

Rola badań molekularnych we wczesnym wykrywaniu raka płuc

EWA JASSEM

Katedra i Klinika Chorób Płuc i Gruźlicy Akademii Medycznej, ul. Dębinki 6, 80-211 Gdańsk

Poszczególnym etapom prowadzącym do rozwoju raka płuca towarzyszy szereg zaburzeń genetycznych. Mutacje występują najczęściej w obrębie protoonkogenów (np. *ras*, *myc*) i genów supresorowych (*p53*, *Rb1*). W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy w tej dziedzinie, a także perspektywy wykorzystania badań molekularnych w wykrywaniu zmian przednowotworowych i w najwcześniejszych fazach rozwoju raka płuca. Ponadto omówiono potencjalne możliwości zastosowania tych testów w planowaniu działań profilaktycznych. Wydaje się, że szybki rozwój technik molekularnych stwarza nadzieję na ich praktyczne zastosowanie już w najbliższej przyszłości.

Wprowadzenie

Rak płuca jest schorzeniem o agresywnym przebiegu. W Polsce liczba zgonów z powodu tego nowotworu jest niemal równa liczbie zachorowań [1]. Jest to przede wszystkim wynikiem późnego rozpoznawania choroby i małej skuteczności leczenia. U większości chorych rak płuca przez długi czas przebiega bezobjawowo, ujawniając się w późnym, nieoperacyjnym stadium. Uważa się, że proces prowadzący ostatecznie do rozwoju klinicznie jawnego guza trwa w nabłonku oskrzelowym co najmniej kilkanaście lat. Od wielu lat podejmowane są wysiłki zmierzające do rozpoznawania choroby w jej wczesnym, a nawet przedklinicznym okresie, w którym leczenie mogłoby okazać się bardziej skuteczne. Celowi temu służą między innymi masowe badania przesiewowe prowadzone wśród osób uznawanych za zdrowe. W odniesieniu do chorych na raka płuca największe nadzieje budziły badania przesiewowe z zastosowaniem okresowych zdjęć radiologicznych klatki piersiowej i/lub cytologicznych badań płwociny. Wyniki prospektywnych, porównawczych badań obejmujących duże grupy ludzi wykazały jednak, że przydatność tych testów jest niewielka, a w szczególności nie mają one wpływu na zmniejszenie umieralności z powodu raka płuca [2-4]. W jednym z największych badań, przeprowadzonym w latach 80. przez Mayo Clinic i obejmującym 4593 osoby, wskaźnik zgonów w populacji objętej badaniami przesiewowymi wyniósł 3,1, podczas gdy w populacji kontrolnej - 3,0 na 1000 osób/rok [5].

W ostatnich dwóch dekadach nastąpił szybki rozwój badań molekularnych pozwalających lepiej zrozumieć mechanizmy kancerogenezy. Wśród potencjalnie przydatnych w praktyce klinicznej zastosowań tych metod wymienia się między innymi stworzenie możliwości wykrywania zaburzeń genetycznych towarzyszących stanom przedrakowym i przedklinicznym

stadium nowotworu. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie dotychczasowych osiągnięć w tej dziedzinie oraz omówienie perspektyw dalszego rozwoju.

Rola mechanizmów genetycznych w rozwoju raka płuca

Kancerogeneza jest wielostopniowym i złożonym procesem, na który składa się szereg zaburzeń o charakterze genetycznym i epigenetycznym. Na skutek działania czynników rakotwórczych, z których w raku płuca najlepiej poznany jest dym tytoniowy, dochodzi do mutacji w obrębie genów istotnych dla podziałów i różnicowania się komórek. W przypadku trwania narażenia na mutagenne czynniki liczba tych zaburzeń rośnie. Są one przekazywane komórkom potomnym, prowadząc do ich coraz większej autonomii.

Mutacje genowe zachodzą najczęściej w obrębie protoonkogenów oraz genów supresorowych. Geny pierwszej grupy (tabela I), z reguły dominujące, w prawidłowych warunkach kodują białka odpowiedzialne za przekazywanie z powierzchni komórki do jej jądra sygnałów inicjujących oraz pobudzających podziały. Funkcję tę spełniają między innymi geny z rodziny *ras*, *myc* i *HER-2/neu*. W przypadku mutacji w obrębie tych genów dochodzi do stałej aktywacji białek przez nie kodowanych. Zmusza to komórkę do ciągłych, niekontrolowanych podziałów. Drugą grupę (tabela II) tworzą recesywne geny hamujące cykl podziałowy komórek, w których doszło do uszkodzeń nici DNA. Zahamowanie cyklu umożliwia naprawę uszkodzonych fragmentów, dzięki czemu kolejne podziały odbywają się wyłącznie w komórkach zawierających prawidłowy materiał genetyczny. W przypadku, gdy stopień uszkodzenia nici DNA nie pozwala na jego naprawę, geny supresorowe prowadzą komórkę do samobójczej śmierci (apoptozy). Oba wymienione mechanizmy zapobiegają

Tabela I. Protoonkogeny (dominujące geny proliferacyjne)

Gen	Działanie	Rodzaj uszkodzeń	Zaburzone działanie
K-ras, H-ras, N-ras	Przekazywanie sygnałów o podziale z receptorów na powierzchni komórki do jądra komórkowego	Punktowe mutacje, najczęściej w kodonie 12, 13 i 61	Stałe przekazywanie sygnałów o podziale, niezależnie od informacji z receptorów
N-myc, L-myc	Aktywacja genów odpowiedzialnych za wzrost komórki (po stymulacji czynnikami wzrostowymi z powierzchni komórki)	Amplifikacja	Stała aktywacja, niezależna od sygnałów z receptorów komórkowych
Bcl-2	Hamowanie apoptozy, samozniszczenie komórki	Nadmierna ekspresja białka	Zwiększone hamowanie apoptozy
HER-2/neu	Kodowanie białka receptora wzrostu - Erb-B2	Nadmierna ekspresja receptora	Stałe wysyłanie sygnałów o potrzebie podziału komórkowego

Tabela II. Recesywne geny supresorowe

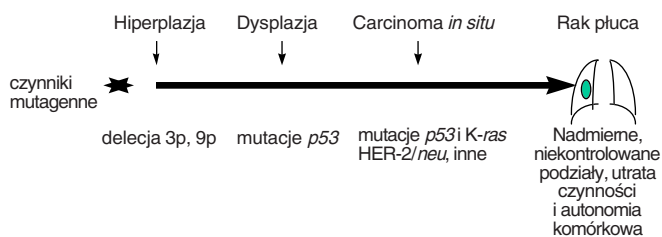
Gen	Lokalizacja	Działanie	Rodzaj uszkodzeń	Zaburzone działanie
p53	17p13	Hamowanie cyklu podziałowego pomiędzy fazą G1 i M, kierowanie komórki na drogę apoptozy	Delecja (utrata) jednej alleli i mutacja drugiej	Zniesienie działania
Rb1	13q14	Hamowanie cyklu podziałowego pomiędzy fazą G1 i M	Delecja jednej alleli i przebudowa struktury drugiej	Zniesienie działania
Nieznany	3p	Działanie dotychczas nieznane	Przypuszczalnie jak w poznanych genach supresorowych	Najpewniej zniesione działanie supresorowe
Nieznany	9p	Działanie dotychczas nieznane	Przypuszczalnie jak w poznanych genach supresorowych	Najpewniej zniesione działanie supresorowe

przekazywaniu zaburzeń genetycznych komórkom potomnym. Mutacje w obrębie genów supresorowych mogą ponadto prowadzić do „nieśmiertelności” komórki, związanej z zahamowaniem apoptozy. W ostatnich latach podkreśla się także rolę genów zdolnych do rozpoznawania uszkodzeń w obrębie nici DNA oraz genów naprawczych, np. grupy genów GADD-45 (ang. *growth arrest and DNA damage*).

Zaburzenia genetyczne towarzyszące kolejnym fazom rozwoju raka płuca

Pierwszą fazą w naturalnym rozwoju nowotworu złośliwego jest inicjacja (zapoczątkowanie). Morfologicznym przejawem tej fazy mogą być tzw. stany przedrakowe. Zalicza się do nich hiperplazję (powiększenie masy tkanki na skutek zwiększenia liczby komórek), metaplazję (w przypadku drzewa oskrzelowego - zastępowanie nabłonka wielowarstwowego walcowatego przez nabłonek płaski) i dysplazję (nieprawidłowości w budowie tkanki). Dotychczasowe poszukiwania pozwoliły na ustalenie obecności „pól kancerogenezy” (ang. *fields cancerisation*), zwłaszcza u długoletnich palaczy papierosów. Są to z reguły mnogie, ogniskowe zmiany dysplastyczne w nabłonku oskrzelowym, w których często stwierdza się mutacje genowe. Próby ustalenia kolejności „zdarzeń” genetycznych w rozwoju raka płuca wykazały, że w fazie hiperplazji i metaplazji najczęściej obserwuje się delecje (utrata) w chromosomach 3p i 9p. Uważa się, że w chromosomach tych znajdują się nieznane dotychczas geny supresorowe, mające istotne znaczenie

w początkowej fazie kancerogenezy. W zmianach dysplastycznych widoczne są dodatkowo mutacje w obrębie genu *p53*, natomiast w fazie raka przedinwazyjnego (*in situ*) obserwuje się także mutacje genu *Rb1*, *K-ras*, *myc* i *HER-2/neu*. Rak inwazyjny charakteryzuje się obecnością wielu mutacji, które prowadzą do całkowitego zaburzenia działania biochemicznych szlaków istotnych dla życia komórki (rycina 1).



Ryc. 1. Zaburzenia genetyczne towarzyszące kolejnym fazom rozwoju raka płuca

Badania porównujące występowanie delecji w chromosomie 3p i mutacji genu *p53* wykazały występowanie pierwszego typu zaburzeń przede wszystkim w ogniskach metaplazji, a drugiego - w ogniskach dysplazji i raka *in situ*. [6]. Stwierdzono ponadto, że istnieje związek pomiędzy zaawansowaniem zmian morfologicznych w oskrzelach w kolejnych fazach rozwoju raka płuca a nadmierną ekspresją genu *p53*. Wyraża się to obecnością nieprawidłowego białka *p53*, które można wykryć w tkankach przy użyciu metod immunohistochemicznych (tabela III) [7, 8]. W innym badaniu zwiększoną ekspresję genu *p53* stwierdzono

odpowiednio u 29%, 50% i 60% chorych z I, II, i III stopniem zaawansowania dysplazji nabłonka oskrzelowego [9]. Dodatkowo wykazano istotny związek pomiędzy zwiększoną ekspresją genu a ryzykiem rozwoju raka płuca - w grupie chorych z dysplazją nabłonkową III stopnia i zwiększoną ekspresją genu *p53* ryzyko to wynosiło 91%.

Tabela III. Porównanie ekspresji genu *p53* w różnych stadiach rozwoju raka płuca (wg Bennetta W.P. i wsp.) [7]

Stadium rozwoju raka płuca	Odsetek dodatnich badań
Prawidłowy nabłonek	0
Metaplazja	6,7
Łagodna dysplazja	29,5
Umiarkowana dysplazja	26,9
Znaczna dysplazja	59,7
Rak płuca <i>in situ</i>	58,5
Rak płuca mikroinwazyjny	67,5
Rak płuca inwazyjny	79,5

Perspektywy klinicznego zastosowania badań molekularnych

Materiał do badań molekularnych mających na celu wczesne wykrywanie raka płuca mogłaby stanowić płwocina, a w wypadku grup o szczególnie wysokim ryzyku zachorowania (np. długoletni palacze tytoniu z jednoczesnym narażeniem zawodowym) - także popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe lub wycinki ze śluzówki drzewa oskrzelowego pobrane drogą bronchofiberoskopii. W jednej z analiz, obejmującej 108 nałogowych palaczy papierosów, wykazano obecność mutacji genu *p53* u 32% badanych [10]; podobny odsetek mutacji stwierdzono u pracowników kopalni uranu [11].

Niektóre badania wskazują, że testy molekularne mogą być także przydatne we wczesnym wykrywaniu raka płuca. Mao i wsp. [12] ocenili retrospektywnie obecność mutacji genu *p53* i *K-ras* w komórkach gruczolakoraka płuca u chorych, u których nowotwór rozwinął się, pomimo że wcześniejsze badanie cytologiczne płwociny nie wykazało komórek raka. Wymienione mutacje obserwowano u 10 spośród 15 takich chorych, przy czym u 8 z nich podobne zmiany wykryto także w - ocenionym wcześniej jako „negatywny” - materiale cytologicznym. W innym badaniu Jacobson i wsp. [13] wykazali obecność mutacji genu *p53* i *K-ras* w komórkach uzyskanych z popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelikowych u chorych, u których w późniejszym czasie doszło do rozwoju gruczolakoraka płuca.

Dotychczasowe badania sugerują, że nie wszystkie ogniska dysplastyczne zawierające mutacje pojedynczych genów ulegają ostatecznie złośliwym przemianom - u części z nich może dojść do samowyleczenia. Z drugiej strony wysoki odsetek (ok. 5-20%) rozwoju wtórnych nowotworów płuc (ang. *second primaries*) u chorych uprzednio leczonych z powodu raka płuca wskazuje na możliwość kancerogenezy w kilku miejscach drzewa oskrzelowego.

Możliwości wczesnej interwencji

Nie ma jednoznacznych schematów postępowania w odniesieniu do chorych, u których wykryto ogniska dysplazji nabłonka oskrzelowego. Poza nie budzącą wątpliwości koniecznością zaniechania palenia tytoniu, nie ustalono dotychczas innych zasad postępowania. Pewne nadzieje w tym zakresie stwarzają prowadzone w ostatnich latach badania nad chemioprophylaktyką raka płuca, tj. postępowaniem mającym na celu odwrócenie wczesnych procesów kancerogenezy poprzez podawanie w dużych dawkach związków zawartych w naturalnej diecie (np. niektórych witamin) lub leków. Obecnie prowadzi się kilka dużych badań klinicznych oceniających profilaktyczne działanie między innymi beta-karotenu, witaminy A, witaminy E i N-acetylocysteiny [14].

Niektóre z tych badań obejmują także ocenę występowania zmian genetycznych w nabłonku drzewa oskrzelowego przed- i po leczeniu [15]. Wycinki śluzówki do analizy molekularnej pobierane są z reguły przy użyciu bronchofiberoskopu. Z uwagi na trudności w różnicowaniu pomiędzy prawidłową śluzówką a zmianami o charakterze dysplazji, materiał pobiera się „na ślepo” z okolicy „dużych rozwidleń”, gdzie na ogół zlokalizowane są te zaburzenia. Zastosowanie systemu LIFE (ang. *laser imaging fluoroscopic endoscopy*), umożliwiającego, dzięki użyciu światła laserowego, dokładniejszą lokalizację obszarów zmienionej śluzówki, zwiększa czułość badania z 36 do 80% [16]. Jeśli działania chemioprophylaktyczne okażą się skuteczne, to być może w przyszłości podstawę kwalifikacji grup chorych do tej formy postępowania stanowić będzie obecność mutacji. Ponadto, badania genetyczne mogłyby być przydatne do monitorowania dysplastycznych ognisk oraz oceny cofania się tych zaburzeń pod wpływem leczenia.

Inną rozważaną formą wczesnej interwencji jest terapia genowa zmian przednowotworowych. Zaburzenia genetyczne obecne w tej fazie są potencjalnie doskonałym celem dla ewentualnej „naprawy genów”. Dotychczas nie opracowano jednak skutecznych metod dostarczania do zmienionych komórek wektorów zawierających prawidłowe geny lub ich „odwrócone” zapisy (ang. *antisense therapy*). Jedną z rozważanych możliwości wprowadzania prawidłowych genów do komórek drzewa oskrzelowego jest zastosowanie wytworzonej za pomocą nebulizatora aerozolowej zawiesiny (wektorem wprowadzającym prawidłowe geny byłyby w tym przypadku liposomy). Postępowanie takie wydaje się uzasadnione, gdyż zmiany przedrakowe występują z reguły wieloogniskowo.

Podsumowanie

Przy obecnym stanie wiedzy nie ma podstaw ani możliwości stosowania testów molekularnych w codziennej praktyce lekarskiej. Wydaje się jednak, że prowadzone badania pozwolą w przyszłości dokładniej określić poszczególne etapy kancerogenezy i wskazać,

które z testów genetycznych mogłyby znaleźć zastosowanie kliniczne. Nadzieje w tym zakresie budzi rozwój technik molekularnych oraz opracowanie nowych badań (np. *GeneChip* - scalonych układów genetycznych do wykrywania zaburzeń struktury DNA lub technik

hybrydyzacji *in situ*). Ich użyteczność kliniczna musi być jednak potwierdzona w dobrze zaplanowanych badaniach klinicznych obejmujących duże, jednorodnie grupy chorych.

Piśmiennictwo

1. Zatoński W., Tyczyński J.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 1993 roku. Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 1996.
2. Richert-Boe K. E., Humphrey L.L.: Screening for cancers of the lung and colon. Arch. Intern. Med.: 1992, 152: 2398-2404.
3. Muhm J. R., Miller W. E., Fontana R. S. i wsp.: Lung cancer detected during a screening program using four-month chest radiographs. Radiology 1983, 148: 609-613.
4. Eddy D. M.: Screening for lung cancer. Ann. Intern. Med. 1989, 111: 232-238.
5. Fontana R. S., Sanderson D. T., Woolner L. B. i wsp.: Screening for lung cancer: a critique of the Mayo lung project. Cancer 1991, 67: 1155-1165.
6. Sundaresan V., Ganly P., Hasleton P. i wsp.: P53 and chromosome 3 abnormalities characteristic of malignant lung tumours are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. Oncogene 1992, 7: 1989-1997.
7. Bennett WP, Colby TV, Travis WD i wsp.: p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. Cancer Res. 1993, 53: 4817-4822.
8. Sozzi G., Miozzo M., Donghi R. i wsp.: Deletion of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung cancer. Cancer Res. 1992, 52: 6072-6082.
9. Boers J. E., Ten Velde G. P. M., Thunnissen B. J. M.: P53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996, 153: 411-416.
10. Ryberg D., Kure E., Lystad S. I i wsp.: P53 mutations in lung tumors: relationship to putative susceptibility markers for cancer. Cancer Res. 1994, 54: 1551-1555.
11. Vahakangas K. H., Samet J. M., Metcalf R. A. i wsp.: Mutations of p53 and ras genes in radon-associated lung cancer from uranium miners. Lancet 1992, 339: 576-580.
12. Mao L., Hruban R. H., Boyle J. O. i wsp.: Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. Cancer Res. 1994, 54: 1634-1637.
13. Jacobson D. R., Fishman C. L., Mills N. E.: Molecular genetic tumor markers in the early diagnosis and screening of non-small-cell lung cancer. Ann. Oncol. 1995, 6 (suppl. 3): 3-8.
14. Pastorino U.: Chemoprevention of lung cancer. ESMO Educational Book 1996: 123-127.
15. Lee J. S., Lippman S. M., Hong W. K. I i wsp.: Determination of biomarkers for intermediate end points in chemoprevention trials. Cancer Res. 1992, 52: 2707-2710.
16. Lam S, MacAulay C, Hung J i wsp.: Detection of dysplasia and carcinoma in situ with lung imaging fluorescence endoscopic device. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 1993, 105: 1035-1040.

The role of molecular tests in early detection of lung cancer

E. JASSEM

Summary

The development of lung cancer is accompanied by multiple genetic alterations. Most common mutations include those affecting protooncogenes (e. g. *ras*, *myc*) and suppressor genes (e. g. *p53*, *Rb1*). In this paper reviewed is the present status of molecular biology research in lung cancer, as well as the perspectives of application of molecular tests in early diagnosis of premalignant and malignant lesions. Discussed is also the role of these assays as a basis for preventive measures in lung cancer. Rapid development of molecular tests will probably soon lead to their practical applications in this tumor.