

# Съвременни методи за ранна диагностика на белодробен карцином

Д-р Рагостина Чернева, доц. Огнян Георгиев, доц. Даниела Петрова

Клиника по пропедевтика на вътрешните болести, УМБАЛ „Александровска“, София

## Резюме

Въпреки значителния напредък в областта на конвенционалните методи за ранна диагноза (спирална томография, PET, LIFE – бронхоскопия), белодробният карцином продължава да бъде водеща причина за смъртност сред злокачествените новообразувания. Причина за това са от една страна късното диагностициране на заболяването и от друга – липсата на ефикасни химиотерапевтични режими за лечение му. Неуспехът на до момента използваните класически подходи и разбирането на същността на канцерогенезата като молекулярно-генетично заболяване все повече оправдава прилагането на така наречената клинична трансляция на фундаментални науки (*clinical translation of basic science*), която се изразява в търсенето както на специфични молекулярни маркери за ранна диагноза, така и на фармакогенетични маркери за адекватна химиотерапия. Тъй като тази преориентация при третирането на проблема е в самото начало, все още не са въведени унифицирани маркери. Настоящият обзор е опит за представяне на широката аудитория на някои биологични маркери на пренеопластичните и ранните неинвазивни неопластични лезии.

До момента използваните методи за ранна диагностика на белодробния карцином (БК) включват рентгенография, компютърна томография (СТ), бронхоскопия, цитология на храчка. За съжаление нито един от тях не успява да се наложи като унифицирана стратегия за профилактика поради незадоволителна чувствителност, специфичност или финансова рентабилност, поради което белодробният карцином остава с най-висока смъртност сред злокачествените заболявания.

Периферно разположените карциноми, чиято честота в Европа е около 40%, се диагностицират успешно с помощта на СТ. Шестдесет процента от туморните лезии са централно разположени и ангажират главни и сегментни бронхи, което разкрива възможността им да бъдат диагностицирани чрез бронхоскопия или изследване на храчка. Резултатите от прилагането на тези методи обаче показват много ниска чувствителност и при над 75% от пациентите болестта се открива в напреднал стадий (III-IV), когато шансовете за успешна терапия са минимални. Ето защо стратегията при борбата с БК е насочена към откриване на асимптоматични пренеопластични и ранни неинвазивни неопластични лезии.

Благодарение на постиженията на молекулярната биология и генетика стана възможно доказването на свободни нуклеинови киселини (ДНК и РНК) с туморен произход в периферната кръв на карциномно болни. Въвеждането на високосензитивни методи за количествена оценка на нуклеинови киселини ги превръща в потенциални биологични маркери за ранна детекция на БК при високо рискови пациенти.

Счита се, че стратифицирането на риска при отделни групи пациенти на базата на неинвазивни маркери трябва да бъде първа стъпка преди прилагане на инвазивни и по-скъпи техники за диагноза, като флуоресцентната бронхоскопия и спиралната томография.

## Епидемиология

Негребноклетъчният белодробен карцином (NSCLC) е най-честата причина за смъртност сред злокачествените новообразувания. Смъртността от БК достига 30% в развитите страни<sup>7</sup>, петгодишната преживяемост е едва 15%. Причина за това е, че 75% от болните се диагностицират в напреднал стадий (III-IV), когато е налице засягане на лимфните възли или далечни метастази. Прогнозата зависи от стадия на заболяването. При пациенти в стадий IA петгодишната преживяемост е 60%, в стадий II-IV тя е между 40% и 5%.<sup>12</sup> Лошата прогноза до голяма степен се дължи на липсата на ефективни скринингови програми за ранна детекция, както и на липсата на ефективно лечение на напреднало заболяване. Значителният напредък в областта на хирургията, химио- и лъчетерапията, както и наличието на мултимодален подход при лечение на БК, не осигуряват подобрене в прогнозата и лечението му през последните 40 години.

До момента не съществува консенсус относно прилагането на рутинни скринингови програми за БК. Според Принципите на Американското онкологично дружество за ранно откриване на рака (2002) не е необходимо въвеждане на скринингови диагностични процедури за детекция на БК при асимптомни пациенти. За високо рискови пациенти се препоръчва използването на СТ, като се посочва, че рутинното ѝ прилагане не е оправдано поради висока честота на фалшиво позитивни случаи. Поради липсата на прогрес по отношение на диагнозата и лечението на NSCLC съвременните акценти насочват към определяне на риска при отделните индивиди, диагностичните принципи се изместват към въвеждане на неинвазивни методи с висока чувствителност и специфичност за откриването на маркери на пренеопластични и ранни неопластични лезии (CIS).

## Конвенционални клинични методи за ранна диагноза

### Рентгенография

Исторически единствените диагностични средства за ранна диагноза на БК са били рентгенографията и цитологията на храчка. Ефикасността им като средства за масов скрининг е била сравнена в Johns Hopkins University, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center и Mayo

Clinic. Целта на тези проучвания е била да се оцени дали е налице намаляване на смъртността при комбинирано прилагане на двата подхода. Данните сочат, че и двата метода са ефикасни за ранна диагноза на асимптоматични пациенти, но не осигуряват подобряване на преживяемостта и намаляване на общата смъртност, което не оправдава прилагането им като средства за масов скрининг.<sup>13</sup> Причина за това е ниската сензитивност на рентгенографията. Чрез нея се откриват лезии с диаметър около 1 см, когато броят на туморните клетки вече е достигнал  $10^9$  и когато вече са налице окултни хематогенни метастази.<sup>19</sup>

Цитологията на храчка се оказва също с незадоволителна чувствителност – 20-30%. Тя е по-информативна при тумори с централна локализация (плоскоклетъчен и гребноклетъчен), като чувствителността ѝ силно намалява при периферно разположени тумори. Няма единно мнение по въпроса за разпределяне на пациентите в рисков групи в зависимост от степента на атипичност, както и единно становище за определянето на риска в зависимост от цитологичната характеристика

#### **Компютърна томография**

Надежди се възлагат на спиралната СТ поради голямата ѝ разделителна способност и много по-голямата ѝ чувствителност – над 10 пъти в сравнение с конвенционалната рентгенография. Тя има предимство при детекцията на периферно разположени лезии с размери 1-5 mm и се оказва по-слабо чувствителна при откриването на централно разположени формации (по-често срещаните плоскоклетъчни карциноми). От направените до момента проучвания се подчертават предимствата на спиралната СТ за диагностика на заболяването в I стадий – 85-90% от случаите.<sup>8</sup> Данни за оценка на специфичността ѝ показват, че тя е между 48-88%<sup>15</sup>, като липсва оценка за това дали допринася за намаляване на смъртността. Недостатъците на спиралната СТ са високият брой на фалшиво позитивни случаи – 20%, и икономическата ѝ нерентабилност за въвеждането като скринингов метод.<sup>9</sup>

#### **Бронхоскопия**

Въвеждането на LIFE (Laser Induced Fluorescence Endoscopy) се основава на индуциране на автофлуоресценция на морфологично нормалния белодробен епител при облъчването му с дължина на вълната 442 nm, като се счита, че това се дължи на отразяване, генерирано от субепително разположени колагенни влакна. Всяко задебеляване на бронхиалната мукоза предизвиква липса на флуоресценция и дава възможност за диагностицирането на пренеопластични лезии на ниво на умерена и тежка дисплазия. Това прави методът потенциален скринингов подход за ранна диагноза при високо рисков групи. Данните от проведението до момента изследвания сочат по-добра чувствителност на метода – 67-80%<sup>17, 18</sup>, в сравнение с конвенционалната бронхоскопия, за сметка на по-ниска специфичност, тъй като задебеляването на вътрешния слой на бронхиалната мукоза може да е резултат и от възпалителен процес. Инвазивността на метода и липсата на категорични данни за оценка на отношението полза/риск ограничават въвеждането му като скринингов метод.

#### **Биологични маркери**

Ранната диагноза на NSCLC се оказва трудно постижима и с използваните в клиничната практика на различни маркери. По своята характеристика те са различни серумни белтъци – онкофетални антигени, хормони, адхезивни молекули.

В списъка на Working Classification of Lung Tumour Markers за NSCLC и гребноклетъчен карцином (SCLC) са изброени следните диагностични маркери: карциноембрионален антиген (CEA), тъканен полипептиден антиген (TPA), цитокератин 19 (Cyfra 21-1), тъканен полипептид-специфичен антиген (TPS), неврон-специфична енолаза (NSE), лактат-деhidрогеназа (LDH), креатинфосфокиназа BB (СРК-BB), невронална клетъчно адхезивна молекула (NCAM), разтворим рецептор на интерлеукин 2 (sIL-2R), плоскоклетъчен антиген (SCC-Ag), CA125, CA 19-9, CA 242, CA 15-3, хромозгранин А, феритин и др. Нито един от тях не се е оказал специфичен.<sup>16</sup>

Поради липса на прогрес по отношение на диагнозата и лечението на NSCLC съвременните акценти са насочени към създаването на молекулен профил на отделните етапи на белодробната онкогенеза.

#### **Биология на белодробната канцерогенеза**

Тя е многоетапен и мултицентричен процес, който се характеризира с акумулиране на молекулярни и генетични нарушения под действието на канцерогени. Молекулни лезии са налице в морфологично нормален епител на пушачи и предшвестват пренеопластичните бронхиални лезии – метаплазия, умерена, средна и тежка дисплазия, карцином *in situ*. Няма сигурни критерии за оценка на поведението на пренеопластичните лезии, тъй като дори карциномът *in situ* може както да прогресира, така и да регресира.

За момента обаче се счита, че молекулните нарушения, свързани с контрола на клетъчния цикъл или апоптозата при всяка отделна лезия, биха могли да определят хода на процеса. Въз основа на това тежката и умерената бронхиална дисплазия и карциномът *in situ* се приемат за лезии, свързани с повишен риск за прогресия към инвазивен карцином.<sup>5</sup> Тежката дисплазия и карциномът *in situ* прогресират до инвазивен карцином в 50% от случаите.<sup>2</sup> През 1999 г. WHO прие атипичната алвеоларна дисплазия като прекурсорна лезия за развитие на аденокарцином и немущинозен бронхиолоалвеоларен карцином, тъй като тя притежава идентични за тези тумори лезии – делеция на 3p, анеуплоидия, мутация на K-ras.

#### **Откриване на биологични маркери**

Патогенетичният подход при характеризирани на същността на канцерогенезата дава възможност за оценка на молекулните нарушения, които настъпват в хода на неопластичната прогресия и позволява идентифицирането на биологични маркери, характеризиращи отделните морфологични етапи на бронхиална неоплазия.

Пренеопластичните клетки се характеризират с хромозомна и микросателитна нестабилност и притежават генетични нарушения, идентични с тези, открити в туморните клетки. Такива са делециите на различни хромозоми, върху които се намират потенциални тумор-супресорни гени – 3p, 9p, 8p, 17p, свързани

пресията на *ras*, *тус*, *циклин D1* и на различни растежни фактори – *EGFR*, *FGF*, *c-met*.

Основно значение за откриването на споменатите маркери е имало приложението на имунохистохимията върху изолирани материали, провеждането на алектронизиране, откриването на микросателитна нестабилност или ДНК-секвениране. Изброените методи обаче се оказват с ограничена резолюция, позволяват едновременно анализ на един до два маркера и изискват наличие на по-големи количества туморен материал. Съвременните насоки в търсенето на маркери се основават на ползването на методи с висока резолюция (*high-throughput technologies*) като ДНК-микрочипове, сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове. Те позволяват едновременно определяне и сравнение на експресията на хиляди гени между нормална и туморна тъкан. Получените данни се верифицират върху тъканни микрочипове или с помощта на полимеразна верижна реакция в реално време. Целта е определянето на идентични и специфични молекулни нарушения, които се срещат едновременно в пренеопластичните (тежка дисплазия, карцинома *in situ*) и ранни неопластични лезии (I-II стадий), и тяхната клинична оценка като маркери за ранна диагноза на заболяването.

Като добър биологичен маркер се определя този, при който има много високо разграничение в експресията между туморна и нормална тъкан, при който степента на експресия корелира много добре с прогресията на туморогенезата и който изисква минимално инвазивна техника за получаване. В този аспект бронхиалните биопсии са подходящи за определяне на потенциални биологични маркери, но не са удачни като скринингов подход. Бронхиалният лаваж и четковата биопсия са по-малко инвазивни, но също изискват ендоскопия. Изследването на храчка е удачно като метод за диференциране на рискови групи, но изисква специални условия за събиране и съхранение на материала.

Използването на серумни маркери за диагноза на БК е един от най-разработваните проблеми в областта на молекулярната онкогенетика. Благодарение на постиженията в тази сфера, както и на разбиранията за патологията на раковите заболявания, стана възможно доказване на циркулиращи нуклеинови киселини (ДНК/РНК) с туморен произход в различни биологични течности – кръв, урина, БАЛ.<sup>10</sup> Тъй като генетичните и епигенетичните аберации, които съпровождат процеса на онкогенеза, водят до промяна в експресията на кодираната от тях матрична РНК, нейното изследване се оказва много обещаващ подход с висока специфичност при детекция на ракови заболявания. Това оправдава и прави възможно търсенето и оценката на експресията на характерни за пренеопластичните лезии молекулярно-генетични маркери, които са вече доказани въз основа на генетични или имунохистохимични изследвания.

Свободна РНК е открита в плазмата на много злокачествени заболявания като меланом, чернодробен карцином, езофагеален карцином, карцином на млечната жлеза, лимфом и др. Наличието на свободна РНК с туморен произход е доказана и при болни с БК в биологичните течности, БАЛ, кръв, плеврални изливи.<sup>1</sup> Това определя този подход като много перспективен за изследването на болни с БК, както и за скриниране на високо рискови групи. Доказването на свободна РНК в

периферна кръв на пациенти с БК и липсата на експресия в здрави контроли е доказано за много биологични маркери, свързани с белодробната канцерогенеза, като *hTERT*, *EGFR*, *c-met*, *hnRNP A1*, *hnRNP A2-B*. Честота на експресия на тези маркери варира между 12-78% при отделните пациенти.<sup>4, 11</sup>

Редица автори правят опити за въвеждането на ДНК като маркер за диагноза на заболяването.<sup>14</sup> Те се основават най-често на детекцията на метилирани бази в промоторните райони на тумор-супресорни гени в периферна кръв, храчки, плеврални изливи или БАЛ на пациенти с БК. Доказването на метилирана ДНК на комбинации от различни гени в серума на пациенти с NSCLC позволява диагностицирането на 35-70% от изследваните и липсва в здрави контроли.<sup>3</sup>

Протеомиката е най-новият подход в областта на онкологичните изследвания, с помощта на който е възможно доказването на специфични за даден вид тумор серумни и тъканни протеини. Нейното предимство се основава на факта, че невинаги е налице корелация между експресията на ниво РНК и белтък, тъй като може да има посттранслационни промени. Двамата основни метода, които намират приложение засега – MALDI-TOF MS (*matrix assisted desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) и SELDI (*surface-enhanced laser desorption/ionization*), са в етап на приложение. Предполага се, че скринингът на серумни протеини представлява оптимистична стратегия за откриване на специфични лабораторни маркери за диагноза на БК.<sup>20</sup>

Анализът на газовия състав на издишания въздух е в най-ранни етапи от развитието си и представлява техника за скрининг на ренгенографски окултни карциноми при пациенти с висок риск. Принципът на този метод е, че летливи органични съединения, основно алкани и ароматни въглеводороди, се издишват от пациенти с БК и могат да бъдат ползвани като прецизни маркери за туморно заболяване. Този метод позволява откриването на пациентите с БК с висока чувствителност и специфичност – съответно 90% и 83%.<sup>6</sup> Преди да се направи пълна оценка за приложението в практиката обаче, е необходимо провеждане на по-мощни проучвания, включващи и високорискови групи.

Въпреки значителния успех при изучаване на същността на белодробната канцерогенеза, все още не е постигната целта за въвеждане на неинвазивен, евтин, чувствителен и специфичен маркер за ранна детекция на БК. Откритите до момента маркери не са напълно оценени по отношение на биологичното им значение и не са верифицирани поради липсата на мащабни проучвания.

### Литература

- Bernd Schmidt Eileen Engel Tim Carstensen Sabine Weickmann Matthias John Christian Witt and Michael Fleischhacker Quantification of free RNA in serum and bronchial lavage: a new diagnostic tool in lung cancer detection? *Lung Cancer* 2005; 48(1): 145-147
- Bota S, Auliac JB, Paris C, et al.: Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma in situ using fluorescence endoscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1688-1693
- Bremnesa RM, Siretab R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 2005; 49: 1-12
- Chau-Chyun Sheu, Mei-Yin Chang, Huang-Chou Chang. Combined Detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in Peripheral Blood: A Highly Sensitive Panel for Potential Molecular Diagnosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology* 2006; 70: 203-211

Пълната библиографска справка е на разположение в издателството и може да бъде представена при поискване.