierze oparte na oligonukleotydach, noszą nazwę mikromacierzy oligonukleotydowych wysokiej gęstości (chipów DNA) i otrzymywane są metodą fotolitograficzną GeneChip® [58,62]. Metoda ta polega na przeprowadzaniu kontrolowanej syntezy oligonukleotydów DNA o określonej sekwencji bezpośrednio na plastikowej płytce (*in situ*) o powierzchni około 2 cm<sup>2</sup>. Otrzymane oligonukleotydy mają najczęściej długość 15–25 nt, a ich fizyczny rozmiar nie przekracza 10 μm. Dzięki temu możliwe jest umieszczenie na jednej płytce do 750 tys. sond oligonukleotydowych, co umożliwia hybrydację z komplementarnym DNA lub RNA (cDNA, rRNA) oraz z microRNA [31].

Drugi z systemów mikromacierzy, opracowany na Uniwersytecie Stanforda, zwany mikromacierzami cDNA, opiera się na wykorzystaniu biblioteki klonów DNA. Za pomocą mikrodrukarki komputerowej jednoniciowe znakowane fluorescencyjnie sondy cDNA długości 500–2000 nukleotydów są automatycznie nanoszone na szkiełko podstawowe mikroskopu pokryte poli-L-lizyną (nawet do 25 tys. cDNA na powierzchni jednego szkiełka) [41,49,65]. W kolejnym etapie zachodzi hybrydacja badanego RNA lub cDNA z odpowiednimi sondami cDNA. W obu przypadkach pomiar intensywności sygnału fluorescencyjnego hybryd badanego RNA/cDNA-cDNA jest wykonywany z zastosowaniem odpowiednich detektorów.

Technika mikrosiatek cDNA ma pewną przewagę nad metodą opartą na oligonukleotydach. Za pomocą mikromacierzy cDNA możliwe jest badanie ekspresji genów, nie znając ich pełnej sekwencji, a do reakcji potrzebne są jedynie odpowiednie klony DNA uzyskane w reakcji odwrotnej transkrypcji na matrycy RNA z badanych prób, następnie cDNA jest amplifikowane z wykorzystaniem swoistych lub

zdegenerowanych starterów w reakcji PCR. W przypadku analizy zjawiska alternatywnego składania mRNA, oba systemy umożliwiają analizę różnych wariantów mRNA (izoforn). Natomiast technika mikromacierzy oligonukleotydowych umożliwia analizę ilościową microRNA (miRNA).

Obecnie z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych można mierzyć ekspresję ponad 750 tysięcy sekwencji RNA dla 28 tysięcy genów w jednej próbce (dla sekwencji *Homo sapiens*), natomiast próg detekcji jest niezwykle niski, gdyż dysponując zaledwie jedną kopią transkryptu na komórkę możliwe jest wykrycie już dwukrotnego wzrostu ekspresji genu [30].

W medycynie technika mikromacierzy znalazła już zastosowanie w badaniach związanych z poszukiwaniem związków między określoną mutacją wywołującą chorobę molekularną a fenotypem (np. w mukowiscydozie [57] lub w badaniach procesów zapalnych [64]).

Ze względu na jednoczesną analizę ekspresji wielu tysięcy genów, w ostatnim czasie największe nadzieje wiąże się z praktycznym wykorzystaniem mikromacierzy w diagnostyce, prognozowaniu i terapii chorób nowotworowych, jako że u podłoża transformacji nowotworowej leży nagromadzenie przynajmniej kilku kluczowych nieletalnych mutacji genetycznych w pojedynczej komórce.

## 3. TECHNIKA MIKROMACIERZY A SEKWENCJONOWANIE DNA/RNA

Technika mikrosiatek umożliwiła bardzo duży skok ilościowy i jakościowy w uzyskiwaniu informacji dotyczących poziomu ekspresji dziesiątek tysięcy genów w pojedynczej próbce. Jednak, mimo możliwości ilościowego określenia występowania zróżnicowanych izoforn mRNA, w onkologii doświadczalnej kluczowym elementem jest poznanie sekwencji transkryptów, a także genomowego DNA. Technika mikromacierzy jest wykorzystywana w amerykańskim projekcie „The cancer genome atlas” (TCGA), nadzorowanym przez National Cancer Institute oraz National Human Genome Research Institute przy współdziałaniu wielu

instytutów medyczno-badawczych. Projekt ten, rozpoczęty w 2005 r. ma na celu skatalogowanie kluczowych mutacji DNA, zmian epigenetycznych (hipermetylacja regionów promotorowych) i profili ekspresji charakterystycznych dla różnych typów nowotworów. W ramach TCGA główny nacisk położono na ilość i jakość materiału badawczego – m.in. 500 sparowanych tkanek dla każdego nowotworu (tkanka guza + tkanka makroskopowo niezmienniona lub krew), wprowadzono standaryzację pobierania, przechowywania i transportu prób biologicznych. Projekt TCGA zakłada analizę następujących nowotworów: glejaka gwiaździstego, raka piersi, jajnika, szyjki macicy, tarczycy, ostrej białaczki szpikowej, czerniaka oraz raka płuc, nerki, pęcherza, gruczołu krokowego. W badaniach nad genetyką nowotworów w obrębie układu pokarmowego zakłada się analizę raka żołądka oraz raka jelita grubego. Badania molekularne obejmują głównie sekwencjonowanie egzomu – sekwencji kodujących w obrębie genomowego DNA. Jednocześnie prowadzona jest analiza profilowania ekspresji metodą mikromacierzy cDNA. Ze względu na konieczność obróbki gigantycznej ilości danych, na podstawie wyników projektu TCGA opublikowano jak dotąd jedynie prace o profilowaniu genetycznym glejaka [14,17,18] oraz raka jajnika [16,43,68], natomiast pozostałe grupy nowotworów podlegają obecnie obróbce molekularno-informatycznej.

W przypadku sekwencjonowania mRNA w próbach molekularnych (RNA-Seq), polegającej na sekwencjonowaniu dziesiątek tysięcy transkryptów w pojedynczej próbce na nośniku stałym, trwa dyskusja nad wyższością tej techniki nad mikromacierzami [42]. Głównym ograniczeniem mikrosiatek jest brak znajomości wszystkich sekwencji mRNA w analizowanej próbce, stąd ten element jest podstawową zaletą sekwencjonowania RNA-Seq, gdzie analizie poddawane jest każde dojrzałe mRNA o długości większej niż 25 nt. Jednakże zdecydowane zalety techniki mikromacierzy, takie jak niższy próg detekcji [42], cena pojedynczego oznaczenia – prawie 10-krotnie mniejsza niż RNA-Seq, a także rozmiar wyników z pojedynczego eksperymentu – maksymalnie 30 MB dla mikromacierzy w stosunku do 20–30 GB danych dla analogicznego doświadczenia RNA-Seq [8] skutkuje znacznie częstszym wykorzystywaniem mikromacierzy niż RNA-Seq [50]. Jednak część zespołów badawczych stosuje symultanicznie RNA-Seq i mikrosiateki, uzyskując analogiczne wyniki [1,13,39].

#### 4. ZASTOSOWANIE MIKROMACIERZY W ONKOLOGII

Pierwszym nowotworem, którego molekularne podstawy opisano technikami mikromacierzy, jest rak piersi. Perou i wsp. wyodrębnili metodą biologii molekularnej 5 genetycznych podtypów raka piersi, charakteryzujących się różnym poziomem ekspresji genów. Wykazali korelację między podtypem molekularnym a rokowaniem i odpowiedzią na leczenie, wskazując na wartości prognostyczne określania profilu genowego z użyciem techniki mikrosiatek DNA [54]. Autorzy zwrócili również uwagę na to, że pozyskane w oparciu o techniki mikromacierzy profile molekularne raka piersi, wydają się lepiej określać biologię guza oraz prognozować przebieg choroby niż dotychczas stosowane cechy kliniczno-patologiczne.

Śród innych nowotworów, które badano techniką mikromacierzy były wspomniane już nowotwory hematologiczne,

gruczołów wewnątrzwydzielniczych, a także rak płuc, krtań, jajnika, prostaty i trzustki [9,19,23,40,45,47,53].

W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się określaniu profili genowych z wykorzystaniem technik mikromacierzy w najczęstszym nowotworze przewodu pokarmowego czyli w raku jelita grubego. Dzieje się tak z kilku względów. Po pierwsze, rak jelita grubego jest uznany jako model kancerogenezy, w którym przemianie gruczolaka do wczesnego, a następnie późnego raka, towarzyszą zdefiniowane zmiany genetyczne [60]. Po drugie, obecnie stosowane kliniczne i patologiczne parametry oceny choroby są niewystarczające do indywidualizacji przebiegu choroby, a jednocześnie nie zostały dotąd poznane markery molekularne o dużej wartości prognostycznej. I wreszcie po trzecie, stosowane powszechnie w leczeniu raka jelita grubego konwencjonalne chemioterapeutyki, takie jak 5-fluorouracyl i leukoworyna, odznaczają się znaczną toksycznością, a odpowiedź kliniczna po ich zastosowaniu jest różna u pacjentów z tym samym stopniem zaawansowania klinicznego choroby. Dlatego też obecnie stawiany jest wymóg precyzyjnego określenia tych pacjentów, którzy odniosą korzyść z leczenia oraz tych, u których będzie ono tylko miało działanie toksyczne a nie terapeutyczne.

Obecnie prowadzone badania nad określeniem profilu genowego raka jelita grubego z użyciem techniki mikromacierzy, można podzielić na następujące grupy:

- badania nad molekularnymi aspektami procesu kancerogenezy,
- badania nad przewidywaniem rokowania,
- badania nad prognozowaniem odpowiedzi na leczenie.

#### 4.1. Mikromacierze w badaniu molekularnych podstaw procesu kancerogenezy w raku jelita grubego

Zastosowanie technik mikromacierzy w badaniu procesu kancerogenezy raka jelita grubego ma na celu określenie swoistych zmian ekspresji genów oraz przyporządkowanie nowotworu do określonej grupy o biologicznie znanej charakterystyce nowotworzenia. Badania określane mianem „porównywania klas” mają na celu określenie profilu genowego swoistego dla prawidłowego nabłonka jelitowego, gruczolaka oraz raka. W celu przewidzenia przebiegu choroby porównuje się pod względem różnic w ekspresji genów guzy pierwotne i przerzutowe, a także te umiejscowione prawo- i lewostronnie.

Pierwsze badanie, w którym porównywano różnice ekspresji genów między prawidłową śluzówką a tkanką nowotworową za pomocą macierzy nukleotydowych (Affymetrix), było badanie przeprowadzone przez Alona i wsp. w 1999 r. [4]. Wyodrębniono wówczas zestaw 500 genów, których ekspresja wyraźnie różniła się między badanymi próbkami prawidłowej i zmienionej nowotworowo śluzówki jelita. W innym badaniu, przeprowadzonym dwa lata później przez zespół badaczy z Uniwersytetu w Princeton, przeanalizowano ponad 4 tysiące genów i na podstawie różnic ich ekspresji wyodrębniono 3 duże grupy genów odróżniające prawidłową śluzówkę jelita grubego od gruczolaka i gruczolaka od raka [48].

Dane literaturowe wskazują również na różnice w ekspresji genów między różnymi stopniami zaawansowania raka

Tabela 1. Zastosowanie mikromacierzy DNA w diagnostyce i leczeniu raka jelita grubego

Pole badań	Cel badań	Schemat badania
Molekularne podstawy kancerogenezy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Określenie ekspresji genów odpowiedzialnych za transformację nowotworową</li> <li>• Molekularna klasyfikacja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Porównywanie klas: prównywanie ekspresji określonych genów prawidłowej śluzówki jelita grubego względem gruczolaka, gruczolakoraka</li> <li>• Porównywanie guzów pierwotnych i przerzutowych</li> <li>• Porównywanie guzów prawej i lewej połowy okrężnicy</li> </ul>
Przewidywanie rokowania	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Określenie ekspresji genów w różnych stadiach zaawansowania nowotworu</li> <li>• Identyfikacja genów odpowiedzialnych za powstawanie przerzutów odległych</li> <li>• Klasyfikacja chorych do grup wysokiego ryzyka w zależności od klasyfikacji molekularnej</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Porównywanie guzów pierwotnych w różnym stadium naciekania ściany jelita</li> <li>• Porównywanie guzów pierwotnych w stadium zlokalizowanym i w stadium rozszanym choroby</li> <li>• Porównywanie guza pierwotnego z przerzutami</li> </ul>
Prognozowanie odpowiedzi na leczenie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Określanie odpowiedzi na leczenie w zależności od profilu genowego nowotworu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Porównywanie pod względem profili genowych pacjentów z dobrą odpowiedzią na leczenie z pacjentami o złej odpowiedzi na zastosowane leczenie</li> </ul>

jelita grubego. Zależną od stopnia zaawansowania nowotworu wg skali TNM, specyficzną ekspresję genów potwierdzono w kilku odrębnych badaniach [20,25,29,36,46].

W innym badaniu wykryto zestawy genów, których poziom ekspresji różnił się między prawidłową śluzówką jelita, a miejscowo zaawansowanym rakiem jelita grubego, między miejscowo zaawansowanym rakiem, a rakiem przerzutowym do węzłów chłonnych, wreszcie między rakiem z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych a rakiem z przerzutami odległymi [26].

W celu dokładniejszego określenia zmian genetycznych leżących u podstaw progresji nowotworu, porównano profile ekspresji genów guzów pierwotnych oraz guzów przerzutowych do narządów odległych [67]. Wykazano różnice ekspresji wielu genów zaangażowanych w procesy proliferacji, inwazji oraz adhezji komórkowej. Spośród tych genów gen *SPPI* białka osteopontyny wykazywał 10–20-krotnie większą ekspresję w ogniskach przerzutowych w wątrobie w porównaniu do prawidłowej śluzówki oraz gruczolaków [2].

Wykazano ponadto różnice ekspresji genów porównując raki prawej i lewej części okrężnicy, a także porównywano profile genowe polipów płaskich i ząbkowanych względem prawidłowego nabłonka jelitowego, sugerując różne mechanizmy molekularne leżące u podstaw tych zmian przedrakowych [27,34,35].

Mimo iż prowadzone badania nad określeniem profilu genowego zmian nowotworowych raka jelita grubego z użyciem techniki mikromacierzy dostarczają wielu nowych informacji na temat molekularnych podstaw procesu kancerogenezy, jak dotąd nie udało się jednoznacznie stworzyć panelu wiarygodnych biomarkerów, który mógłby być wykorzystany na szerszą skalę w praktyce klinicznej. Sytuacja ta może wynikać z różnych platform analizy genomu, jakich używano w tych badaniach, gdyż w jednych badaniach używano systemu GeneChip, a w innych

używano mikromacierzy cDNA oraz różnych metod pozyskiwania próbek tkankowych oraz różnych metod statystycznych użytych do opracowania danych.

#### 4.2. Badania nad przewidywaniem rokowania w raku jelita grubego

Badania nad określeniem profilu genowych w różnych stadiach zaawansowania raka jelita grubego, oprócz opisane go powyżej porównywania klas, mają na celu wyróżnienie grup pacjentów o złym przebiegu choroby. Podstawowe znaczenie ma wyodrębnienie grup chorych z różnym ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych, co bezpośrednio przekłada się na gorsze rokowanie u tych chorych. W 2004 r. opublikowano wyniki badania, w którym określono zestaw 194 genów ulegających różnej ekspresji w guzie pierwotnym w porównaniu do zmian przerzutowych i jednocześnie przyporządkowano chorych do grup o istotnie różnym odsetku 5-letnich przeżyć [12].

Przewidywanie nawrotu choroby jest istotnym zagadnieniem u pacjentów poddanych resekcji jelita grubego w stadium raka bez przerzutów do węzłów chłonnych (stadium B wg Dukesa), ponieważ rola adiuwantowej chemioterapii u tych chorych jest przedmiotem badań. Odsetek pięcioletnich przeżyć u chorych w stadium B choroby wynosi około 75%, co wskazuje na to, że większość chorych odpowiada pozytywnie wyłącznie na leczenie chirurgiczne. Jednak u około 40% tych chorych dojdzie do wznowy choroby w ciągu dalszego życia. Dlatego ważne byłoby określenie, która część z tej grupy pacjentów odniosłaby korzyści z uzupełniającej chemioterapii.

Badania przeprowadzone w 2004 r. przez zespół badaczy z Uniwersytetu w St. Louis, pozwoliły określić panel 23 genów, który z dużym prawdopodobieństwem, rzędu 78% pozwolił określić ryzyko nawrotu raka jelita grubego [61].

Wyniki badań nad określeniem profilu genowego nowotworu w stadium II i III raka jelita grubego (wg klasyfikacji

UICC/AJCC, stadium B i C w skali Dukesa) dały potencjalną szansę wyróżnienia grup chorych o dobrym i złym rokowaniu, w sposób bardziej wiarygodny niż tradycyjna klasyfikacja TNM. Zidentyfikowano panel 43 genów, za pomocą którego udało się z prawdopodobieństwem bliskim 90% przewidzieć okres 3-letniego przeżycia u chorych w stadiach II i III raka jelita grubego [24], natomiast z wykorzystaniem innego zestawu, wykorzystując profil 17 genów, wyróżniono spośród 137 chorych w stadium III choroby, dwie grupy o znacząco różnym okresie nawrotu choroby po zabiegu operacyjnym [6]. Niedawno opublikowane badania wskazały na wartość kliniczną testu, gotowego zestawu, służącego do analizy 7 wybranych genów – Oncotype DX® i dotyczyły analizy chorych w stadium II choroby [63].

Ciekawym badaniem okazała się analiza przeprowadzona przez Barriera i wsp., w której punktem wyjścia było założenie, iż między makroskopowo niezmienną śluzówką jelitową znajdującą się w bezpośrednim sąsiedztwie guza, a samym guzem zachodzą ściśle interakcje. Z tego względu ocenie poddano ekspresję 70 genów niezmienną nowotworowo śluzówki z tkanek otoczenia guza chorych po leczeniu operacyjnym. Wykazano, że różny poziom ekspresji tych genów wiązał się z 83% ryzykiem nawrotu choroby po zabiegu operacyjnym [10,11]

Podjęto także próbę wyodrębnienia grup pacjentów o różnym rokowaniu wśród chorych w najbardziej zaawansowanym stadium choroby (D wg Dukesa) i zdefiniowano 8 genów, których ekspresja koreluje z okresem przeżycia tych chorych [15].

Badania ostatnich lat koncentrują się na określeniu genów ściśle związanych z potencjałem metastatycznym komórek guza pierwotnego. Analizie poddano próbki ogniska pierwotnego chorych, u których nie obserwowano nawrotu choroby w okresie pięcioletniej obserwacji. W drugiej grupie zbadaano tkankę nowotworową ogniska pierwotnego pacjentów z rozsiewem choroby do wątroby. Wyniki analizy pozwoliły wyróżnić zestaw 29 różnych genów o istotnie różnym poziomie ekspresji, wskazując na ich potencjalną rolę jako markerów przerzutowania [21]. Inne badania dały podstawy aby sądzić, że potencjał metastatyczny jest zakodowany w guzie pierwotnym i może być określony metodą profilowania genowego. Analizie poddano próbki guzów pierwotnych pacjentów w różnych stadiach choroby (bez i z przerzutami odległymi) oraz próbki zmian przerzutowych w wątrobie. Wyróżniono panel 119 genów i wyodrębniono dwie klasy nowotworu: bez potencjalnej zdolności oraz z potencjalną zdolnością do utworzenia przerzutów odległych [66].

#### 4.3. Badania nad określaniem odpowiedzi na leczenie

Możliwość zastosowania techniki mikromacierzy w określaniu grup pacjentów o różnych stopniach odpowiedzi na leczenie pozostaje niepewna ze względu na niewielką dotychczas liczbę przeprowadzonych w tym zakresie badań. Większość z badań, które zostały opublikowane, przeprowadzono na modelowych liniach komórkowych zawierających profil genowy „dobrego” i „złego” rokowania (tzw. „przewidywanie klas”) [52].

Mariadason i wsp. przebadali 30 różnych linii komórkowych raka jelita grubego i wyodrębnili panel 420 genów zaangażowanych w procesy replikacji i naprawy DNA,

których poziom ekspresji korelował z odpowiedzią na powszechnie stosowany w terapii raka jelita grubego 5-fluorouracyl. Wartość predykcyjna wybranych 50 genów, których poziom ekspresji najsilniej korelował z odpowiedzią na leczenie, okazała się ważniejszym czynnikiem niż powszechnie stosowane w raku jelita grubego markery predykcyjne, takie jak syntetaza tymidylowa, fosforylaza tymidynowa czy białko p53. W tym samym badaniu wykazano także związek między poziomem ekspresji 149 genów a odpowiedzią na inny szeroko stosowany w terapii raka jelita grubego chemioterapeutyk – irinotekan [44].

W niedawno opublikowanej pracy, wykazano ścisłą zależność między opornością na stosowany 5-fluorouracyl a poziomem ekspresji genów RAPGEF2, PTRF i SART1 zmian przerzutowych wątroby w przebiegu raka jelita grubego [3]. Podjęto także próbę określenia profilu genowego komórek nowotworowych o większej wrażliwości na inny powszechnie stosowany w schematach chemioterapii w raku jelita grubego związek – oksaliplatinę. Wyniki badań pozwoliły wyróżnić panel 80 genów, których poziom ekspresji wyraźnie korelował z efektem apoptotycznym pochodnej platyny na komórki nowotworowe [7].

Opublikowane wyniki badań, przeprowadzonych na tkankach guza pochodzących od pacjentów z rakiem jelita grubego, dostarczyły pewnych informacji na temat przewidywanej odpowiedzi na zastosowane leczenie zależne od poziomu ekspresji wybranego panelu genów. W jednym z nich przeanalizowano próbki 21 guzów pierwotnych chorych w zaawansowanym stadium choroby i na podstawie różnic ekspresji 14 genów, z prawdopodobieństwem równym 95%, chorych podzielono na grupę o złej i dobrej odpowiedzi na zastosowaną chemioterapię z użyciem leukoworony, fluorouracylu i irinotekanu [22].

Inna analiza dotyczyła próby określenia profilu genowego zmian przerzutowych w wątrobie i powiązania tej cechy z wrażliwością na zastosowany lek, monoklonalne chimeryczne przeciwciało przeciw receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Badaniu podlegały próbki uzyskane z ognisk przerzutowych od 25 chorych z dobrą odpowiedzią na lek i próbki od 50 chorych o złej odpowiedzi klinicznej na stosowane przeciwciało monoklonalne. Spośród 629 przebadanych genów za markery dobrej odpowiedzi na leczenie uznano geny epireguliny i amfireguliny czyli receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) [32].

Próbę określenia profilu genowego i wskazania jako potencjalnego czynnika predykcyjnego odpowiedzi na leczenie podjęto także w grupie pacjentów z zaawansowanym rakiem jelita grubego poddawanych chemioterapii przedoperacyjnej. Wyodrębniono zestawy genów, których poziom ekspresji wyraźnie różnicował grupę pacjentów o dobrej i złej odpowiedzi na chemioterapię neoadiuwantową [33,51].

W ostatnim czasie przeprowadzono badania linii komórkowych, wskazując geny szlaku kinaz serynowo/treoninowych (MAPK) jako potencjalne czynniki warunkujące wrażliwość na radiochemioterapię u chorych na raka jelita grubego [56].

W stadium badań pozostaje kilka substancji o potencjalnych wartościach terapeutycznych w raku jelita grubego,

Tabela 2. Zastosowanie mikromacierzy w tworzeniu profili ekspresyjnych w raku jelita grubego

Zakres badań/Przykłady badanych genów	Piśmiennictwo
<b>Badania molekularnych podstaw procesu kancerogenezy w raku jelita grubego</b>	
T63591, R85464, T52185, T47144, T72938, T72938, H77302*	[4]
U22055, M61832, M36821, L29254, X54942, U03749, L11708, H43887, X86693, X73502*	[4]
M69043, U26326, X73502, D10511, U01691, U16306, X64177*	[25]
PLAC8, MAGEA4, MT1R, MAOA, MT1H, FXYD3, ADFP, SLC6A8, DDIT3, PDK1	[24,36]
HOXA9, AKR1C2, AKR1C1, CFTR, FLJ21562	[29]
BCHE, TRIM14, HCG4P6, EST, FSHR, PRPH, UBOX5, TBXA2R, NDUFA8, DHX15	[20]
MAP2, N-WASP, NCAML1, S3RP, CALTRACTIN, EST	[67]
CDH3, MMP7, FOXA, KLK10, LGR5, MT1M, CD177, TPH1	[35]
<b>Badania nad przewidywaniem rokowania</b>	
ATP5C1, BCKDK, CABC1, CKMT2, COX5B, COX6B, COX7A2, COX7A2L, COX7C, HSPA9B, LRIG1, MDH1, NDUFA1, NDUFA4	[12]
Cdh17, FABP1, CDX1, CDX2, MUCDHL	[16,61]
AA488652, AA704270, AA706226, AA777892, AA969508, AI203139, AI002566, AA045308*	[24]
RHOA	[6,7,44]
ITGB2, MRPS11, NPR1, TXNL2, PHF10, PRSS8, KCNK3, JAK3	[15]
Hs. 100090, Hs. 342780, Hs. 318404, Hs. 193482, Hs. 112396, Hs. 295448, Hs. 284142**	[21]
MAP3K4, ERK1	[66]
<b>Badania nad określaniem odpowiedzi na leczenie</b>	
LGALS8, SERPINE2, ANGPTL2, ATP50, EML2, DRD5	[22]
EREG, AREG, CD73, DUSP4, and PHLDA1	[32]
CLMN, FKBP1B, CPNE3, LIV-1, FLNB, PAK1, MLN, ITPK1, GUCY1B3, MUC5B	[56]
PLCE1, GLDC, EPS15, SULT1A2, RAD23B, ZFP276, MCF2L	[33]
ETS2, SLC35E1, CASP1	[51]

\* – nr sekwencji EST (otwarta ramka odczytu) w bazie GeneBank; \*\* - nr EST wg bazy Unigene.

głównie przeciwciał skierowanych przeciwko receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu. Określenie czynników predykcyjnych, w tym określanie profilu genowego wrazliwości na lek, pozostaje w sferze badań [55].

## 5. Dyskusja

Poznanie genetycznych podstaw procesu kancerogenezy oraz identyfikacja genowych sygnatur o wartości prognostycznej i predykcyjnej stanowią główny cel badań w raku jelita grubego z wykorzystaniem techniki mikromacierzy. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują na potencjalną wartość kliniczną genowych sygnatur oznaczanych techniką mikrosiatek. Dzięki ich zastosowaniu szerzej zostały opisane molekularne podstawy procesu kancerogenezy, wskazano na sygnatury genowe związane z lepszym rokowaniem, a w kilku badaniach wykazano korelację ekspresji swoistych genów z lepszą odpowiedzią na zastosowane leczenie. Określanie profilu genowego komórek raka techniką mikromacierzy może być użytecznym narzędziem

w wyodrębnianiu grup pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z zastosowania poszczególnych schematów leczenia.

Celowym wydaje się głębsze poznanie sygnatur genowych związanych z rozwojem przerzutów nowotworowych do wątroby, ponieważ 95% zgonów z powodu raka jelita grubego wiąże się właśnie z rozwojem zmian metastatycznych. Pomimo wskazania genów o potencjale metastatycznym, kodujących białka zaangażowane w procesy adhezji i migracji komórek oraz angiogenezy, pełna sygnatura genowa zmian przerzutowych nie została jeszcze zdefiniowana.

Szczególnym wyzwaniem dla współczesnej onkologii jest odkrycie cząsteczek, będących punktem uchwytu nowych terapii celowanych. Badania molekularne z użyciem techniki mikrosiatek wskazały pewne geny zaangażowane w procesy proliferacji i różnicowania komórkowego. Białkowe produkty tych genów mogłyby stanowić cel nowych leków przeciwnowotworowych, jednak wymaga to dalszej analizy na poziomie proteomiki.

Przeniesienie tych obiecujących wyników do codziennej praktyki klinicznej jest jeszcze dość odległą perspektywą z kilku względów. Po pierwsze, wyniki równoległych badań nie pokrywają się, najprawdopodobniej w związku z użyciem różnych platform badawczych (mikromacierze cDNA i oligonukleotydy) i różnych metod analizy statystycznej. Po drugie, brakuje dużych randomizowanych badań przeprowadzonych na wystarczająco dużej grupie chorych, a takie są niezbędne do wyeliminowania wyników

skrajnych oraz do całościowego spojrzenia na dany problem kliniczny. Wreszcie niezbędne jest wyselekcjonowanie spośród wielu przesłanek tylko tych informacji, które będą miały największy potencjał zastosowania w codziennej praktyce klinicznej. Spośród dużych zbiorów genów powinny zostać wybrane mniejsze, o szczególnym znaczeniu predykcyjnym i rokowniczym, a następnie retrospektywnie lub prospektywnie sprawdzone z użyciem konwencjonalnej analizy ilościowej, np. QPCR.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Agarwal A., Koppstein D., Rozowsky J., Sboner A., Habegger L., Hillier L.W., Sasidharan R., Reinke V., Waterston R.H., Gerstein M.: Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC Genomics*, 2010; 11: 383
- [2] Agrawal D., Chen T., Irby R., Quackenbush J., Chambers A.F., Szabo M., Cantor A., Coppola D., Yeatman T.J.: Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002; 94: 513–521
- [3] Allen W.L., Stevenson L., Coyle V.M., Jithesh P.V., Prutski I., Carson G., Gordon M.A., Lenz H.J., Van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G.: A systems biology approach identifies SART1 as a novel determinant of both 5-fluorouracil and SN38 drug resistance in colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2011; 11: 119–131
- [4] Alon U., Barkai N., Notterman D.A., Gish K., Ybarra S., Mack D., Levine A.J.: Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 6745–6750
- [5] Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977; 74: 5350–5354
- [6] Arango D., Laiho P., Kokko A., Alhopuro P., Sammalkorpi H., Salovaara R., Nicorici D., Hautaniemi S., Alazzouzi H., Mecklin J.P., Järvinen H., Hemminki A., Astola J., Schwartz S. Jr, Aaltonen L.A.: Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2005; 129: 874–884
- [7] Arango D., Wilson A.J., Shi Q., Corner G.A., Arañes M.J., Nicholas C., Lesser M., Mariadason J.M., Augenlicht L.H.: Molecular mechanisms of action and response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer*, 2004; 91: 1931–1946
- [8] Auer P.L., Doerge R.W.: Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics*, 2010, 185: 405–416
- [9] Bacher U., Kohlmann A., Haferlach C., Haferlach T.: Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia (AML). *Best Practice Res. Clin. Haematol.*, 2009; 22: 169–180
- [10] Barrier A., Lemoine A., Boelle P.Y., Tse C., Brault D., Chiappini F., Breittschneider J., Lacaine F., Houry S., Huguier M., Van der Laan M.J., Speed T., Debuire B., Flahault A., Dudoit S.: Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene*, 2005; 24: 6155–6164
- [11] Barrier A., Roser F., Boelle P.Y., Franc B., Tse C., Brault D., Lacaine F., Houry S., Callard P., Penna C., Debuire B., Flahault A., Dudoit S., Lemoine A.: Prognosis of stage II colon cancer by nonneoplastic mucosa gene expression profiling. *Oncogene*, 2007; 26: 2642–2648
- [12] Bertucci F., Salas S., Eysteries S., Nasser V., Finetti P., Ginestier C., Charafe-Jauffret E., Llorid B., Bachelart L., Montfort J., Victorero G., Viret F., Ollendorff V., Fert V., Giovannini M., Delperio J.R., Nguyen C., Viens P., Monges G., Birnbaum D., Houlgatte R.: Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histological parameters. *Oncogene*, 2004; 23: 1377–1391
- [13] Bloom J.S., Khan Z., Kruglyak L., Singh M., Caudy A.A.: Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. *BMC Genomics*, 2009; 10: 221
- [14] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 2008; 455: 1061–1068
- [15] Cavalieri D., Dolara P., Mini E., Luceri C., Castagnini C., Toti S., Maciag K., De Filippo C., Nobili S., Morganti M., Napoli C., Tonini G., Baccini M., Biggeri A., Tonelli F., Valanzano R., Orlando C., Gelmini S., Cianchi F., Messerini L., Luzzatto L.: Analysis of gene expression profiles reveals novel correlations with the clinical course of colorectal cancer. *Oncol. Res.*, 2007; 16: 535–548
- [16] Chen L., Xuan J., Gu J., Wang Y., Zhang Z., Wang T.L., Shih I.M.: Integrative network analysis to identify aberrant pathway networks in ovarian cancer. *Pac. Symp. Biocomput.*, 2012: 31–42
- [17] Cheng W.Y., Kandel J.J., Yamashiro D.J., Canoll P., Anastassiou D.: A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS One*, 2012; 7: e34705
- [18] Cooper L.A., Gutman D.A., Chisolm C., Appin C., Kong J., Rong Y., Kurc T., Van Meir E.G., Saltz J.H., Moreno C.S., Brat D.J.: The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *Am. J. Pathol.*, 2012; 180: 2108–2119
- [19] Cortese R., Hartmann O., Berlin K., Eckhardt F.: Correlative gene expression and DNA methylation development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008; 40: 1494–1508
- [20] Croner R.S., Förtsch T., Brückl W.M., Rödel F., Rödel C., Papadopoulos T., Brabletz T., Kirchner T., Sachs M., Behrens J., Klein-Hitpass L., Stürzl M., Hohenberger W., Lausen B.: Molecular signature for lymphatic metastasis in colorectal carcinomas. *Ann. Surg.*, 2008; 247: 803–810
- [21] D'Arrigo A., Belluco C., Ambrosi A., Digito M., Esposito G., Bertola A., Fabris M., Nofrate V., Mammato E., Leon A., Nitti D., Lise M.: Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2005; 115: 256–262
- [22] Del Rio M., Molina F., Bascoul-Mollevis C., Copois V., Bibeau F., Chalbos P., Bareil C., Kramar A., Salvetat N., Fralson C., Conseiller E., Granci V., Leblanc B., Pau B., Martineau P., Ychou M.: Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 773–780
- [23] Durand S., Ferraro-Peyret C., Selmi-Ruby S., Paulin C., Borson-Chazot F., Rousset B.A.: Evaluation of gene expression profiles in thyroid nodule biopsy material to diagnose thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008; 93: 1195–1202
- [24] Eschrich S., Yang I., Bloom G., Kwong K.Y., Boulware D., Cantor A., Coppola D., Kruhoffer M., Aaltonen L., Orntoft T.F., Quackenbush J., Yeatman T.J.: Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 3526–3535
- [25] Frederiksen C.M., Knudsen S., Laurberg S., Ørntoft T.F.: Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2003; 129: 263–271
- [26] Friederichs J., Rosenberg R., Mages J., Janssen K.P., Maeckl C., Nekarda H., Holzmann B., Siewert J.R.: Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression. *Int. J. Colorectal Dis.*, 2005; 20: 391–402
- [27] Galamb O., Spisák S., Sipos F., Tóth K., Solymosi N., Wichmann B., Krenács T., Valcz G., Tulassay Z., Molnár B.: Reversal of gene expression changes in the colorectal normal–adenoma pathway by NS398 selective COX2 inhibitor. *Br. J. Cancer.*, 2010; 16: 102: 765–773
- [28] Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J.R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., Lander E.S.: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999; 286: 531–537
- [29] Groene J., Mansmann U., Meister R., Staub E., Roepcke S., Heinze M., Klamann I., Brümmerdorf T., Hermann K., Loddenkemper C., Pilarsky K., Mann B., Adams H.P., Buhr H.J., Rosenthal A.: Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. *Int. J. Cancer*, 2006; 119: 1829–1836
- [30] Iyer V.R., Eisen M.B., Ross D.T., Schuler G., Moore T., Lee J.C., Trent J.M., Staudt L.M., Hudson J. Jr, Boguski M.S., Lashkari D., Shalon D., Botstein D., Brown P.O.: The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 1999; 283: 83–87



- [31] Jarzab B., Gubała E., Lange D.: Mikromacierze DNA i profil ekspresji genów raka brodawkowatego tarczycy. *Endokrynol. Polska*, 2005; 56: 293–301
- [32] Khambata-Ford S., Garrett C.R., Meropol N.J., Basik M., Harbison C.T., Wu S., Wong T.W., Huang X., Takimoto C.H., Godwin A.K., Tan B.R., Krishnamurthi S.S., Burris H.A. III, Poplin E.A., Hidalgo M., Baselga J., Clark E.A., Mauro D.J.: Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 3230–3237
- [33] Kim I.J., Lim S.B., Kang H.C., Chang H.J., Ahn S.A., Park H.W., Jang S.G., Park J.H., Kim D.Y., Jung K.H., Choi H.S., Jeong S.Y., Sohn D.K., Kim D.W., Park J.G.: Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis. Colon Rectum*, 2007; 50: 1342–1353
- [34] Kim K., Park U., Wang J., Lee J., Park S., Kim S., Choi D., Kim C., Park J.: Gene profiling of colonic serrated adenomas by using oligonucleotide microarray. *Int. J. Colorectal Dis.*, 2008; 23: 569–580
- [35] Kita H., Hikichi Y., Hikami K., Tsuneyama K., Cui Z.G., Osawa H., Ohnishi H., Mutoh H., Hoshino H., Bowlus C.L., Yamamoto H., Sugano K.: Differential gene expression between flat adenoma and normal mucosa in the colon in a microarray analysis. *J. Gastroenterol.*, 2006; 41: 1053–1063
- [36] Kwong K.Y., Bloom G.C., Yang I., Boulware D., Coppola D., Haseman J., Chen E., McGrath A., Makusky A.J., Taylor J., Steiner S., Zhou J., Yeatman T.J., Quackenbush J.: Synchronous global assessment of gene and protein expression in colorectal cancer progression. *Genomics*, 2005; 86: 142–158
- [37] Lennon G.G., Levrach H.: Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet.*, 1991; 7: 314–317
- [38] Liang P., Pardee A.B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992; 257: 967–971
- [39] Liu S., Lin L., Jiang P., Wang D., Xing Y.: A comparison of RNA-Seq and high-density exon array for detecting differential gene expression between closely related species. *Nucleic Acids Res.*, 2010; 39: 578–588
- [40] Lowe A.W., Olsen M., Hao Y., Lee S.P., Taek Lee K., Chen X., van de Rijn M., Brown P.O.: Gene expression patterns in pancreatic tumors, cells and tissues. *PLoS One*, 2007; 28: e323
- [41] Mace M.L. Jr, Montagu J., Rose D.S., McGuinness G.: Novel microarray printing and detection technologies. *Microarray Biochip Technology*. BioTechniques Books, Natick MA., 2000: 39–64
- [42] Malone J.H., Oliver B.: Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.*, 2011; 9: 34
- [43] Mankoo P.K., Shen R., Schultz N., Levine D.A., Sander C.: Time to recurrence and survival in serous ovarian tumors predicted from integrated genomic profiles. *PLoS One*, 2011; 6: e24709
- [44] Mariadason J.M., Arango D., Shi Q., Wilson A.J., Corner G.A., Nicholas C., Aranes M.J., Lesser M., Schwartz E.L., Augenlicht L.H.: Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer Res.*, 2003; 63: 8791–8812
- [45] Markowski J., Oczko-Wojciechowska M., Gierek T., Jarzab M., Paluch J., Kowalska M., Wygoda Z., Pfeifer A., Tyszkiewicz T., Jarzab B., Niedzielska I., Borgiel-Marek H.: Gene expression profile analysis in laryngeal cancer by high-density oligonucleotide microarrays. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2009; 60(Suppl.1): 57–63
- [46] Mazurek U., Owczarek A., Nowakowska-Zajdel E., Wierzgon J., Grochowska-Niedworok E., Kokot T., Muc-Wierzgon M.: Statistical analysis of differential gene expression in colorectal cancer using CLEAR-test. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2011; 25: 279–283
- [47] Mougeot Jean-Luc C., Bahrani-Mostafavi Z., Vachris Judy C., McKinney Kimberly Q., Gurlov S., Zhang J., Naumann R.W., Higgins R.V., Hall J.B.: Gene expression profiling of ovarian tissues for determination of molecular pathways reflective of tumorigenesis. *J. Mol. Biol.*, 2006; 358: 310–329
- [48] Notterman D.A., Alon U., Sierk A.J., Levine A.J.: Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.*, 2001; 61: 3124–3130
- [49] Pawliczak R., Kowalski M.: Badanie ekspresji genów metodą mikroarray – perspektywy wykorzystania w medycynie. *Alergia Astma Immunologia*, 2001; 6: 77–83
- [50] Reimers M.: Making informed choices about microarray data analysis. *PLoS Comput. Biol.*, 2010; 6: e1000786
- [51] Rimkus C., Friederichs J., Boulesteix A.L., Theisen J., Mages J., Becker K., Nekarda H., Rosenberg R., Janssen K.P., Siewert J.R.: Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008; 6: 53–61
- [52] Shimizu D., Ishikawa T., Ichikawa Y., Togo S., Hayasizaki Y., Okazaki Y., Danenberg P.V., Shimada H.: Prediction of chemosensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil by gene expression profiling with cDNA microarrays. *Int. J. Oncol.*, 2005; 27: 371–376
- [53] Sørensen K.D., Orntoft T.F.: Discovery of prostate cancer biomarkers by microarray gene expression profiling. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2010; 10: 49–64
- [54] Sørlie T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L.: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 10869–10874
- [55] Spano J.P., Milano G., Vignot S., Khayat D.: Potential predictive markers of response to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2008; 66: 21–30
- [56] Spitzner M., Emons G., Kramer F., Gaedcke J., Rave-Fränk M., Scharf J.G., Burfeind P., Becker H., Beissbarth T., Ghadimi B.M., Ried T., Grade M.: A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2010; 15: 78: 1184–1192
- [57] Srivastava M., Eidelman O., Pollard H.B.: Pharmacogenomics of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and the cystic fibrosis drug CPX using genome microarray analysis. *Mol. Med.*, 1999; 5: 753–767
- [58] Tillib S.V., Mirzabekov A.D.: Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001; 12: 53–58
- [59] Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.: Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995; 270: 484–487
- [60] Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., Bos J.L.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 1988; 319: 525–532
- [61] Wang Y., Jatko T., Zhang Y., Mutch M.G., Talantov D., Jiang J., McLeod H.L., Atkins D.: Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Duke's B colon cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 1564–1571
- [62] Warrington J.A., Dee S.: Large-scale genomic analysis using Affymetrix GenechipR probe arrays. *Microarray Biochip Technology*. M. Schena. Natick, MA, Eaton Publishing, 2000: 119–148
- [63] Webber E.M., Lin J.S., Whitlock E.P.: Oncotype DX tumor gene expression profiling in stage II colon cancer. Application: prognostic, risk prediction. *PLoS Curr.*, 2010; 2: RRN1177
- [64] Wiltshire S., O'Malley S., Lambert J., Kukanskis K., Edgar D., Kingsmore S.F., Schweitzer B.: Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin. Chem.*, 2000; 46: 1990–1993
- [65] Worley J., Bechtol K., Penn S.: A system approach to fabricating and analyzing DNA microarrays. *Microarray Biochip Technology*. BioTechniques Books, Natick, MA, 2000: 65–86
- [66] Yamasaki M., Takemasa I., Komori T., Watanabe S., Sekimoto M., Doki Y., Matsubara K., Monden M.: The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 2007; 30: 129–138
- [67] Yanagawa R., Furukawa Y., Tsunoda T., Kitahara O., Kameyama M., Murata K., Ishikawa O., Nakamura Y.: Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia*, 2001; 5: 395–401
- [68] Yoshihara K., Tsunoda T., Shigemizu D., Fujiwara H., Hatae M., Fujiwara H., Masuzaki H., Katabuchi H., Kawakami Y., Okamoto A., Nogawa, Matsumura N., Udagawa Y., Saito T., Itamochi H., Takano M., Miyagi E., Sudo T., Ushijima K., Iwase H., Seki H., Terao Y., Enomoto T., Mikami M., Akazawa K., Tsuda H., Moriya T., Tajima A., Inoue I., Tanaka K.: Japanese Serous Ovarian Cancer Study Group. High-risk ovarian cancer based on 126-gene expression signature is uniquely characterized by downregulation of antigen presentation pathway. *Clin. Cancer Res.*, 2012; 18: 1374–1385

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.