

# Tumormarkerek és prognosztikai faktorok primer hörgőrákban

Moldvay Judit

Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Bronchologiai Osztály, Budapest

A tüdőrák világszerte a leggyakoribb daganatos halálok és incidenciája folyamatosan tovább növekszik. A klasszikus fénymikroszkópos rutin módszerek mellett igen nagy szükség van speciális immunhisztokémiai, citometriai és molekuláris biológiai módszerek alkalmazására a primer hörgőrák jobb megismeréséhez. Az alábbiakban összefoglaljuk a tüdőrák manapság intenzíven tanulmányozott főbb tumormarkereit és prognosztikai faktorait. Foglalkozunk a szérummarkerekkel és részletesen tárgyaljuk a szöveti tumormarkereket az alábbi felosztásban: proliferációs markerek, onkogének, növekedési faktorok, apoptózis-markerek, a vaszkularizáció markerei, tumorszuppresszor gének, valamint a gyógyszerrezisztencia markerei. Szólunk a legfontosabb vizsgálómódszerekről és számos marker esetében az irodalmi adatokat saját vizsgálataink eredményeivel egészítjük ki. Jelenlegi ismereteink alapján összefoglaljuk a tumormarkerek és prognosztikai faktorok szerepét a primer bronchuscarcinoma korai felismerésében, agresszivitásának és klinikai viselkedésének pontosabb megismerésében, valamint kezelésében. Célunk az, hogy közelítsük egymáshoz a kutatólaboratóriumok sokszor igen elvont metodikákat alkalmazó kísérleteinek eredményeit és a hétköznapi klinikai gyakorlat választ sürgető és megoldásra váró kérdéseit. Az elmélet és a gyakorlat, a laboratórium és a betegágy között létrejövő híd azután mindkét pillér számára további fejlődés forrása lehet, és gyümölcsöző együttműködés alapjait teremtheti meg a tüdőrák ellen folytatott harcban. Kulcsszavak: tüdőrák, tumormarker, prognosztikai faktor, immunhisztokémia, molekuláris biológia. *Magyar Onkológia* 44:195–202, 2000.

Primary bronchial cancer is the most common cause of cancer death worldwide, and it shows a steadily increasing incidence. Beside classical histological typing and grading, immunohistochemical, cytometric, and molecular biological parameters are highly needed to assist light microscopy investigations to better characterize primary bronchial cancers. In this work the author summarizes the main tumor markers and prognostic factors in lung cancer studied intensively at present. Serum markers as well as different tissue markers, such as cell proliferation markers, oncogenes, growth factors, apoptosis markers and vascularisation markers, tumor suppressor genes and markers of drug resistance are discussed in details. The methods currently used in this field are also mentioned and the data of the literature is often completed with results of the author's own investigations. An overview is given about the role of tumor markers in the early detection of lung cancer, in the assessment of tumor aggressiveness, and in therapy of lung cancer. The aim of this work is to create a bridge between the research laboratory in which lung cancer is studied sometimes using very sophisticated techniques and the bedside with all its practical, difficult but very important questions. Getting closer the theory and the practice can be very promising in the establishment of a fruitful collaboration in order to be more effective in the fight against lung cancer. Keywords: lung cancer, tumor marker, prognostic factor, immunohistochemistry, molecular biology. *Moldvay J. Tumor markers and prognostic factors of the primary lung cancer. Hungarian Oncology* 44:195–202, 2000.



Közlésre érkezett: 2000. június 10.  
Elfogadva: 2000. szeptember 5.

Levelezési cím: Dr. Moldvay Judit  
Pest megyei Tüdőgyógyintézet, 2045 Törökbálint, Munkácsy M. u. 70.  
Tel.: 06 23 338-022, fax: 06 23 334-837, e-mail: moldvay@koranyi.hu

PHARMACIA

**Bevezetés**

A primer hörgőrák a leggyakoribb daganatos halálok világszerte és incidenciája továbbra is folyamatosan növekszik.

Világviszonylatban évente 8 millióan halnak meg daganatos betegség következtében, ebből 1,3 millióan tüdőrákban. A tüdőrák incidenciája és mortalitása tekintetében erős növekedés figyelhető meg Közép- és Kelet-Európa országaiban. Sajnálatos módon a legmeredekebb növekedési ütem Magyarországon tapasztalható. Hazánkban a tüdőrák incidenciája 1980-ban 3960, 1999-ben pedig 6243 volt és hasonló növekedési tendencia észlelhető a prevalencia esetében is, mely 1980-ban 5508, 1999-ben 12683 volt (11). A tüdőrák mortalitásának 90%-áért egyértelműen a dohányzást tartják felelősnek. 1995-ben közölt adatok szerint Magyarországon a felnőtt lakosság egy főre jutó cigarettafogyasztása kb. évi 3000 szál, amivel vezető szerepet töltünk be Európában és így tüdőrák szempontjából a legveszélyeztetettebb országok közé tartozunk. A tüdőrák 5 éves túlélése 1963-ban 5% volt. A modern képalkotó eljárások és preoperatív verifikációs módszerek gyors fejlődése, továbbá kombinált citosztatikus és irradációs kezelések alkalmazása ellenére az 5 éves túlélés napjainkban továbbra is 15% alatt van. Jelenleg tüdőrák esetében teljes gyógyulás kizárólag a betegség igen korai stádiumában elvégzett radikális sebészi reszekciótól várható, sajnos azonban a daganat felfedezésekor a betegeknek csak mindössze 20%-a található a műthető csoportban.

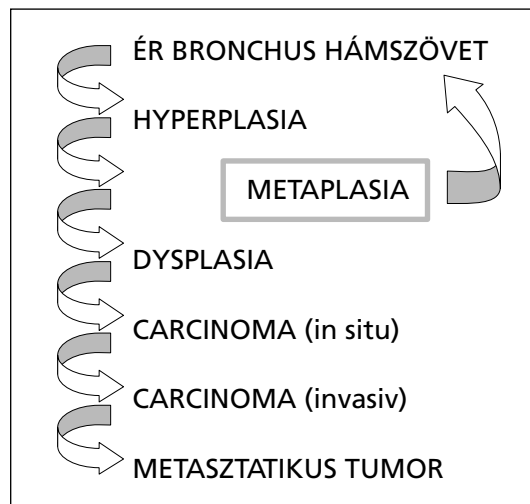
Hasonlóan egyéb szervek malignus megbetegedéseihöz, a stádiummeghatározás tüdőrák ese-

tében is a TNM klasszifikáción alapul. A szövettani tipizálás és a TNM besorolás együttes alkalmazása ugyanakkor homogén betegcsoportok kialakulásának illúzióját keltheti.

Adott „T” esetében például valóban fontos a primer tumor nagysága, de emellett több olyan hisztológiai jellegzetesség is megfigyelhető, melyeknek szerepük lehet a tumor agresszivitásának meghatározásában. Ezek többek között a **daganat differenciáltsági foka**, a **proliferáció mértéke**, valamint **érbetörés** és/vagy **nyirok-érbetörés** jelenléte. Bár irodalmi adatok utalnak ezen paraméterek klinikai jelentőségére, a mindennapi gyakorlatban valójában nem befolyásolják terápiás döntéseinket.

A klinikai TNM felállításakor az „N” státusznak döntő szerepe van az operabilitás meghatározásában, a patológiai TNM pedig a beteg posztoperatív ellátását befolyásolhatja adjuváns kemo- és/vagy sugárterápia szükségessé tételével. Széleskörű vizsgálatok alapján elmondható, hogy az „N” státusz jó korrelációt mutat a túléléssel. Érdekes azonban hangsúlyozni, hogy a legtöbb esetben ezen vizsgálatok „nem-kissejtes tüdőrák” csoportot tanulmányoztak, melyet köztudottan különböző szövettani típusú és klinikai viselkedésű daganatok alkotnak. A mindennapi klinikai megfigyelésekkel összhangban áll Nonomura és mtsai retrospektív vizsgálatának eredménye, mely szerint 993 perifériás, 15 mm-nél kisebb primer bronchuscarcinománál laphámrák esetében a hilusi nyirokcsomóban nem volt metasztázis, ezzel szemben adenocarcinomák esetében a hilusi nyirokcsomó-pozitivitás 18,9% volt (10).

1. ábra. Bronchus karcinogenezis

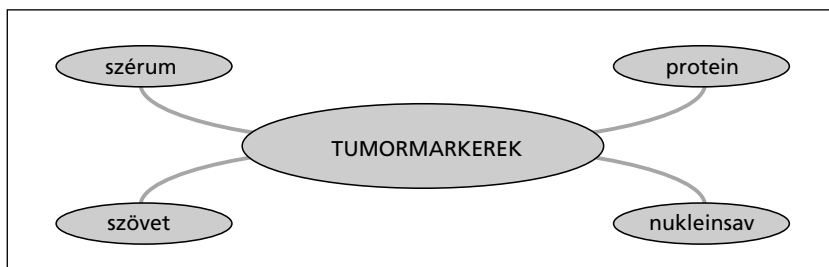


**Bronchiális karcinogenezis**

A malignus daganatok kialakulásának többlépcsős folyamatában számos genetikai változás következik be. A tüdőrákok különböző szövettani típusai közül leginkább a laphámrák esetében ismert a malignizálódás folyamata, melyet vázlatosan az 1. ábrán mutatunk be.

Kiemelendő a sorból a laphám-metaplasia, mely lehet ártalmatlan, reverzibilis (pl. influenzavírus-infekció következtében időlegesen kialakuló), de létrejöhethet krónikus kémiai irritáció (pl. dohányzás) eredményeként is belesodorván a korábban ép szöveteket a karcinogenezis kaszkádjába. Jelenleg még nem áll rendelkezésünkre olyan szöveti marker, mely a mindennapi gyakorlatban segítséget nyújthatna a fénymikroszkóposan észlelhető bronchus laphám-metaplasia etiológiájának meghatározásában, vagy klinikai viselkedésének előrejelzésében.

2. ábra. A tumormarkerek csoportosítása



**Tumormarkerek**

A tüdőrák WHO szerinti hisztológiai klasszifikációja kizárólag a fénymikroszkópos képen alapul és gyakran a diagnózis felállításához csak igen kicsiny, 1–3 mm-es bronchoscopos biopsziás minta áll rendelkezésre. A klasszikus fénymikroszkópos rutin módszerek mellett igen nagy szükség van speciális immunhisztokémiai és molekuláris

biológiai módszerek alkalmazására a primer hörgőrák jobb megismeréséhez.

A tumormarkerek olyan, elsődlegesen a tumorsejtek által expresszált molekulák vagy a sejtekben bekövetkező genetikai változások, melyek jelzik a tumoros és egészséges sejtek közti biokémiai és/vagy molekuláris biológiai különbségeket. Didaktikai szempontból – függően attól, hogy a szerodiagnózist lehetővé tevő tumorsejttermékről, illetve szöveti diagnózisra alkalmas sejtfelszíni markerről van-e szó, továbbá, hogy kóros fehérjét vagy pedig nukleinsav-eltérést mutatunk-e ki – a tumormarkereket az alábbi egyszerű módon csoportosíthatjuk (2. ábra).

### Szérum tumormarkerek

Bár a szérum tumormarkerek alkalmazásához korábban tüdőrák esetében nagy reményeket fűztek, mára már bebizonyosodott, hogy ebben a betegcsoportban a hétköznapi klinikai gyakorlatban sem a diagnózis felállítására, sem pedig szűrővizsgálatok végzésére nem alkalmasak. Bizonyos esetekben azonban lehet szerepük a betegség követésében vagy a terápia monitorozásában.

Ebert és mtsai 381 tüdőrákos betegnél vizsgálták a szérum **CYFRA 21-1** (cytokeratin fragment **21-1**), TPA (tissue polypeptide antigen), **CEA** (carcinoembryonic antigen) és **NSE** (neuron specific enolase) szintjét a terápia monitorozása céljából (3). A vizsgált szérummarkerek szenzitivitási arányai a következők voltak: nem-kissejtes tüdőrákban: CYFRA 21-1: 44,4%, TPA: 39,4%, CEA: 37,5%, kissejtes tüdőrákban: NSE: 61,9%. Ezek az értékek messze alatta maradtak a standard citopatológiai vizsgálatok megszokott értékeinek (85–98%). A nem-kissejtes tüdőrákok kuratív célú sebészi eltávolítását követő egy héten belül mindössze a CYFRA 21-1-szint csökkent a normális értékhatár alá. A kemo- és radioterápiára adott válaszok szérum tumormarkerekkel történő monitorozásakor a klinikummal való összevetés 55–69%-os konkordanciát mutatott. A betegség progresszióját nem-kissejtes tüdőrák esetében legjobban a CYFRA 21-1 jelezte (60%), míg kissejtes tüdőrákban az NSE 70%-ban bizonyult informatívnak. Mindezek alapján a fenti szérum tumormarkereknek csak olyan előrehaladott stádiumú (III., IV.) betegek esetében lehet klinikai szerepe, akiknél a rossz általános állapot egyéb invazívabb vizsgálatok elvégzését már nem teszi lehetővé.

Egy másik szérummarker a közelmúltban került az onkopulmonológusok érdeklődésének középpontjába. A későbbiekben majd részletesen is tárgyalt p53 protein ellen termelődő anti-p53 antitestet Zalcman és mtsai ELISA módszerrel vizsgálták 167 tüdőrákos betegben (19). Közülük 32 beteget (16 anti-p53-pozitív és 16 anti-p53-negatív) 30 hónapon át monitorozták. A 16 pozitív betegből 12-ben az alkalmazott kemoterápia parciális illetve komplett remissziót eredményezett, melynek során az antitest-titer csökkent. Az antitest titerének csökkenése és a terápiás válasz között megfigyelt jó korreláció arra enged követke-

zetni, hogy ez a szérummarker alkalmas lehet a terápiás válasz és esetlegesen a relapszus monitorozására.

Francia kutatók, elsősorban Soussi és mtsai élen járnak a szérum anti-p53 antitest vizsgálatában. 73 tüdőrákos beteg szérumának prospektív vizsgálata során a betegség diagnosztizálásakor 37%-ban (27/73) észleltek anti-p53 antitest-pozitivitást. Emellett két olyan betegben is pozitívitást találtak, akik erős dohányosok voltak, ugyanakkor nem szenvedtek daganatos megbetegedésben. Mindkét betegben invazív bronchus laphámcarcinoma alakult ki 5, illetve 15 hónappal a szérum anti-p53 antitest detektálás után. Ezek az eredmények biztatóak, de a mindennapi klinikai gyakorlatban való alkalmazhatóságukról csak nagyszámú betegcsoportokon végzett átfogó, prospektív vizsgálatok eredményei után nyilatkozhatunk.

### Szöveti tumormarkerek

A primer bronchuscarcinoma szöveti tumormarkereinek vizsgálatokor bronchoscopos biopsziás mintát vagy sebészi reszekció során eltávolított tumorszövetet tanulmányozunk. Vizsgálati mód-szerként alkalmazhatunk **molekuláris biológiai metodikákat** (leggyakrabban mutációanalízis vagy heterozigotáság-vesztési vizsgálat), melyek segítségével a daganatban létrejött genetikai károsodásokat tudjuk kimutatni. Ezek a módszerek ma még többnyire csak kutatási célokot szolgálnak egyrészt a metodikák bonyolultsága, másrészt a kapott eredmények hétköznapi klinikai gyakorlatba való átültetésének megkérdőjelezhetősége miatt. A molekuláris biológiai kutatások eredményei ugyanakkor rendkívül fontosak a tüdőrák kialakulásának és a daganat viselkedésének jobb megismeréséhez és reményeink szerint a közeljövőben döntően hozzájárulnak e betegség kezeléséhez is.

A szöveti tumormarkerek leggyakrabban alkalmazott kimutatási módja az **immunhisztokémiai vizsgálat**, melynek során a daganatban lévő – szerkezetében vagy metabolizmusában – kóros proteint mutatjuk ki monoklonális antitestek segítségével. Leggyakrabban formalinfixált, paraffinba ágyazott blokkokat használunk, egyes antitestek azonban csak fagyasztott szövetmintán alkalmazhatók. A paraffinos blokkok felhasználása széleskörű, retrospektív vizsgálatok megvalósítását teszi lehetővé, míg a csak fagyasztott mintán elvégezhető reakciók esetében vagy prospektív vizsgálat megtervezése szükséges, vagy pedig – ha már jóval korábban gondoltunk a jövőre – mélyfagyasztóban tárolt friss bronchoscopos és/vagy sebészi biopsziás szövetmintákat tanulmányozhatunk.

Ez utóbbi gondolat továbbvezetése alapján felmerülhet az igény egy jól szervezett, centralizált, paraffinos blokkokat, fagyasztott tumormintákat és ugyancsak fagyasztott szérummintákat, valamint a betegek főbb klinikai adatait tartalmazó tüdőrák adatbázis létrehozására. Magyarország így végre előnyére fordíthatná a tüdőrák-statisztikákban elfoglalt igen előkelő helyét.

A következőkben tekintsük át a primer bronchuscarcinomákban vizsgált legfontosabb szöveti tumormarkereket.

*Proliferációs markerek*

A **PCNA** (**p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen) egy 36 kilodaltonos nukleáris protein, ami a DNS-polimeráz  $\delta$ -hoz kapcsolódva vesz részt a DNS replikációjában.

A **Ki-67** (= **Mib-1**) egy nonhiszton fehérje, melynek expressziója a sejtciklus késői G1-S-G2-M fázisaira esik.

Mind a PCNA mind pedig a Ki-67 elleni antitest alkalmazásakor pozitív immunhisztokémiai reakció figyelhető meg az osztódásban lévő tumorsejtek magjában, lehetővé téve ezzel a daganatos proliferáció mértékének meghatározását.

*Onkogének*

A malignus tüdőtumork kialakulásában szerepet játszó legfontosabb onkogén kissejtes tüdő-

rákban a **c-myc**, melynek mutációja ezen daganatok közel 80%-ában kimutatható. Nem-kissejtes tüdőrákok esetében a legfőbb szerepet játszó onkogén a **k-ras**, melynek domináns mutációja ezeknek a daganatoknak kb. 30%-ában megfigyelhető. A ras onkogén jelenléte mutációanalízissel igazolható, de emellett lehetőség van a gén termékének, a citoplazmában megtalálható p21<sup>ras</sup> proteinnek az immunhisztokémiai kimutatására is anti-ras monoklonális antitest alkalmazásával. Nem-kissejtes tüdőrákban a ras immunpozitivitást egyes kutatók rossz prognosztikai faktornak találták (4).

*Növekedési faktorok*

A tüdőrák esetében a legintenzívebben tanulmányozott növekedési faktor a valójában az onkogének közé sorolható **Her2/neu** (más néven **C-erbB-2**) gén, amely egy transzmembrán tirozin-specifikus proteinkináz kódol, ami extenzív homológiát mutat az epidermális növekedési faktor receptorával (EGFR – epidermal growth factor receptor). Irodalmi adatok szerint – amit saját vizsgálataink eredménye is megerősít – a nem-kissejtes tüdőrákok kb. 30%-a expresszálja (3. ábra). Ismeretes, hogy pl. emlőrák esetében a Her2/neu-immunpozitivitásnak milyen fontos szerepe van a Her2 receptor elleni monoklonális antitest, a Herceptin terápiás alkalmazhatóságának a meghatározásában (13). A közelmúltban - ezen terápiás megközelítéssel - tüdőrák vonatkozásában is megkezdődtek a klinikai vizsgálatok.

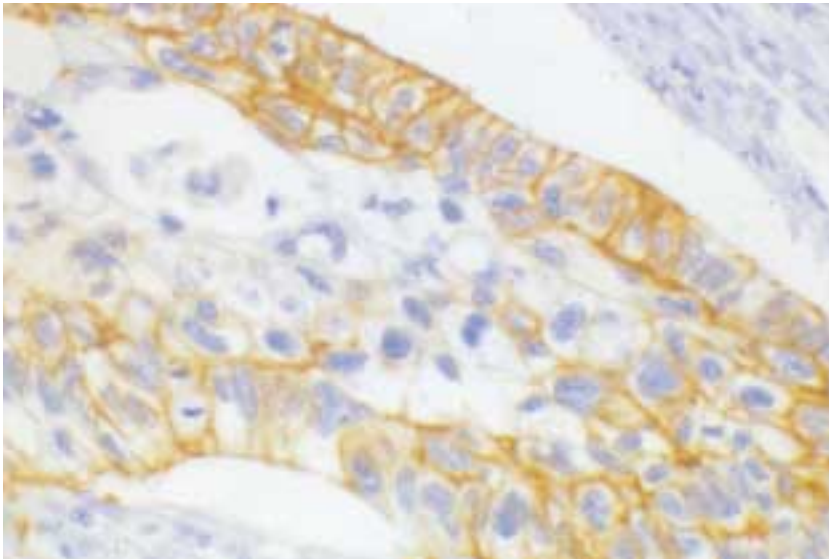
*Apoptózis-markerek*

Az apoptózis a sejt fiziológiás vagy programozott halála, szemben a sejt károsodásakor létrejött nekrozissal. Számos morfológiai és biokémiai különbség alapján különíthetjük el az apoptózist a nekrozistól, így pl. apoptózisban önálló sejtek pusztulnak el, a sejtek zsugorodnak de membránjuk integritása nemvész el, az apoptotikus sejteket nem övezi gyulladás, viszont a folyamat energiaigényes és de novo géntranszkripcióval jár. Ezzel szemben nekrozis során sejtcsoportok károsodnak, megszűnik a sejthártyák integritása, a sejtek feloldódnak, kifejezett gyulladási reakció lép fel, ugyanakkor a folyamat nem igényel energiát.

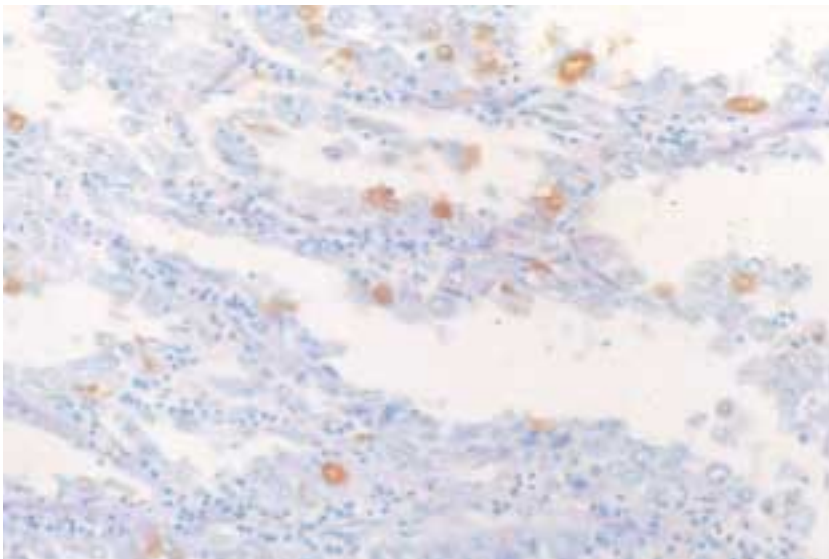
Az apoptotikus sejtekben lévő fragmentálódott DNS-t a **TUNEL** ((terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP **n**ick **e**nd-labeling) egyik változatával immunhisztokémiai módszerrel is kimutathatjuk **ApopTag** In Situ Detection Kit és peroxidáz segítségével. Az immunpozitivitás nukleáris (4. ábra).

A **bcl-2** onkogén a 25 kilodaltonos bcl-2 proteint kódolja, amely egy membránprotein és inkább a sejt belsejében, a mitokondriumokban helyezkedik el, mintsem a sejt felszínén. Ez a fehérje központi szerepet játszik az apoptózis gátlásában, ezért anti-apoptotikus proteinnek is nevezik. A bcl-2-t egyes normális limfociták is expresszálják, miáltal az immunhisztokémiai reak-

3. ábra.  
C-erbB-2-pozitív tüdő adenocarcinoma (x 800)



4. ábra. Apoptotikus sejtek jól differenciált adenocarcinomában (Methylzöld x 600)





ció során jó belső kontroll érhető el. Az immunpozitivitás főként citoplazmatikus, kisebb részben membranózus (5. ábra).

#### Tumorszuppresszor gének

A 13q14 kromoszómahelyen található **retinoblastoma (Rb)** gén egy 110 kilodaltonos nukleáris foszfopteint kódol, melynek fontos szerepe van a sejtciklus szabályozásában. Az Rb mutációja – mely ez esetben az immunpozitivitás megszűnését eredményezi – a kissejtes tüdőrákok csaknem 100%-ában megfigyelhető. Nem-kissejtes tüdőrákok esetében az Rb mutációs aránya lényegesen kisebb, csak mindössze kb. 15%. Az Rb mutációjának klinikai jelentőségét és a bronchus karcinogenezisben játszott szerepét mind a mai napig intenzíven vizsgálják.

A 17-es kromoszóma rövid karján (17p13.1) található **p53** gén egy 53 kilodaltonos, 393 aminosavból álló nukleáris foszfopteint kódol, mely központi helyet foglal el a normális sejtciklus szabályozásában és a karcinogenezisben. Sejtkárosító hatások esetén a „genom őre”-ként is emlegetett vad típusú p53 aktivitása fokozódik és megállítja a sejtet G1-S fázisban. Ily módon lehetővé válik a repair mechanizmusok működésbe lépése, vagy pedig ha a genomkárosodás helyreállítása már nem lehetséges, akkor apoptózis jön létre. Fiziológiásan a p53 fehérje félféletideje igen rövid, ezért immunhisztokémiai módszerekkel nem kimutatható. Kóros esetben – melynek hátterében állhat genetikai károsodás (mutáció, allélnyeresztés) és/vagy a protein excretio gátlása (vírusinfekció) – a félféletidő megnyúlik és így a p53 fehérje immunhisztokémiailag kimutathatóvá válik (6. ábra). A p53 gén molekuláris biológiai és a p53 protein immunhisztokémiai vizsgálatának eredményei alapján vált nyilvánvalóvá, hogy az immunpozitivitás nem jelent feltétlenül szimultán genetikai károsodást és hasonlóképpen, nem minden p53-mutáció eredményez p53-overexpressziót. Ugyanakkor erős egybeesés figyelhető meg a p53 missense mutációk és az immunpozitivitás között.

Tüdőrákos betegekben megfigyeltek összefüggést a p53-immunpozitivitás és a dohányzás között, továbbá a tüdőrákokban található leggyakoribb transzverzió a G:C – T:A, ami in vitro indukálható a p53 génben a dohányosok szervezetét károsító egyik legfontosabb karcinogén, a benzo(a)pyrene alkalmazásával.

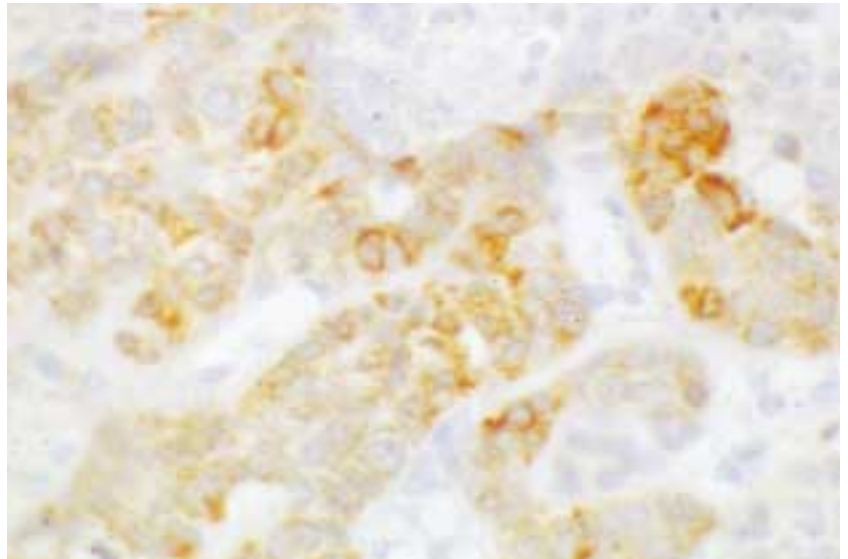
A p53-overexpresszió a tüdő karcinogenezisének már korai fázisában megfigyelhető és arányosan növekszik a dysplasia súlyosságának fokozódásával.

Se szeri se száma azon vizsgálatoknak, melyek a p53 prognosztikai szerepét kívánták meghatározni (5,6,12). A kérdés mindezidáig nem dőlt el, bár manapság egyre többen foglalnak állást a p53-pozitivitás mint rossz prognosztikai faktor mellett. Az ellentmondásos eredmények hátterében többek között állhatnak a vizsgált betegcsoportok erősen inhomogén volta, a nem-kissejtes tüdőrák mint „egységes” kategória alkalma-

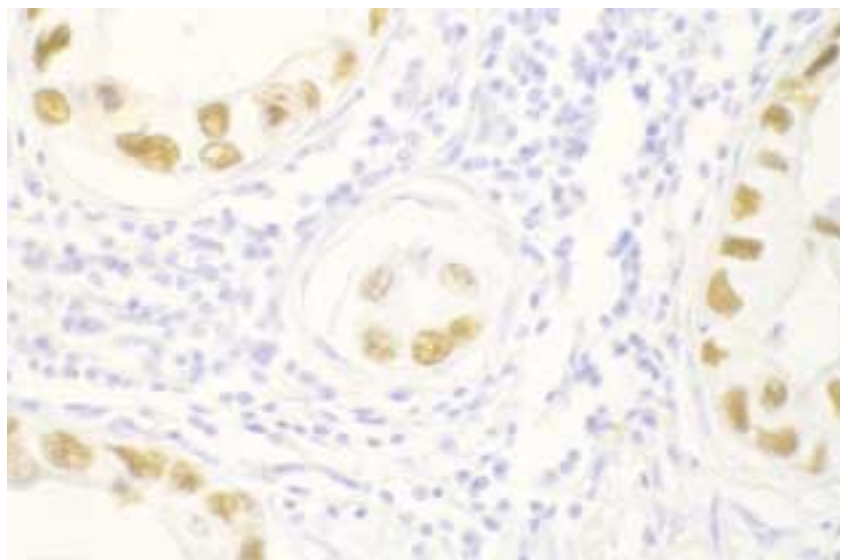
zása, valamint az alkalmazott immunhisztokémiai módszerek és antitest-altípusok eltérő volta.

Saját munkánk során homogén betegcsoportban, 94 magyar beteg esetében (74 férfi, 20 nő, átlagéletkor 58,3 év) patológiai I stádiumú cc. planocellularében vizsgáltuk a p53-expresszió és a túlélés közti összefüggést (7). Utánkövetésre 83 beteg (66 férfi, 17 nő, átlagéletkor 57,9 év) bizonyult alkalmasnak. A daganatok 55%-ban voltak immunpozitívak. Az utánkövetésre alkalmas 83 beteg túlélési adatainak elemzésekor a p53-pozitivitás (n=46) szignifikánsan rossz prognosztikai faktornak bizonyult (p=0,0125). A túlélésre és a p53 státuszra vonatkozóan szelektált 32 tumorminta flow cytometriás mérése során nem találtunk összefüggést sem a DNS-tartalom és az immunpozitivitás, sem pedig a DNS-tartalom és a túlélés között, habár az aneuploid és a p53-pozitív tumorok esetében némileg kedvezőtlenebb prognózis megfigyelhető volt. Érdemes kiemelni, hogy azon 9 esetben, ahol szövettanilag a planocellularis carcinoma mellett tuberkulotikus hegyszövet is megfigyelhető volt, a planocellularis

5. ábra.  
Bcl-2-pozitív adenocarcinoma (x 600)



6. ábra. P53-pozitív adenocarcinoma (x 800)



carcinomára jellemző aránnyal ellentétben p53-pozitivitást csak egyetlen tumormintában találtunk.

Tüdőrákban számos kromoszomális helyen fordulhatnak elő deléciók. A 3. kromoszóma rövid karjának deléciója (**3p-deléció**) a kissejtes tüdőrákok több mint 90%-ában megfigyelhető, míg ez az arány nem-kissejtes tüdőrákban 30-50%.

Allélvesztés (LOH = loss of heterozygosity) szempontjából a legfontosabb kromoszomális helyek a 3p (FHIT gén = fragile histidine triad gene), melynek heterozigótaság-vesztése a nem-kissejtes tüdőrákban 25%-ban észlelhető, valamint a 9p (p16 és p15 gén) melynek heterozigótaság-vesztése a nem-kissejtes tüdőrákok 12%-ában mutatható ki.

#### *A vaszkularizáció markerei*

Az angiogenezis megjelenése a karcinogenezis egyik legkritikusabb pontja. A daganatok mikroérrendszerének denzitását meghatározhatjuk immunhisztokémiai módszerek segítségével. A monoklonális antitestek révén leggyakrabban kimutatott antigének a **VIII. faktor**, a **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor), a **PDGF** (Platelet Derived Growth Factor), valamint a mindennapi klinikai gyakorlatban a vércsoport-meghatározáskor is vizsgált vércsoport-antigének (**ABH**). Ez utóbbi alkalmazását nagymértékben megkönnyíti a reagensek olcsósága, a metodika egyszerűsége és a vörösvértestek és az endothel-sejtek által biztosított jó belső kontroll.

A daganatsejtek körüli extracelluláris mátrix komponensei döntő szerepet játszanak a daganatos progresszióban. Az MMP-k (**m**atrix **m**etallo-**p**rotease) kontrollvesztése megteremtheti a feltételeit a daganatos invázióknak és elősegítheti a metasztázisok létrejöttét és az angiogenezist. Az MMP-inhibitorok alkalmazása – ezen folyamatok lassítása vagy meggátlása révén – terápiás lehetőségeket rejt magában.

A tumor vaszkularizációjának fokozódását jelző növekvő immunpozitivitási arány tüdőrákok esetében is számos vizsgálat tanúsága szerint rossz prognosztikai jelként értékelhető. Az angiogenezis gátlásán alapuló terápiás beavatkozások térhódítása feltehetően a vaszkularizáció markereinek fontosságát és alkalmazásuk gyakoriságát is jelentősen meg fogja növelni.

#### *Gyógyszerrezisztencia markerei*

Tüdőrákok esetében az alábbi három fehérje fontos szerepet játszik a multidrug-rezisztencia (MDR) kialakulásában (2).

1. Az **MDR1** gén által kódolt 170 kilodaltonos **P-glikoprotein**, amely a főként az anthracyclinek és Vinca alkaloidok effluxát idézi elő meggátolva ezzel a citosztatikum daganatsejtet pusztító hatásának létrejöttét. Működését számos szer reverzibilisen gátolja, így pl. verapamil, quinidine vagy cyclosporin A.
2. Az **MRP** (multidrug resistance-associated protein) pontos hatásmechanizmusa még nem

tisztázott, de többek között abban különbözik a P-glikoproteintól, hogy működése a fent felsorolt szerekkel nem gátolható.

3. Nemrég írták le az **LRP-t** (lung resistance protein), amit felelőssé tesznek többek között a platinabázisú daganatellenes szerekre adott gyenge terápiás válaszáért.

A korábban már említett **p53** gén mutációja az MDR1 fokozott működését eredményezi és ily módon szerepe lehet a kemo- és radioterápiára rezisztens daganatok kialakulásában. Irodalmi adatok szólnak a mutáns p53 és a Cisplatin elleni rezisztencia fokozódása közti kapcsolatról (15).

A topoisomerase II. inhibitorok (pl. Vepesid) hatásukat többek között a vad típusú p53-függő apoptózis révén fejtik ki, érthető tehát, hogy p53-mutáció esetén ezen szerek citosztatikus hatása kedvezőtlen irányban fog változni.

A **GST** (glutathion-S-transferase) enzim fiziológiai körülmények között fontos detoxikáló funkcióval rendelkezik. A tüdőrák-sejtekben immunhisztokémiai módszerrel kimutatott GST azonban a kemoterápiás szerek „ártalmatlanná” tételét végzi, melynek eredményeképpen fokozódik az egyes citosztatikus szerekkel (főként alkilálószerrel, Cisplatin) szembeni rezisztencia.

Tüdőrákos betegekkel foglalkozó gyakorló orvosok jól ismerik azt a nagy dilemmát, ami főként a nem-kissejtes tüdőrákos betegek esetében merül fel citosztatikus kezelés alkalmazásának mérlegelésekor. Sajnálatos módon jelenleg még nem áll rendelkezésünkre olyan marker, mellyel a terápiás válasz megbízhatóan előre jósolható lenne, melynek révén az oly sok mellékhatással járó citosztatikus kezelés valóban csak a szükséges esetekben és kellő hatékonyság jogos reményében kerülne alkalmazásra.

### **Tumormarkerek a tüdőrák korai felismerésében**

Amint azt a bevezetőben említettük, ma még tüdőrák esetében teljes gyógyulást csak a korai stádiumban elvégzett komplett sebészi reszekciótól remélhetünk. A tüdőrák kialakulását és progresszióját számos genetikai változás előzi meg, mint pl. a tumorsuppresszor gének működésének csökkenése vagy kiesése, domináns onkogének aktivációja, illetve növekedési faktorok és ezek receptorainak kóros megváltozása. Egyes tumormarkerek segítségével már a fénymikroszkóposan éppnek tűnő bronchusnyálkahártya-hámsejtekben is felismerhetővé válnak a karcinogenezis kezdeti lépései.

Gazdar és mtsai 94 mikrodisszekcióból származó bronchus szövetmintán tanulmányozta a DNS-t (18). A biopsziás minták között található volt ép epithelium, különböző súlyossági fokú dysplasia, carcinoma in situ és invazív carcinoma is. 10 kromoszóma régió (3p12, 3p14.2, 3p14.1-21.3, 3p21, 3p22-24.2, 3p25, 5q22, 9p21, 13q14RB és 17p13TP53) határozta meg a heterozigótaság vesztesét és az alábbiakat találták:

1. A szövettanilag ép vagy csaknem ép (hyperplasia/metaplasia) minták 30–40%-ában volt allélvesztés kimutatható egy vagy több régióban.
2. Az LOH gyakorisága növekedett a szövettani eltérések súlyosságával.
3. A legkorábbi és leggyakoribb LOH a 3p21, 3p22-24, 3p25 and 9p21.4 kromoszóma-helyeken volt megfigyelhető.
4. TP53 allélvesztés dysplasia és carcinoma in situ eseteiben gyakran megfigyelhető volt.
5. A 3p-deléció nagysága növekedett a hisztológiai progresszió előrehaladtával.

Erős dohányosok bronchialis dysplasiájának vizsgálatakor az alábbiakat találták:

1. A legtöbb dohányosban (80%) észlelhető molekuláris biológiai eltérés egy vagy több biopsziás helyen.
2. Extenzív allélvesztés figyelhető meg a biopsziás minták 50%-ában.
3. Ezek a változások a dohányzás elhagyása után is több éven, esetleg évtizeden keresztül fennállnak.
4. A 3p- és 9p-deléciók a legkorábbi elváltozások és gyakran hisztológiailag ép epitheliumban figyelhetők meg.
5. Ezek az eltérések nincsenek jelen azokban, akik sosem dohányoztak.

A Johns Hopkins Lung Project-ben két monoklonális antitestet teszteltek archivált köpetminták immuncitokémiai vizsgálatával. Az egyik antitest a difukozilált Lewis X antigént, a másik pedig a lakto-N-fukopentaóz-3 antigént ismerte fel, mely számos humán carcinomán jelen van. Korrelációt találtak az immunpozitivitás és a későbbiekben kifejlődött tüdőrák között. Megfigyeltek pl. difukozilált Lewis X antitest immunpozitivitást egy 45 éves dohányos férfi köpetmintájában, akinél 62 hónappal később kissejtes tüdőrák igazolódott (9).

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a molekuláris biológiai vizsgálatoknak fontos szerepe lehet a rizikócsoportok meghatározásában, különösen dysplasia fennállása esetén. Szerepük lehet továbbá a kemoprevenció hatékonyságának megítélésében, melynek során kémiai anyagok (pl. 13-cis-retinolsav) segítségével kísérlik meg ezen molekuláris változások reverzibilissé tételét.

Mivel ezek a változások a köpetben lévő bronchus-hámsejtekben is kimutathatók, ezért a jövő egyik nagy kérdése, hogy ezen metodikák alkalmasak lesznek-e szűrővizsgálatok végzésére. Arra a kérdésre azonban, hogy hogyan értékeljünk egy dysplasiás hámszövetben detektált 3p-deléciót vagy p53-immunpozitivitást nagy, átfogó, prospektív vizsgálatok kellene majd hogy válaszoljanak.

### Tumormarkerek a tüdőrák agresszivitásának megítélésében

Az irodalmi adatok alapján tüdőrákokban az egyes tumormarkerek prognosztikai értéke sok-

szor igen tág határok között mozog, melynek hátterében többek között metodikai különbségek is állhatnak. Az onkogén-expresszió és a tumor-szupresszor funkciókiesés rendszerint mint rossz prognosztikai faktor jelenik meg, hasonlóképpen a fokozott sejtproliferáció, vaszkularizáció, illetve az apoptózis csökkenése (16,17).

A fent említett szöveti markerek és prognosztikai faktorok jelentős részét saját munkánk során is tanulmányoztuk primer tüdőrák miatt operált 265 francia beteg tumormintáin (8). Közülük utánkötetésre alkalmasnak bizonyult 227. Ebből 132 betegnél (126 férfi, 6 nő, átlagéletkor 61,8 év) cc. planocellulare és 95 betegnél (83 férfi, 12 nő, átlagéletkor 60,4 év) adenocarcinoma miatt történt reszekciós tüdőműtét. A sebészi biopsziás mintákon vizsgáltuk a p53, Ki-67, c-erbB-2, pan-ras, bcl-2 és ABH expresszióját tiramin amplifikációval kombinált immunhisztokémiával. Az adenocarcinomák esetében emellett végeztünk K-ras mutációanalízist és vizsgáltuk a 3p21 heterozigotáság-vesztését is. Az eredményeket a betegek túlélési adataival vetettük össze. Szöveti heterogenitás és a tiramin amplifikáció alkalmazása miatt a Ki-67 vizsgálatokra nem a sejtproliferáció mértékének meghatározása, hanem a megfelelő mértékű antigénelőhívás megítélése céljából került sor. Az immunreakciók pozitív aránya általában magasabb volt planocellularis carcinomák esetében, mint adenocarcinomáknál: p53: 69% vs 47%, c-erbB-2: 26% vs 13%, bcl-2: 30% vs 19%, ABH: 51% vs 31%. Egyedül a pan-ras-immunpozitivitás volt gyakoribb adenocarcinomákban, mint planocellularis carcinomákban: 35% vs 12%. A planocellularis carcinomák esetében mindössze a betegség stádiuma volt prediktív értékű ( $p=0,01$ ), míg adenocarcinomáknál a női nem ( $p=0,0014$ ), a betegség alacsonyabb stádiuma ( $p=0,01$ ), a daganat magasabb differenciáltsági foka ( $p=0,009$ ), valamint a bcl-2-immunpozitivitás ( $p=0,009$ ) bizonyult szignifikánsan jó prognosztikai faktornak. (Ez utóbbi talán meglepő, hiszen a bcl-2-t mint anti-apoptotikus proteint tartjuk számon, de lehetséges, hogy hátterében a bcl-2/bax arány megváltozása vagy a bcl-2 foszforilációja révén csökkent génműködés áll.) Az adenocarcinomás betegek 39%-a volt „0” vércsoportú, ami rossz prognosztikai tényezőnek bizonyult ( $p=0,018$ ) és ezen betegeknél a daganatok döntő többségében (33/36) immunhisztokémiailag sem volt vércsoport antigén detektálható. Megrövidült túlélés volt megfigyelhető a p53-pozitív adenocarcinomákban is, de kizárólag az I és II stádium esetén. A 81 adenocarcinománál végzett K-ras mutációanalízis során 12 mutációt találtunk, melyek azonban nem bírtak prediktív értékkel a túlélést illetően. Az adenocarcinomák között mindössze háromban volt megfigyelhető heterozigotáság vesztese a 3p21 kromoszómahelyen.

### Tumormarkerek a tüdőrák kezelésében

A tüdőrák létrejöttében szerepet játszó genetikai változások közül mára már nem egy ismertté vált, lehetőséget teremtve ezáltal a változások ge-

netikai úton történő megszüntetésére. A génterápia célja elsődlegesen az onkogén-inaktiválás illetve a tumorszuppresszor gén működésének helyreállítása.

Ez utóbbi példjaként Roth és mtsai már néhány évvel ezelőtt végeztek retrovírus-mediált vad típusú p53 géntranszfert tüdőrákos betegekben (14). Zou és mtsai a közelmúltban korai endobronchialis daganat kezelésére alkalmazott – liposzómába burkolt – p53 beviteléről számoltak be (20).

Kísérletek folynak az apoptotikus funkció helyreállítására bcl-2 antiszenz oligonukleotidok segítségével olyan tumorok esetében, amelyek bcl-2-overexpressziót mutatnak.

Az onkogén- illetve növekedési faktor-ellenes antitestek alkalmazásáról más esett szó a Her2/neu tárgyalásakor.

A daganatos progresszió visszaszorítására szolgálnak az angiogenezis-gátló vegyületek, mint pl. az anti-VEGF monoklonális antitest, a VEGF-receptorkináz-inhibitorok és más anti-angiogenetikai szerek (angiostatin, interleukin-1, -12, retinolsav, 2-metoxiosztradiol). Ugyancsak a daganat terjedését kívánják gátolni a matrix metalloproteinase-inhibitorok.

A multidrug-rezisztencia vizsgálatának továbbfejlődése – esetlegesen a későbbiekben funkcionális tesztek kifejlesztése – szintén hozzájárulhat a tüdőrák kezelésének specifikusabbá és ezáltal hatékonyabbá válásához.

### **Összefoglalás**

A tüdőrákra vonatkozó tumormarkerek és prognosztikai faktorok – más malignus daganatokéhoz hasonlóan – igen széleskörű és intenzív kutatások célpontjai (1). Az elmúlt években a bronchus karcinogenezis molekuláris biológiai alapjainak számos új részletével ismerkedhettünk meg és a világ egyes fejlettebb részein a génterápia mára már valósággá vált a tüdőrák kezelésében. Az irodalmi adatok ismeretében és részben saját vizsgálataink eredményei alapján bizonyos esetekben ugyan következtethetünk az adott tüdődaganat agresszivitására és klinikai viselkedésére, azonban ezen markerek tüdőrák esetében jelenleg (még) a hétköznapi gyógyító munkában közvetlenül nem felhasználhatók. Szerepük ma még csak elsősorban a további kutatások irányvonalainak meghatározásában van, valamint hozzájárulhatnak egyéb, a klinikum számára rendkívül fontos területek – mint pl. a korai felismerés, a génsebészet, a daganatok gyógyszer- és sugárrezisztenciájának vizsgálata, a metasztatizáció képződésének megakadályozása – eddigi eredményeinek továbbfejlesztéséhez.

### **Irodalom**

1. Brambilla C, Brambilla E. (Eds.) Lung tumors. In: Lung Biology in Health and Disease, vol. 124, Dekker, 1998
2. Cole SPC. Multidrug resistance in human lung cancer and topoisomerase II, N. Saijo: Alternate mechanisms of drug resistance in human lung cancer. Both in: HI Pass, JB Michell, DH Johnson, AT Turrissi, eds. Lung Cancer. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 169-217, 1996
3. Ebert W, Hoppe M, Muley TH, et al. Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA-TP CEA, and NSE. Anticancer Res 17:2875-2878, 1997
4. Fujino M, Dosaka-Akita H, Harada M, et al. Prognostic significance of p53 and ras p21 expression in nonsmall cell lung cancer. Cancer 76:2457-2463, 1995
5. Greatens TM, Nighans GA, Rubins JB, et al. Do molecular markers predict survival in NSCLC? Am J Resp Crit Care Med 157:1093-1097, 1998
6. Kane MA, Bunn PA Jr. (Eds.) Biology of lung cancer. In: Lung Biology in Health and Disease, vol. 122, Dekker, 1998
7. Moldvay J, Strausz J, Egervary M et al. P53 expression in stage I squamous cell lung cancer. Pathol Oncol Res 4:8-13, 1998
8. Moldvay J, Scheid P, Wild P et al. Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res 6:1125-1134, 2000
9. Mulshine JL, Scott F. Molecular markers in early cancer detection. Chest 107:280S-286S, 1995
10. Nonomura A, Mizukami Y, Shimizu J, et al. Clinicopathological study of primary malignant tumors of the lung: an analysis of 993 tumors resected at the Kanazawa University Hospital between 1979-1993. J Surg Oncol 58:5-11, 1995
11. Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet. A Pulmonológiai Intézmények 1999. évi epidemiológiai és működési adatai. 2000
12. Oshaki Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, et al. Bcl-2 and p53 protein expression in non-small cell lung cancers: correlation with survival time. Clin Cancer Res 2:915-920, 1996.
13. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. J Clin Oncol 16:2659-2671, 1998
14. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, et al. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. Nat Med 2:985-991, 1996
15. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, et al. Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. Cancer Res 55:5038-5042, 1995
16. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. J Clin Oncol 16:1207-1217, 1998
17. Vinolas N, Molina R, Galan MC, et al. Tumor markers in response monitoring and prognosis of non-small cell lung cancer: preliminary report. Anticancer Res 18:631-634, 1998
18. Wistuba II, Lain S, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. J Natl Cancer Inst 89:1366-1372, 1997
19. Zalcman G, Schlichtholz B, Trenadiel J, et al. Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. Clin Cancer Res 4:1359-1366, 1998
20. Zou Y, Zong G, Ling YH, et al. Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. J Natl Cancer Inst 90:1130-1137, 1998