

POLYMORFIZMUS GÉNU P 53 A APOPTÓZA U PACIENTOV S NÁDORMI PĽÚC - NAŠE SLEDOVANIE.

POLYMORPHISM OF GEN P53 AND APOPTOSIS IN PATIENTS WITH MALIGNANT LUNG DISEASE – OUR OBSERVATION.

SAUKA C.¹, KOHÚT A.², KUNDRÁT I.¹, JANÍK M.¹

¹II. CHIRURGICKÁ KLINIKA, FN L.PASTEURA, KOŠICE, SLOVENSKÁ REPUBLIKA

²ÚSTAV FARMAKOLÓGIE LF UPJŠ, KOŠICE, SLOVENSKÁ REPUBLIKA

Súhrn

Východisko: Mnohé dokázané zmeny v genómoch buniek sú dávane do súvislosti so vznikom nádorov. Apoptóza, „programovaná“ smrť bunky, ktorá je morfológicky odlišná od nekrózy, je jedným z kontrolných mechanizmov delenia buniek a taktiež sa podieľa na tumorigéneze. **Metódy a výsledky:** Autori prezentujú svoje výsledky sledovania polymorfizmu génu p53 a úrovne apoptózy v skupine pacientov s potvrdenými malígnymi ochoreniami pľúc. Z porovnávaní genetického polymorfizmu génu p53 pacientov so zdravými jedincami vyplýva že rozloženie alel BstUI A2 a MspI A1 bolo spojené s pľúcnym karcinómom. U pacientov s karcinómom pľúc je apoptóza periférnych lymfocytov signifikantne zvýšená. Zo skupiny nemalobunkových (NSCLC) nádorov bola najvyššia u adenokarcinómov. Úroveň apoptózy bola taktiež sledovaná v korelácii s polymorfizmom génu p53. Výrazne zvýšenie apoptotických buniek sa zistilo u homozygotov BstUI 2/2 a MspI 2/2. Ako reakcia na chirurgický zákrok sa apoptóza lymfocytov v prvý aj druhý deň po operácii výrazne zvýšila. Sledované boli preto aj počty lymfocytov v periférnej krvi. Absolútne aj relatívne počty lymfocytov v diferenciálnych krvných obrazoch operovaných pacientov boli nižšie. **Záver:** Sledovanie polymorfizmu známych génov poukazuje na riziko ochorenia nádorom. Spolu so sledovaním úrovne apoptózy by mohlo dotvárať komplexnosť obrazu nádorového ochorenia pľúc či pomáhať určovať jeho prognózu.

Kľúčové slová: apoptóza, genový polymorfizmus, gén p53, malígne ochorenie pľúc

Summary

Backgrounds: Many proved alterations in genomes of cells are said to be related to tumorigenesis. Apoptosis - a “programmed” death of cell, which has different morphology from necrosis, is one of the control mechanisms of cell division and participates in tumorigenesis. **Methods and material:** The authors present their results of analysis of the relation between genetic polymorphism of the p53 gene and the level of apoptosis in patients with confirmed malignant lung disease. Comparison of genetic polymorphism of the p53 gene in patients with the healthy group showed that allocation of BstUI A2 and MspI A1 alleles was significantly related to lung cancer. The apoptosis of peripheral lymphocytes was significantly increased in lung cancer patients. The highest increase of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) group was found in adenocarcinomas. The level of apoptosis was also studied in correlation to polymorphism of the p53 gen. Substantially higher percentage of apoptotic cells was detected in BstUI 2/2 and MspI 2/2 homozygotes. In response to operation a distinctive increase of apoptosis in the first and second postoperative day was recorded. Therefore a lymphocyte count in peripheral blood was also monitored. The lymphocyte count in patients that underwent the operation proved a decrease in absolute and relative values. **Conclusion:** Observation of known genetic polymorphisms indicates the risk of malignant disease. Together with the analysis of level of apoptosis it may add to complexity of the nature of malignant disease or serve as determinants of its prognosis.

Key words: apoptosis, genetic polymorphism, gene p53, lung cancer

Úvod

Štúdium ľudských neoplázií dokázalo, že nádorové ochorenie vzniká akumuláciou poškodení bunkových génov. Tieto zmeny postihujú hlavné tri skupiny génov: protoonkogény a/alebo antionkogény a gény zodpovedné za opravu DNA. Detekcia mutácií nádorových supresorových génov (antionkogénov) sa využíva pri stanovení dedičných predispozícií k vzniku nádoru v rodinách s vysokým výskytom niektorých ochorení. Molekulárna diagnostika pritom umožňuje detekciu aj ojedinelých nádorových buniek.

Využívajú sa pritom mutácie, ktoré sú charakteristické i pre väčšinu ľudských sporadických nádorov. Ide najmä o potvrdenie mikrosatelitovej nestability, detekciu mutácií v onkogéne RAS či mutácií v nádorových supresorových génoch (1,2).

Medzi najčastejšie genetické mutácie nádorov ľudí patria tie, ktoré postihujú antionkogén p53 nachádzajúci sa na chromozóme 17q11. Funkčným produktom génu p53 je jadrový fosfoproteín p53 prítomný vo väčšine zdravých tkanív. Jeho tzv. divoký typ riadi mechanizmom supresie

a podporou diferenciácie procesy proliferácie a apoptózy. Práve strata alely na chromozóme 17 a bodové mutácie génu p53 sú častými genetickými zmenami pri malígnych ochoreniach. Mutácia génu vedie k zvýšenej produkcii mutantného p53, ktorý stráca supresorovú aktivitu divokého typu, funguje ako inaktívny p53 proteín či nadobúda transformačnú aktivitu. Imunohistochemickými metódami sa zvýšená prítomnosť mutantného typu p53 zisťuje vo vyše 50% primárnych karcinómov mliečnej žľazy, pľúc, čreva, ale aj pri iných malígnych ochoreniach. Napríklad zvýšená produkcia mutantného p53 pri karcinóme prsníka koreluje s nízkou diferenciáciou nádorov, chýbaním ER a ukazuje sa ako nepriaznivý prognostický faktor s kratším prežívaním. Pomocou metód molekulovej genetiky je možné dokázať genetické variácie samotného génu p53. Ide o recesívny gén a pre ovplyvnenie jeho funkcie nepostačuje zmena jednej alely. U väčšiny ľudských nádorov sa našla inaktivácia oboch alel génu p53. Keďže mutácia sa nachádza v každej bunke je možné ju sledovať v bunkách lymfocytov z periférnej krvi, z ktorých sa izoluje DNA na ďalšiu analýzu.

Apoptóza je „programovaná“ smrť bunky, morfológicky odlišná od nekrózy, pasívneho spôsobu bunkovej smrti (3). Tak ako mechanizmy proliferácie a diferenciácie buniek je aj apoptóza považovaná za jeden z kritických bodov bunkovej kontroly. Defekty v procesoch kontroly bunkovej smrti môžu predĺžiť životný cyklus buniek a prispieť k neoplastickej bunkovej expanzii.

V práci bol hodnotený vzťah genetického polymorfizmu génu p53 ku jednotlivým typom nádorov a jeho korelácia s mierou apoptózy a nekrózy lymfocytov u pacientov s karcinómom a vzorkami krvi zdravých jedincov. Taktiež reakcia na operáciu pacientov zmenou úrovne apoptózy a počet lymfocytov v diferenciálnom krvnom obraze pred operáciou a po nej.

Metodika

Vyhodnocovali sme náhodne vzniknutý súbor pacientov, u ktorých bolo dokázané malígne ochorenie pľúc v rokoch 1998 až 2003 vo FN L. Pasteura v Košiciach. U pacientov sa spravili kompletne klinické a laboratórne vyšetrenia a zároveň sa urobili odbery krvi na stanovenie polymorfizmu génu p53 a úrovne apoptózy. Tieto vyšetrenia boli robené v Ústave farmakológie LF UPJŠ. Zo zdravotníckej dokumentácie menšieho súboru pacientov, ktorí boli operovaní na II. chirurgickej klinike sme porovnávali počty lymfocytov v periférnej krvi. (Nie všetci diagnostikovaní pacienti boli indikovaní k operácii a časť z indikovaných mohla byť operovaná v inom zdravotníckom zariadení).

Vyšetrované súbory

Do nášho sledovania bolo zaradených 109 pacientov s histologicky potvrdenou diagnózou malígneho ochorenia v pľúcach vo FN L. Pasteura. Stanovenie genetického polymorfizmu p53 a úrovne apoptózy bolo urobené pred začatím liečby. V súbore bolo 84 mužov a 25 žien a ich priemerný vek bol 61,6 rokov (41 - 79). Kontrolné skupiny na štúdium genetického polymorfizmu tvorilo 113 vzoriek na sledovanie apoptózy 25 krvných vzoriek zdravých darcov.

V ďalšom súbore pacientov, kde bola sledovaná úroveň apoptózy a jej vzťah ku chirurgickej liečbe bolo zarade-

ných 15 pacientov (mužov) s pľúcnym karcinómom. Krvné vzorky boli odobraté jeden deň pred operáciou a potom v prvý a druhý deň po operácii.

Počty lymfocytov pred a po operácii sme hodnotili z dokumentácie 32 operovaných pacientov.

Stanovenie polymorfizmov génu p53

1. Izolácia DNA: DNA bola izolovaná z 5 ml periférnej krvi s prídavkom 0,5 ml 0,5M EDTA, použitím tzv. vysokotlačovej metódy.

2. Reštrikčná analýza polymorfizmov p53: Na detekciu p53-BstUI v exóne 4 na kodóne 72 bola použitá reštrikčná endonukleáza BstUI. Na detekciu p53-MspI v intróne bola použitá reštrikčná MspI. Na základe reštrikčnej analýzy sú pre obidva polymorfizmy definované alely označované ako A1 a A2.

Stanovenie apoptózy

Ku stanoveniu úrovne apoptózy sa použila metóda založená na farbení fosfatidylserínu Anexínom v (jeho externalizácia je súčasťou apoptotických zmien bunky) a na súčasnom určení smrti nekrozou (farbenie pomocou propidium iodidu). Detekcia buniek bola robená prietokovou cytometriou.

Počítanie lymfocytov

Na vyšetrenie krvi sa vo FN L. Pasteura používa automatický analyzátor KX-21N. Výsledky vytlačí vo forme diferenciálneho krvného obrazu. Hodnotili sme absolútne aj percentuálne počty lymfocytov.

Štatistické hodnotenie

Na štatistické vyhodnotenie sme použili Studentov t-test. Na vyhodnotenie genetického polymorfizmu bol použitý Personov χ^2 -test. Frekvencia alel bola hodnotená podľa Hilla (Hill, 1974). Pri výpočtoch bol použitý software ARCUS QUICKSTAT Biomedical ver.1. 1. Štatistické vyhodnocovanie počtu lymfocytov sa robilo Wilcoxonovým párovým testom.

Výsledky

Distribúcia genotypu a frekvencia alely A1 a A2 pri dvoch polymorfizmoch u zdravých jedincov a u pacientov s pľúcnym karcinómom sú zhrnuté v tabuľke 1. V obidvoch skupinách (zdraví aj pacienti) sme pozorovali zhodu s Hardy – Weinbergovou rovnicou. Vo výskyte polymorfizmu BstUI a MspI nebol významný rozdiel. Avšak rozloženie BstUI A2 a MspI A1 alel bolo spojené s pľúcnym karcinómom.

Polymorfizmus		p53 typ			A 1 A 2	χ^2 HW	N
		1 - 1	2 - 1	2 - 2			
BstUI	Kontroly	15	45	53	0,332 0,668	1,1748	113
	Pacienti	5	51	53	0,280 0,720 ^a	2,8199	109
MspI	Kontroly	3	24	86	0,133 0,867	0,6773	113
	Pacienti	1	36 ^c	72	0,174 ^b 0,833	2,3739	109

Tabuľka č. 1: Genetický polymorfizmus p53 (porovnanie pacientov a zdravých ľudí).

Rozdiely vo frekvencií alel zdraví vs. pacienti ^aP= 0,234, ^bP = 0,224. Rozdiely v distribúcii genotypu: χ^2 - test. Heterozygoti vs. homozygoti ^cP = 0,048 Distribúcia genotypu p53 BstUI A2 a MspI A1 sa spája s pľúcnym karcinómom. Pri významnosti p < 0,05 je ^cP = 0,048.

V tabuľke 2. sú údaje o distribúcii genotypu MspI vo vzťahu k histologickej skupine pľúcného karcinómu: malobunkový a nemalobunkový rozdelený na tri podskupiny: skvamózný, veľkobunkový a adenokarcinóm. Iba u MspI heterozygotov bola asociácia s výskytom adenokarcinómu OR 3,24 (P = 0,038). MspI heterozygoti v iných skupinách boli spojené s vyšším výskytom, ale štatisticky ne-signifikantným.

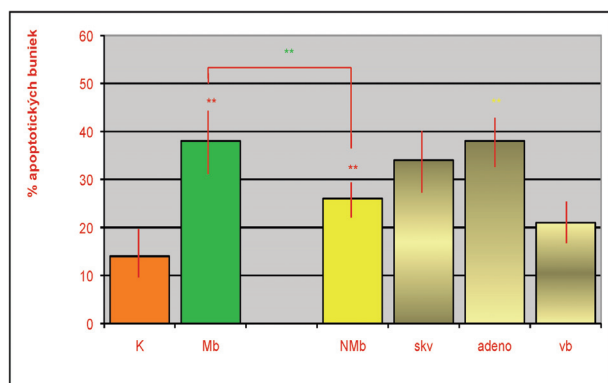
Typ karcinómu	P 53- MspI typ			P	OR 95% CI
	1-1	2-1	2-2		
Malobunkový	0	5	7	0,112	2,65 0,77-9,09
Skvamózný	1	23	53	0,176	1,60 0,81-3,07
Veľkobunkový	0	1	4	-	2,94
Adenokarcinóm	0	7	8	0,038	3,24 1,07-9,85

Tabuľka č. 2: Výskyt typu karcinómu vo vzťahu k MspI A1/A2 genotypu. Typ karcinómu vo vzťahu k MspI A1/A2 genotypu. Iba u MspI heterozygotov bola asociácia s výskytom adenokarcinómu: OR 3,24 - vyznačená v tabuľke hrubšie (95% CI hodnota 1,07-9,85), pri významnosti $p < 0,05$ sa $P = 0,038$.

Typ operácie	Počet pacientov
Lobektómia	15
Pneumonektómia	5
Resekcia menšieho rozsahu (cuneiformis, tangentialis)	4
Torakotómia exploratíva	4
Videotorakoskopia (VTS), biopsia, talkáž	4

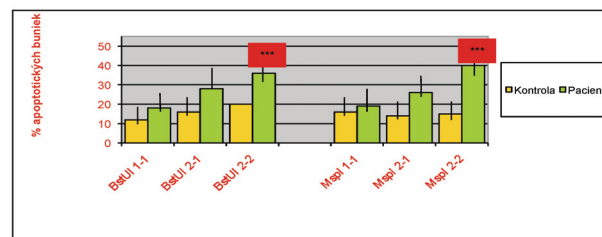
Tabuľka č. 3: Rozdelenie podľa typov operácií

Apoptóza periférnych lymfocytov bola signifikantne vyššia u pacientov s malobunkovým i nemalobunkovým karcinómom v porovnaní so zdravými. V skupine nemalobunkových nádorov bola najvyššia pri adenokarcinómoch.



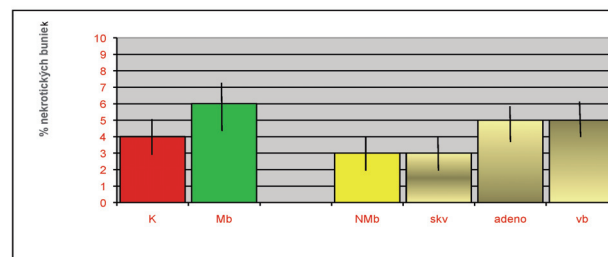
Graf č. 1: Apoptóza periférnych lymfocytov. Vzťah medzi typom pľúcného karcinómu a mierou apoptózy. K (kontrola), Mb (malobunkový), NMb (nemalobunkový), skv (skvamózný), adeno (adenokarcinóm), vb (veľkobunkový). Údaje na grafe ukazujú, že apoptóza periférnych lymfocytov je signifikantne vyššia u pacientov s Mb karcinómom v porovnaní so zdravými. V skupine s NMb je vyššia tiež, ale nie natoľko ako v skupine Mb. Z nemalobunkových nádorov je najvyššia u adenokarcinómu ($p < 0,01$).

Z hľadiska korelácie miery apoptózy k jednotlivým genotypom antionkogénu p53 bolo signifikantné zvýšenie apoptózy pozorované iba u pacientov s karcinómom pľúc pri genotypy BstUI 2-2 a MspI 2-2.



Graf č. 2: Korelácia medzi mierou apoptózy a p53 genotypom. Miera apoptózy lymfocytov s ohľadom na p53 genotyp u kontrolných osôb a u pacientov. Signifikantné zvýšenie apoptózy ($p < 0,001$) bolo pozorované u pacientov s karcinómom pľúc pri genotypy BstUI 2-2 a MspI 2-2.

Na rozdiel od apoptózy podľa výsledkov percenta nekrotických lymfocytov nedošlo ku štatisticky významnému zvýšeniu nekroz lymfocytov u pacientov s nádorom pľúc v porovnaní so zdravými. I keď v niektorých typoch nádorov percento nekrotických lymfocytov kolísalo, ani v jednej skupine nádorov nebol rozdiel signifikantný.

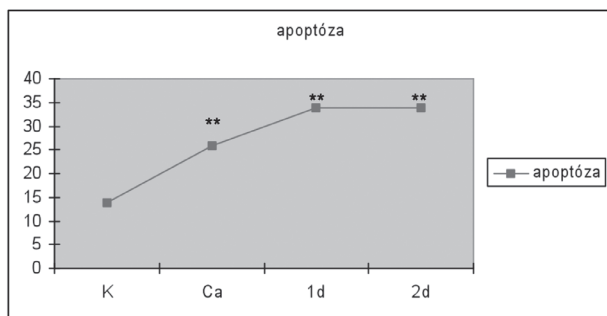


Graf č. 3: Nekróza lymfocytov u kontrol a u pacientov s pľúcnym karcinómom. Nekróza lymfocytov u kontrol a u pacientov s pľúcnym karcinómom. Percentá nekrotických buniek vo vzťahu k typu karcinómu. K -kontrola, Mb -malobunkový, NMb -nemalobunkový karcinóm, skv - skvamózný, adeno - adenokarcinóm, vb - veľkobunkový karcinóm. Aj keď v jednotlivých typoch karcinómov je nekróza periférnych lymfocytov rôzna, ani v jednom prípade nebola odchýlka štatisticky významná pri $p < 0,01$.

Po operácii sa úroveň apoptózy zvýšila. V porovnaní s kontrolnou skupinou (14,1) bola u pacientov s karcinómom pľúc vyššia už pred operáciou a po nej sa ešte zvýšila z 26,2 na 34,1 v prvý deň, resp. 34 v druhý deň po operácii. Rozdiel absolútneho počtu lymfocytov pred operáciou a po operácii bol u oboch skupín nádorov signifikantný. V percentuálnych hodnotách bol pokles lymfocytov u malobunkových nádorov z 27,23 % na 18,46 % a nemalobunkových z 19,57 % na 14,49 % - štatisticky významný bol iba u nemalobunkových nádorov.

Diskusia

Definitívne diagnózu karcinómu pľúc určí histologické vyšetrenie. Informácie z histopatologického vyšetrenia nádorových buniek a zo zistenia nádorovej infiltrácie okolitých lymfatických tkanív sú základom určenia „gradingu“.



Graf č. 4: Zmeny apoptózy periférnych lymfocytov pred a po operačnom zákroku

Apoptóza periférnych lymfocytov pred a po operácii v prvý a druhý deň ($p < 0.001$). Hodnoty u kontrolnej skupiny (K), u vybraných pacientov s karcinómom pľúc (Ca) **, 1. deň po operácii (1.d) ** a druhý deň po operácii (2d). ** Apoptóza periférnych lymfocytov bola vyššia u pacientov s karcinómom aj pred operáciou a po nej sa ešte zvýšila z 26,2 na 34,1 v prvý deň, resp. 34 druhý deň po operácii ($p < 0.001$).

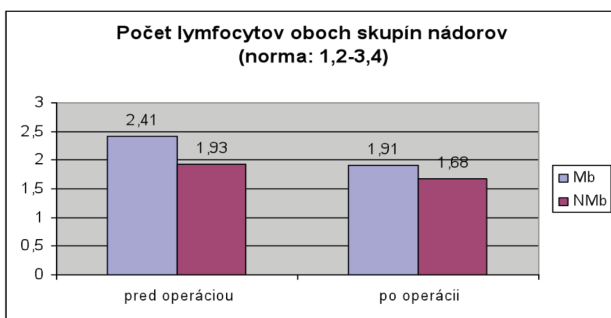
Dvojice premenných	Wilcoxonov párový test (data)			
	Označené testy sú významné na hladine $p < 0,05$			
Abs pred & Abs po	Počet platných	T	Z	Úroveň p
	26	76,00000	2,527099	0,011501

Tab. č. 4: Vzor hodnotenia štatistickej významnosti zmien počtu lymfocytov operovaných pacientov ($n = 32$); Absolútny počet lymfocytov. Hodnotenie absolútneho počtu lymfocytov pred a po operácii u nemalobunkových (NMB) nádorov. Rozdiel absolútneho počtu lymfocytov pred operáciou a po operácii bol u oboch skupín nádorov významný (NMB = 0,011501) u malobunkových (Mb): $n = 6$, $P = 0,027709$.

Dvojice premenných	Wilcoxonov párový test (data)			
	Označené testy sú významné na hladine $p < 0,05000$			
Rel pred & Rel po	Počet platných	T	Z	Úroveň p
	26	57,50000	2,825226	0,004725

Tabulka č. 5: Relatívny počet lymfocytov

Percentuálne zastúpenie počtu lymfocytov v diferenciálnom KO u NMB nádorov pred operáciou a po operácii. Rozdiel zastúpenia lymfocytov v diferenciálnom krvnom obraze u NMB nádorov bol významný ($P = 0,0047$). Pozn.: podobný výpočet u malobunkových (Mb, $n = 6$, $P = 0,074736$ pri $p < 0.05$) nebol významný.



Graf č. 5: Absolútny počet lymfocytov pred operáciou a po operácii. Absolútny počet lymfocytov u sledovaných pacientov v závislosti od operácie pri rozdelení na dve hlavné skupiny: malobunkový karcinóm (Mb) a nemalobunkový karcinóm (NMB).

Úlohou nádorových markerov je z hľadiska diferenciálnej diagnostiky určiť či príčinou klinických prejavov pacienta je nádorový proces. Pri nádoroch pľúc sa vyšetrujú: CYFRA 21-1, produkovaný epidermoidnými a veľkobunkovými karcinómami, CEA (adenokarcinómami) a TPS (nediferen-

Č.pac.	Druh operácie	Histologický nález	Štádium	Pohl.
1.	resectio cuneif.ex lobo inf.dx.	stredne dif.epiderm.Ca	III.A	žena
2.	thoracotomia explorativa	epidermoid. Ca + fluidoth.	III.B	muž
3.	pneumonektomia I.dx.	epidermoidný karcinóm	III.A	muž
4.	lobectomia inf.I.sin.	stredne difer.adenokarcinóm	II.A	žena
5.	VTS, talkáž	epidermoid. Ca + fluidoth.	IV.	muž
6.	pneumonektomia I.dx.	bronchioloalveolový Ca	III.A	muž
7.	lobectomia sup.I.sin./+pericard/	epidermoidný karcinóm	III.A	muž
8.	lobectomia inf.I.sin.	nizkodiferenc.epiderm.Ca	II.A	muž
9.	lobectomia sup.I.sin.	Adenocarcinoma	II.A	žena
10.	pneumonektomia I.dx.	epidermoidný karcinóm	III.B	muž
11.	pneumonektomia I.sin.	nizkodiferenc.epiderm.Ca	III.B	muž
12.	lobectomia sup.I.sin.	Adenocarcinoma	III.B	muž
13.	thoracotomia explorativa I.sin.	epidermoidný karcinóm	IV.	muž
14.	res.tang.ap.pulm.via VATS I.dx.	nizkodiferenc.epiderm.Ca	III.A	muž
15.	lobectomia sup.I.sin.	epidermoidný karcinóm	III.A	muž
16.	resectio cuneif.ex.lobo sup.dx.	epitelial.Tu.v.s.MTS urin.	IV.	muž
17.	pneumonektomia I.dx.	nizkodiferenc.epiderm.Ca	III.A	muž
18.	VTS et biopsio	nizkodifer. epidermoidný	IV.	muž
19.	VTS, talkáž	adeno Ca, carcinomat. pleur.	IV.	muž
20.	lobectomia inf.I.dx.et ap.pulm.	epidermoidný karcinóm	III.A	muž
21.	VTS, talkáž	epiderm.Ca.mts pleurae	IV.	muž
22.	lobectomia inf.I.sin.	adenocarcinoma, stredne dif.	II.A	žena
23.	lobectomia sup.I.sin.	bronchioloalveolový Ca	II.B	muž
24.	lobectomia sup.I.sin.	epidermoidný karcinóm	II.B	muž
25.	lobectomia sup.I.dx.	epidermoidný karcinóm	I.A	muž
26.	lobectomia sup.I.dx.s.Paulson	adenoCa, mts cerebelli	IV.	muž
27.	thoracotomia probatoria I.sin.	nediferencovaný Mb	III.B-ext.	muž
28.	resectio cuneiformis	MTS malobunkového Ca	III.B-ext.	muž
29.	lobectomia inf.I.dx.	Mts malobunkového Ca	III.B-ext.	muž
30.	lobectomia inf.I.dx.	Mb karcinóm, MTS medias.	III.A-ext.	žena
31.	lobectomia sup. pulm.dx.	nediferenc.Mb karcinóm	III.B-ext.	muž
32.	Excisio tumoris et lobo sup.sin.	nádor neuroendokrin. typu	III.A	žena

Tabulka č. 6: Histologické nálezy a štádia ochorenia operovaných pacientov

covanými karcinómami). Doplnkovým markerom je CA 125 (stupeň poškodenia pleurálneho mezotelu) a enoláza špecifická pre neurón (NSE) pri podozrení na malobunkový karcinóm. Všetky tieto markery sú však nedostatočne citlivou a málo špecifickou metódou pre skríning. Používajú sa na určenie prognózy ochorenia, monitorovanie úspešnosti liečby, progresie, či recidívy ochorenia s hľadáním prípadných metastáz pri pravidelnom hodnotení stavu pacienta so sledovaním dynamiky markerov (1,4,5).

Predpokladá sa že detekcia zmien v génoch (molekulárny „staging“) ako doplnok k histopatologickému vyšetreniu bude významným príspevkom k presnejšiemu stanoveniu prognózy, k určeniu vhodnej terapie a predpokladom pre možnosť aplikácie netoxickej protinádorovej liečby. Molekulárna diagnostika umožňuje detekciu ojedinelých nádorových buniek v ľahko dostupných tkanivách. Hľadanie stupňa rizika tumorigenézy na molekulárnej a genetickej úrovni a sledovanie markerov, ktoré môže poukázať na liečebný efekt aplikovanej liečby je perspektívou. Ľudský genóm obsahuje 30 000 - 40 000 génov. V pľúcach je exprimovaných 15 500, aktívnych v nádoroch je 12 488. o genetickej predispozícii sa hovorí keď zárodočné bunky obsahujú mutovaný nádorový supresorový gén (ani-onkogén), poškodený gén systému opravy DNA, alebo výnimočne mutáciou zmenený onkogén. Následné ďalšie mutácie alebo fenotypové zmeny vedú k vzniku malígneho nádoru. Seriálna skríningová analýza by vyžadovala veľmi nákladnú sekvestráciu celého genómu. Na detekciu mutácií v génoch zodpovedných za predispozíciu k vzniku nádoru sa využívajú rôzne techniky a výber metódy závisí od charakteru predpokladanej mutácie. Detekcia mutácií anti-onkogénov sa využíva pri stanovení predispozície k vzniku nádoru v rodinách s vysokým výskytom ochorenia (gény pre Ca prsníka – BRCA 1 a 2, familiárna polypóza kolónu - APC). Hľadajú sa ale aj mutácie, ktoré sú charakteristické

pre väčšinu ľudských sporadických nádorov. Najmä stanovenie mikrosatelitovej nestability, detekciu mutácií v onkogéne RAS a mutácií v nádorových supresorových génoch p53, APC, DPC 4 a p16.

Medzi najčastejšie genetické mutácie nádorov ľudí patria zmeny antionkogénu p53 (6,7,8). Tento gén je negatívnym regulátorom prechodu G1/S fázy bunkového delenia. Hlavnou biochemickou funkciou nemutovanej formy proteínu p53 (wild type p53) je kontrola normálneho priebehu bunkového cyklu reguláciou transkripcie a DNA replikácie. U väčšiny ľudských nádorov, aj u rakoviny pľúc, sa našla inaktívacia oboch alel génu p53. Napríklad simultánny nález abnormalít v Rb systéme (zvlášť overexpresia Cyclin D1) a mutácií génu p53 podporuje genetickú príčinu diagnózy malignómu a signifikantne zhoršuje prognózu (9,10).

V práci sme sledovali genetický polymorfizmus génu p53, jeho vzťah k jednotlivým typom nádorov v pľúcach a koreláciu s mierou apoptózy a nekrózy lymfocytov. DNA sa na analýzu izolovala z krvných lymfocytov. Asociácia polymorfizmu génu p53 BstUI a MspI genotypu s rôznymi druhmi karcinómov už bola v minulosti sledovaná. Kawajiri a spol. (11) v roku 1993 zistili spojenie tohto polymorfizmu so zvýšeným výskytom pľúcneho karcinómu. Vo švédскеj štúdií Birgander s kolektívom (12) podobný vzťah nepozorovali. Naše pozorovanie je v súhlase s prvou štúdiou. Pri stanovení p53 haplotypu sa ukázal zaujímavý fenomén. Haplotyp BstUI A2 a MspI A1 alela, ktorý bol vo švédскеj štúdií nájdený len v 1,2%, sa v našom pozorovaní vyskytol v 5,4% u pacientov s karcinómom pľúc a vôbec nebol prítomný v kontrolnej skupine.

Kerr navrhol pojem apoptóza, (1,2,13,14) pre „programovanú“ smrť bunky, ktorá je morfológicky odlišná od nekrózy, pasívneho spôsobu bunkovej smrti. Podobne ako mechanizmy proliferácie a diferenciácie je apoptóza považovaná za kritický bod bunkovej kontroly. Defekty v procesoch kontroly bunkovej smrti môžu predĺžiť životný cyklus buniek a tým prispievať k neoplastickej bunenej expanzii. Úroveň apoptózy sme hodnotili v súbore pacientov s nádormi v hrudníku a porovnávali s kontrolnou skupinou zdravých ľudí. Vo výsledkoch sa potvrdili signifikantné rozdiely, najvýraznejšie u adenokarcinómov.

Dôležitý je tiež vzťah apoptózy ku genetickému polymorfizmu génu p53, ktorý je „strážca genómu“. Jeho produkt, protein p53 zastavuje bunkový cyklus a je schopný aj nepriamo spúšťať apoptózu. V našom súbore korelácia medzi mierou apoptózy a polymorfizmom BstUI / MspI génu p53 odhalila signifikantne vyššie percento apoptotických buniek u homozygotov BstUI 2/2 a MspI A2/A2 v porovnaní s heterozygotmi A1/A2.

Niektorí autori považujú sledovanie expresie p53, ako odpovede na rádioterapiu či chemoterapiu za vhodný marker. Iní však, práve pre vysokú frekvenciu mutácií p53 u potvrdennej rakoviny pľúc, kde je vysoká pravdepodobnosť narušenia niektorých funkcií sprostredkovaných génom p53, úlohu tohto génu ako markera reakcie na liečbu neodporúčajú (15). Existujú aj úvahy o možných mediátoroch, ktoré stabilizujú proteín p53 práve v nádorových bunkách a to v línii buniek nemalobunkového nádoru pľúc (16). Mnohé nádorové bunky aj s defektnými génmi p53 si pritom zachovávajú apoptózovú aktivitu. Táto sa preto už stáva aj potenciálnym cieľom chemoterapie v liečbe rakoviny (17, 18).

Ako pozitívnu reakciu na stres si vysvetľujeme naše zistenie, že po operačnom zákroku dochádza k indukovanej apoptóze periférnych lymfocytov. Je možné uvažovať aj o imunologických mechanizmoch alebo bezpríznakovnej pooperačnej zápalovej reakcii. Súbor pozostával z pacientov v rôznom štádiu ochorenia, niekoľkí mali aplikovanú aj onkologickú liečbu, boli tam aj pacienti s MTS či s maligným výpotkom. Či bolo aj zníženie počtu lymfocytov v periférnej krvi s tým spojené sa dá iba predpokladať, avšak z retrospektívnej analýzy diferenciálnych krvných obrazov u operovaných pacientov je zrejmé, že sa absolútny aj relatívny počet lymfocytov znížil.

Záver a využitie pre klinickú prax

Porovnanie polymorfizmu BstUI a MspI antionkogénu p53 u pacientov s nádormi v hrudníku so zdravými jedincami v našom súbore ukázalo že rozloženie BstUI A2 a MspI A1 alel bolo spojené s pľúcny karcinómom. Takáto genetická konfigurácia by sa mohla považovať za predispozíciu k tumorigenéze.

Apoptóza periférnych lymfocytov u pacientov s nádormi v hrudníku bola v porovnaní so zdravou populáciou zvýšená. Pritom najviac apoptotických buniek bolo u homozygotov BstUI 2/2 a MspI 2/2.

Zrejme ako reakcia na operáciu sa apoptóza periférnych lymfocytov krvi v našom súbore pacientov po operácii zvýšila čo sme chápali ako priaznivú odpoveď organizmu. Zrejme iba ďalšie sledovania ukážu či je možné úroveň apoptózy hodnotiť ako pozitívny marker prežívania pacientov o čom bolo v jednotlivých prácach diskutované (18,19).

S apoptózou hypoteticky spojené znížené hodnoty absolútneho aj percentuálneho počtu lymfocytov v periférii sú v diferenciálnom krvnom obraze ľahko dostupné a ich pokles bol v našej práci štatisticky významný (v relatívnom počte iba v skupine nemalobunkových nádorov).

Literatúra:

1. Kaušitz, J., Altaner, Č., a spol.: Onkológia, VEDA, Bratislava, s. 712, 2003, ISBN 80-224-0711-9
2. Sugio, K., Ishida, T. et al.: Ras gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung without lymph node metastasis. Cancer Research 1992, vol 52, p 2903-2906
3. Rejthar A., Vojtěšek B.: Obecná patológia nádorového rastu, Grapa Publishing s.r.o., s. 208, 2002, ISBN 80-247-0238-X,
4. Trnovec, T., Dzúrik, R.: Štandardné diagnostické postupy, Osveta, Martin, s. 832 1998, ISBN 80-88824-84-2
5. Martinčok, D.: Diagnostika nádorov obličiek, Klinická onkológia, 1996, zvl. č. 27
6. Bennett, W.P., Colby, T.V., Travis, W.D. et al.: p53 protein accumu-

- lates frequently in early bronchial neoplasia .Cancer Res.,vol.53, 4817- 4822, 1993
7. Kaye, F. J., Chen, W., Khleif, S. N., Otterson G. A.: Lung Cancer : Molecular and cellular abnormalities. Encyclopedia of Cancer .Academic Press Inc,1004-1014, 1997.
 8. Harpole, D. H., Herndon, J. E., Wolfe, W.G.,et al.: a prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. Cancer Research 55 (1): 51-56, 1995
 9. Kirsch, D. G., and Kastan M. B.: Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. J. Clin. Oncology, vol. 16,p. 3158-3168, 1998
 10. Burke, L., Flieder D.B., Guinee D.G., Brambilla E., Freedman A.N., Bennet W.P., Jones R.T., Borkowski A., Caporaso N.A., Flemin M., Trastek V., Pairolero P., Tazelaar H., Midt-hun D., Jett J.R. Liotta L.A., Travis W.D., Harris C.C.: Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. Clin.Cancer Res., 2005 Jan. 1, 11(1):232-241.
 11. Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J., Hayashi, S.: Germ line polymorphisms of p 53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. Carcinogenesis, 16, 1085 - 1089, 1993
 12. Birgander, R., Sjölander, A., Rannug, A.: P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. Carcinogenesis, 16, 2233 - 2236, 1995
 13. Hoffmann, B., Liebermann, D.A.: Molecular controls of apoptosis. Oncogene; vol. 226, p. 1097-1099, 1994
 14. Kohút, A., Mirrossay, L., Kalina, I.: Apoptóza – aktuálny problém života a smrti buniek. Slovenský lekár; vol.5-6, p.65-68, 1998
 15. Viktorson, K., De-Petris, L., Lewensohn, R.: The role of p53 in treatment responses of lung cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. ,Jun 10, 331(3): 868-880, 2005
 16. Yamauchi, M., Suzuki K., Kodoma S., Watanabe M.: Abnormal stability of wild-type p53 protein in human lung carcinoma cell line. Biochem.Biophys.Res.Comm., May 6 330 (2),p. 483-488, 2005
 17. Mashima T., Ohhara T., Sato S., Mochizuki M., Sugimoto Y., Yamazaki K., Hamada J., Tada M., Moriuchi T., Ishikawa Y., Kato Y., Tomodo H., Yamori T., Tsuruo T.: p53- defective tumors with a functional apoptosome - mediated pathway : a new therapeutic target. J. Natl. Cancer Inst. May 18, 97(10): 765 - 777, 2005.
 18. Tamm, I., Wang, Y. et al.: IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases and anticancer drugs. Cancer Research;vol.58, p. 5315-5320, 1998
 19. Volm, M., Koomagi, R.: Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small-cell lung cancer for patient survival. British Journal of Cancer. vol.82, p. 1747-1754, 2000

Korespondenční adresa:

MUDr. Sauka Cyril

II. chirurgická klinika, FN L. Pasteura v Košiciach

tel.: +421 556 152 140

e-mail: cyril.sauka@yahoo.com

Došlo / Submitted: 1. 2. 2008

Přijato / Accepted: 6. 3. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.