

Η ανάπτυξη των πτυέλων για την πρώιμη διάγνωση του πνευμονικού καρκίνου

FB Thunnissen

J Clin Pathol 2003; 56:805-810.

Απόδοση στα ελληνικά: ΦΩΤΗΣ ΒΛΑΣΤΟΣ

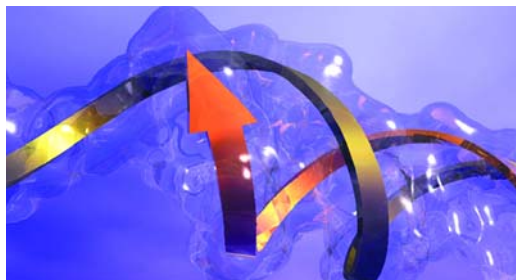
Πνευμονολόγος, Επιμελητής Α' ΚΑΑ, Νοσοκομείο «Η Σωτηρία»

Οι μοριακές μεταβολές που προηγούνται και συνοδεύουν την πνευμονική καρκινογένεση γίνονται περισσότερο γνωστές καθώς προχωρούν οι σχετικές μελέτες¹⁻⁴. Η παρουσία και η διατήρηση ειδικών μοριακών μεταβολών στο βρογχικό επιθήλιο θεωρούνται δείκτες υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση νεοπλασίας σε άτομα εκτεθειμένα σε τοξικούς παράγοντες, αλλά και προγνωστικοί δείκτες για την επιθετικότητα γνωστής νεοπλασίας⁵⁻⁷.

Η πηλακώδης μεταπλασία και η έκφραση της πρωτεΐνης p53 στο βρογχικό επιθήλιο συσχετίζεται με το κάπνισμα⁸⁻¹⁰. Η σοβαρή δυσπλασία και το καρκίνωμα in situ συσχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου p53. Πρόσφατα η φυσική πορεία του καρκινώματος in situ αναφέρθηκε ότι χαρακτηρίζεται από ταχεία εξέλιξη προς το διηθητικό στάδιο^{11,12}. Αυτές οι παρατηρήσεις συνέβαλαν στην αύξηση του ενδιαφέροντος για τη συνεισφορά της μελέτης αυτών των δεικτών στην καθημερινή κλινική πράξη. Επίσης οδήγησαν στην κριτική αξιολόγηση των σχετικών εργαστηριακών τεχνικών ώστε να καθοριστούν οι δείκτες που είναι δυνατόν να ανιχνευθούν αξιόπιστα σε δείγματα πτυέλων.

Η κυτταρολογική εξέταση

Εδώ και πολλά χρόνια οι Saccomanno και συν. καθόρισαν τις κυτταρολογικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της πορείας του πνευμονικού καρκίνου (ΠΚ). Οι μεταβολές αυτές είναι ιδιαίτερα τεκμηριωμένες στα πηλακώδη μεταπλαστικά κύτταρα και αντιπροσωπεύουν κυτταρικές μεταβολές που οφείλονται σε τοπικές βλάβες του βρογχικού επιθηλίου από τοξικούς παράγοντες (καπνός, ραδόνιο κ.λπ.). Η μετάβαση από την ήπια στη σοβαρή ατυπία και από το καρκίνωμα in situ στο διηθητικό καρκίνωμα έχει ήδη περιγραφεί. Η διάρκεια της μετάβασης ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών, αλλά κατά μέσο όρο η μετάβαση από την ήπια στη σοβαρή ατυπία διαρκεί πέντε χρόνια και η μετάβαση από τη μέτρια ατυπία στο καρ-



κίνωμα απαιτεί άλλα πέντε χρόνια. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς που πάσχουν από πηλακώδη ή μικροκυτταρικό καρκίνο εμφανίζουν όμοιες κυτταρολογικές μεταβολές. Το σημείο εκκίνησης ενός από τα διαφορετικά είδη ΠΚ είναι άγνωστο, αλλά η διάρκεια της μετάβασης φαίνεται ότι είναι βραχύτερη για τους ασθενείς με μικροκυτταρικό ΠΚ¹³.

Τα πτύελα μπορούν να συλλεγούν είτε μετά από αυθόρμητη απόχρεμψη είτε μετά από πρόκληση. Η συλλογή πτυέλων επί 3 ημέρες αυξάνει την πιθανότητα πρώιμης διάγνωσης¹⁴. Το σταθεροποιητικό μέσο του Saccomanno (50% αιθυλική αλκοόλη και 2% carbowax) συνιστάται για τη συλλογή, τη μεταφορά και τη μονιμοποίηση των πτυέλων¹⁵. Σε μια διασταυρούμενη μελέτη σύγκρισης των προκλητών πτυέλων με τα αυθόρμητα πτύελα φάνηκε η αναγκαιότητα μιας περιόδου εκμάθησης. Η δεύτερη τεχνική συλλογής έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα¹⁶. Ωστόσο, για τον περιφερικό ΠΚ (που δεν είναι προσβάσιμος από το βρογχοσκόπιο), τα προκλητά πτύελα ίσως παρέχουν περισσότερες πληροφορίες¹⁷.

Ένα δείγμα πτυέλων θεωρείται αξιόπιστο εάν περιέχει κυψελιδικά μακροφάγα ή κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου. Αυτό υποδηλώνει ότι τα πτύελα προέρχονται από το βρογχικό δέντρο¹⁸⁻²⁰. Ο ελάχιστος αριθμός μακροφάγων που απαιτείται για την αξιοπιστία των προκλητών πτυέλων ποικίλλει από 150 έως τουλάχιστον 5²¹.

Συνήθως ένα μικρό τμήμα από το δείγμα των πτυέλων εξετάζεται για την τυχόν παρουσία καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με μελέτες σχετικές με την κυτταρολογική εξέταση των πτυέλων στον ΠΚ, η ευαισθησία της εξέτασης ανέρχεται στο 65%

(εύρος από 22 έως 98%)^{19,22,23}. Η πιθανότητα ανεύρεσης παθολογικών κυττάρων αυξάνεται σε περίπτωση 1) κεντρικού όγκου, 2) ευμεγέθους ή προχωρημένου όγκου, 3) πηλακώδους όγκου και 4) αυξημένου αριθμού δειγμάτων πτυέλων.

Η κυτταρολογία των πτυέλων έχει περιορισμένη θέση στις μελέτες πληθυσμών για πρώιμη διάγνωση ΠΚ^{26,27}. Ωστόσο, σε σύγκριση με την ακτινογραφία θώρακος, η κυτταρολογική πτυέλων σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα ανίχνευσης νεοπλασίας αρχικού σταδίου. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, 8/36 περιπτώσεις ΠΚ ανιχνεύθηκαν και από την κυτταρολογική πτυέλων, ενώ 4 από αυτές ανιχνεύθηκαν μόνο από την κυτταρολογική πτυέλων (όλα ήταν πηλακώδη καρκινώματα).

Σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη που χρησιμοποίησε ακτινογραφίες θώρακος παλαιότερης τεχνολογίας, η κυτταρολογική πτυέλων θετικοποιήθηκε 18-36 μήνες πριν από την ακτινολογική εμφάνιση του ΠΚ²⁹. Για τον περιορισμένο αριθμό των ασθενών, ο ΠΚ των οποίων διαγνώστηκε με κυτταρολογική πτυέλων, η 5ετής επιβίωση έφθασε το 80% και η εξαιρεσιμότητα του όγκου ήταν 83%, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι όγκοι που διαγιγνώσκονται με την κυτταρολογική πτυέλων είτε είναι σε πρώιμο στάδιο είτε χαρακτηρίζονται από βραδύτερη ανάπτυξη³⁰. Παρόμοια αυτά, η θνητότητα του ΠΚ παραμένει αμετάβλητη³¹⁻³³.

Στην πρόσφατη μελέτη SPORE, σε ομάδα ατόμων υψηλού κινδύνου με ΧΑΠ ή καπνιστικό ιστορικό >40 πακέτα-έτη, το 1,7% των ατόμων εμφάνισαν διηθητικό ή in situ ΠΚ. Μέτρια δυσπλασία βρέθηκε στο 25% των ατόμων. Σε αυτή την υποομάδα, ΠΚ ανιχνεύθηκε στο 9% με τη χρήση φθορίζουσας βρογχοσκόπησης. Έτσι η επίπτωση του ΠΚ έφθασε στο 3,9% σε αυτή την ομάδα ατόμων υψηλού κινδύνου. Αυτό υπογραμμίζει και πάλι τη χρησιμότητα των κυτταρικών ανωμαλιών στα πτύελα ως δεικτών ανάπτυξης ΠΚ σε πληθυσμούς ατόμων υψηλού κινδύνου^{34,35}.

Η ανάπτυξη της πυρηνικής εικόνας

Η ανάπτυξη της πυρηνικής εικόνας είναι

μια σχετικά παλαιά μέθοδος που επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ μικροκυτταρικού και μη μικροκυτταρικού ΠΚ. Οι πυρήνες χρωματίζονται στοιχειομετρικά με την αντίδραση Feulgen (όπου υπάρχει μια γραμμική αναλογία μεταξύ του βαθμού χρώσης του πυρήνα και του ποσού του DNA). Η αντίδραση αυτή προσφέρεται για τη λήψη της εικόνας και την ψηφιοποίηση της μορφής της χρωματίνης (ευχρωματίνη, ετεροχρωματίνη). Κάθε pixel της εικόνας έχει μια ορισμένη τιμή που συνδέεται με την πυκνότητα του DNA. Μαθηματικοί υπολογισμοί της κατανομής των τιμών των pixel περιγράφουν ορισμένα χαρακτηριστικά, όπως το «clumping της χρωματίνης», την «πυκνότητα της χρωματίνης» ή την «ομοιογένεια». Όταν χρησιμοποιείται αυτή η τεχνική για την ανίχνευση τυχόν διαφορών μεταξύ του φυσιολογικού και των (προ)καρκινωμάτων μεταβολών χρησιμοποιείται ο όρος «μεταβολές σχετιζόμενες με κακοήθεια».

Πρόσφατα η ομάδα του Palcic πραγματοποίησε ανάλυση των «μεταβολών που σχετίζονται με κακοήθεια» σε μη καρκινικά κύτταρα από στοματικά επιχρίσματα και πτύελα^{39,40}. Έτσι μελετήθηκαν πιθανές μεταβολές σε αυτά τα κύτταρα και συσχετίστηκαν ως έμμεσοι δείκτες ΠΚ. Για το αδενοκαρκίνωμα αναφέρθηκε ευαισθησία 60% και ειδικότητα 90% ως προς την προγνωστική αξία της μεθόδου. Για ΠΚ σταδίου 0 ή 1 αναφέρθηκαν ευαισθησία 45% και ειδικότητα 90%, σε σύγκριση με ευαισθησία της τάξης των 14% της συμβατικής κυτταρολογικής πτυέλων. Οι Marek και συν. πραγματοποίησαν πολυκεντρική ανάλυση σε 5 χώρες χρησιμοποιώντας την ημιαυτόματη κυτταρομετρία πτυέλων. Οι ερευνητές αυτοί ανέφεραν ευαισθησία 75% και ειδικότητα 98%⁴¹. Τα ευρήματα αυτών των δύο ομάδων ήταν όμοια, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η μέθοδος ίσως αποδειχθεί χρήσιμη στο μέλλον.

Πρωτεΐνες

Η ανίχνευση μιας ετερογενούς πυρηνικής ριβοπρωτεΐνης, της A2/B1, φαίνεται πολύ υποσχόμενη για την πρώιμη διάγνωση του ΠΚ⁴²⁻⁴⁴. Η αντιδραστικότητα της ετερογενούς πυρηνικής ριβοπρωτεΐνης B1 χαρακτηρίστηκε ισχυρή σε πτύελα ασθενών με πνευμονικό, στοματικό ή οισοφαγικό πλάκωδη καρκίνο^{45,46}. Ωστόσο η συγγένεια του σχετικού αντισώματος με την πρωτεΐνη δεν είναι ισχυρή για άμεση εφαρμογή της μεθόδου σε ευρεία κλίμακα και απαιτεί τελειοποίηση στο άμεσο μέλλον.

Η πρωτεΐνη p53 έχει ανιχνευθεί σε πλάκωδη κύτταρα των πτυέλων με ταυτόχρονη έκφραση κυτταροκερατινών χαμηλού

μοριακού βάρους. Πρόκειται για ένα συνδυασμό που ανευρίσκεται συχνά στον ΠΚ⁴⁷. Η p53 ανιχνεύθηκε με τεχνική ανοσοφθορισμού, σε παρατεταμένη επώαση της δεύτερης φάσης, σε 9/16 ασθενείς με ΠΚ, 11/25 άτομα εκτεθειμένα σε άνθρακα και σε 0/17 μάρτυρες²¹.

Η παρουσία γουανιδινοβενζοατάσης στην κυτταρική επιφάνεια συσχετίστηκε ήδη από τη δεκαετία του 1980 με κακοήθεια. Το 1998 το ενδιαφέρον γι' αυτό το μόριο ανανεώθηκε⁴⁸. Έχει υποστηριχθεί ότι αυτή η πρωτεΐνη της επιφάνειας των κυττάρων επάγεται στην επιφάνεια των ώριμων επιθηλιακών κυττάρων των ασθενών με ΠΚ⁴⁹.

Η συνολική ανάλυση των πρωτεϊνών στα πτύελα αποτελεί μια πρακτική προσέγγιση για την πρώιμη διάγνωση του ΠΚ. Η ετερογενής πυρηνική ριβοπρωτεΐνη ίσως αποτελεί τον καλύτερο υποψήφιο, αλλά απαιτούνται αποτελεσματικότερα αντισώματα.

Εξέταση του DNA

Τα κύτταρα-στόχοι για την πρώιμη διάγνωση του ΠΚ είναι τα καρκινικά κύτταρα, αλλά αυτά αποτελούν μια μικρή μειοψηφία των πτυέλων (<1%). Εκτός από τα ζωντανά κύτταρα, υπάρχουν στα πτύελα και αποπεπτωκτότα κύτταρα, τα οποία αιωρούνται στο επιθηλιακό υγρό και παρέχουν αρκετό DNA για διαγνωστική μελέτη. Το ποσό των νεκρών κυττάρων και/ή του γυμνού DNA είναι άγνωστο, αλλά φαίνεται ότι πρόκειται και πάλι για ένα μικρό τμήμα των πτυέλων¹⁵.

Η σχετικά μικρή ποσότητα του νεοπλασματικού DNA (<1%) μέσα στη συνολική ποσότητα του DNA wild-type επιβάλλει ειδικές προδιαγραφές για τη μεθοδολογία που μπορεί να εφαρμοσθεί. Εφόσον τεχνικές όπως το sequencing (ανάγνωση αλληλουχίας) ή ο ειδικός για μεταλλάξεις υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων εμφανίζουν ευαισθησία 10-20%, οι τεχνικές αυτές δεν μπορούν να εφαρμοσθούν σε απομονωμένο υλικό DNA. Πρέπει να ενσωματωθούν εσωτερικοί και εξωτερικοί αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες. Οι εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες παρέχουν πληροφορίες σχετικές με το μέγιστο σήμα και την αντίστοιχη συχνότητα-στόχο, ενώ οι εξωτερικοί θετικοί μάρτυρες παρέχουν πληροφορίες σχετικές με την ημερήσια μεταβλητότητα της εξέτασης. Οι εσωτερικοί αρνητικοί μάρτυρες παρέχουν πληροφορίες σχετικές με το κατώφλι πάνω από το οποίο το σήμα της δοκιμασίας είναι θετικό. Οι εξωτερικοί αρνητικοί μάρτυρες εποπτεύουν πιθανή μόλυνση, αποτέλεσμα της αναξιοπιστίας της Taq πολυμεράσης. Οι μάρτυρες αυτοί πρέπει να χρησιμοποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια της

δοκιμασίας PCR, καθώς επίσης και στην nested PCR. Επιπλέον, με κάθε PCR μπορεί να εισαχθεί ένα λάθος κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA. Η πιθανότητα εμφάνισης αυτού του λάθους είναι περίπου 1/8.000^{50,51} και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα⁵².

Αυτό το σφάλμα της PCR μπορεί να εξουδετερωθεί εάν κανείς επαναλάβει την όλη διαδικασία στις περιπτώσεις θετικού αποτελέσματος κατά την πρώτη διαδικασία, εκκινώντας από το απομονωμένο DNA. Εάν η δεύτερη δοκιμασία είναι επίσης θετική, τότε το δείγμα πρέπει να θεωρείται θετικό, αλλιώς πρέπει να θεωρείται αρνητικό. Με αυτόν τον τρόπο, η πιθανότητα ένα δείγμα να θεωρηθεί θετικό λόγω σφάλματος της PCR είναι μικρότερη από περίπου 64x10⁻⁶. Για να εκτιμηθεί η ευαισθησία της τεχνικής, μπορεί να μελετηθεί ένα πρότυπο σύστημα με μικρό αριθμό αντιγράφων. Υπάρχουν 3 τρόποι για την παραπάνω μελέτη: 1) διάλυση του προϊόντος της PCR⁵², 2) η ανάμιξη του mutant DNA (προϊόν αντιγραφής) με το wild-type DNA (αρχικό, πρωτότυπο)⁵³ και 3) η ανάμιξη ζωντανών mutant κυττάρων με κύτταρα wild-type⁵⁴. Ο τελευταίος τρόπος είναι προτιμότερος επειδή προσεγγίζει τις συνθήκες που επικρατούν σε βιολογικά υλικά, όπως τα πτύελα.

Σε περίπτωση όπου δεν χρησιμοποιείται DNA ή RNA λόγω πολύ μικρής παρουσίας στο μελετούμενο βιολογικό υλικό, πρέπει να προηγείται κυτταρολογική ανάλυση ώστε να απομονωθούν τα συγκεκριμένα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν. Η παραπάνω στρατηγική είναι εφαρμόσιμη για την ανίχνευση ανωμαλιών, αλλά δεν είναι εφαρμόσιμη για μαζικό έλεγχο πληθυσμών.

Μεταλλάξεις του K-ras και μεθυλίωση έχουν συχνά αναφερθεί στα πτύελα, ενώ η ανίχνευση του p53, απώλειας ετεροζυγωτίας ή πρόσθετων του DNA (DNA adducts) και του RNA είναι σπανιότερη. Συνεπώς, το κείμενο αυτό θα δώσει έμφαση στις δύο πρώτες ερευνητικές οδούς.

1. K-ras

Συνήθως μεταλλάξεις του K-ras εμφανίζονται στα αδενοκαρκινώματα. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι 1) όταν εξετάζονται πτύελα από ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα με μετάλλαξη του K-ras, τα πτύελα μπορεί να εμφανίζουν ή όχι την ίδια μετάλλαξη, 2) ένα μεγάλο ποσοστό από πτύελα θετικά για μετάλλαξη του K-ras έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με πλάκωδη καρκινώματα και 3) πτύελα θετικά για μετάλλαξη του K-ras έχουν αναφερθεί σε άτομα χωρίς ΠΚ. Οι δύο τελευταίες παρατηρήσεις βρίσκονται σε αναντιστοιχία με τα βιολογι-

κά φαινόμενα που συνδέονται με τον ΠΚ. Η πρωτεΐνη K-ras σπανίως ανιχνεύεται στον πλάκωδη ΠΚ. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με την παραδοχή ότι μεταλλάξεις του K-ras εμφανίζονται σε μη κακοήθη κύτταρα των πτυέλων ή ότι κάποιος τεχνικός παράγοντας ευθύνεται για τα ευρήματα αυτά. Οι μελέτες των αδενοκαρκινωμάτων χρησιμοποιούν διαφορετικές τεχνικές σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των πλάκωδων ΠΚ ή των μη καρκινικών ιστών. Μια πιθανή τεχνική ερμηνεία αποτελεί το ότι με την ειδική ως προς τα αλληλήλια αντιγραφή, τα αναντίστοιχα αλληλήλια αντιγράφονται 10^{-2} έως 10^{-4} φορές λιγότερο από τα απολύτως αντίστοιχα αλληλήλια⁵². Αυτό σημαίνει ότι όσο περισσότεροι κύκλοι εκτελούνται από την PCR, τόσο περισσότερο αυξάνεται η πιθανότητα του ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε breakthrough και υποδηλώνει ότι καθώς οι κύκλοι της αντιγραφής αυξάνονται κατά τη διάρκεια της PCR, ακόμη και τα αρνητικά δείγματα θα καταλήξουν να δώσουν θετικό σήμα. Η χρήση του PNA clamping μειώνει αυτή την πιθανότητα⁵².

Από τις 3 τεχνικές που έδωσαν αποτελέσματα συμβατά με τη βιολογία του ΠΚ, η τεχνική της κλωνοποίησης δεν προσφέρεται για μαζικό έλεγχο. Συνεπώς, οι μέθοδοι επιλογής είναι η Point-EXACCT και ο peptic nucleic acid-PCR-restriction fragment length polymorphism.

Το ερώτημα εάν οι μεταλλάξεις του K-ras υπάρχουν σε μη κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα τίθεται καθ' όμοιο τρόπο και στα δείγματα πτυέλων, επειδή και εδώ χρησιμοποιούνται όμοιες τεχνικές. Με βάση τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη πτυέλων από ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και μεταλλάξεις του K-ras, το τμήμα-στόχος του DNA είναι περίπου το 1/150 αυτού που υπάρχει σε ένα δείγμα πτυέλων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι μεταλλάξεις του K-ras μπορούν να ανιχνευθούν στα πτύελα τουλάχιστον ένα χρόνο πριν από την κλινική διάγνωση του ΠΚ⁵⁹. Αυτή η περίοδος προσφέρεται για πρώιμη διάγνωση. Επιπλέον βρέθηκαν μεταλλάξεις σε πτύελα με αρνητική κυτταρολογική εξέταση.

2. Μεθυλίωση

Η μεθυλίωση του DNA στο άκρο 5' του δακτυλίου της πυριμιδίνης είναι ένα σημαντικό επιγενετικό φαινόμενο στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η 5-μεθυλκυτοσίνη βρίσκεται κυρίως στα νησίδια CpG και, όταν αυτά εντοπίζονται στην επαγωγική περιοχή των γονιδίων, διαταράσσει τη σύνδεση των με-

ταγραφικών παραγόντων. Ωστόσο, άλλες πρωτεΐνες είναι δυνατό να συνδεθούν, όπως οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το μεθυλιωμένο DNA, γεγονός που προκαλεί τη σιγή των γονιδίων. Οι διαφορετικές μέθοδοι μελέτης της μεθυλίωσης ανασκοπήθηκαν πρόσφατα⁶². Η πλέον ευαίσθητη μέθοδος είναι η methylation specific PCR (MSP).

Περισσότερα από 40 γονίδια εμπλέκονται στο φαινόμενο της μεθυλίωσης στον ΠΚ⁶³. Πρόσφατα άρχισαν να δημοσιεύονται μελέτες σχετικές με τη μεθυλίωση στα πτύελα⁶⁴⁻⁶⁸. Το 55-100% των πτυέλων από ασθενείς με ΠΚ είναι θετικά για μεθυλίωση, ενώ για τους μάρτυρες αυτό το ποσοστό κυμαίνεται από 3-35%. Το εύρος αυτό φαίνεται ότι εξαρτάται από τα μελετούμενα γονίδια.

Οι ακόλουθες τεχνικές διευκρινίσεις είναι απαραίτητες για την κατανόηση των αποτελεσμάτων που εξάγονται από την nested PCR: η εξέταση αυτή περιλαμβάνει δύο φάσεις των 40 κύκλων η καθεμία. Η πρώτη φάση αφορά θέσεις πρόσδεσης των primers (εκκινητές) που βρίσκονται έξω από τα νησίδια CpG, ενώ η δεύτερη φάση αφορά primers ειδικά για μεθυλίωση. Προηγείται μια φάση προετοιμασίας του DNA (δημιουργία δισουλφιδικού δεσμού, bisulfitation) κατά την οποία η (μη μεθυλιωμένη) κυτοσίνη μετατρέπεται σε ουρακίλη. Ωστόσο, εάν η παραπάνω μετατροπή είναι ατελής, τότε η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη παραμένει στο DNA που προκύπτει από την αντιγραφή. Αυτή μπορεί να ανιχνευθεί με τα ειδικά για μεθυλίωση primers και να δώσει (ψευδώς) θετικό αποτέλεσμα. Ένας πιθανός έλεγχος των πραγματικών μεταβολών από τη φάση του bisulfitation αποτελεί η ανάγνωση της αλληλουχίας (sequencing) του προϊόντος της PCR. Εκτός από το πρόβλημα του ατελούς bisulfitation, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της εξέτασης πρέπει να λαμβάνει υπόψη της την αναξιοπιστία της Taq πολυμεράσης.

3. P53

Η ανίχνευση τριών hot spots στο γονίδιο P53 γίνεται στο DNA των πτυέλων με τη μέθοδο της ειδικής αντιγραφής μεταλλαγμένων αλληλίων. Σε σχετική μελέτη τα δείγματα των πτυέλων 4/51 ασθενών με ΠΚ και 1/25 καπνιστών βρέθηκαν θετικά⁵⁸. Μια άλλη μελέτη χρησιμοποίησε την PCR αντίστροφης μεταγραφής του RNA (RT-PCR) για την ανάλυση αποθηκευμένων δειγμάτων πτυέλων 10 ασθενών, ο όγκος των οποίων είχε βρεθεί θετικός για μετάλλαξη του P53. Ένα από τα 10 δείγματα έδειξε μετάλλαξη στα πτύελα 84 ημέρες πριν από τη διάγνωση⁷⁰. Ο αριθμός των δειγμάτων είναι

πολύ περιορισμένος και συνεπώς δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα. Αν και φάνηκε αρχικά μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, η πράξη έδειξε ότι η ανίχνευση μεταλλάξεων του P53 στα πτύελα είναι μια κοπιώδης τεχνική, που δεν προσφέρεται για την καθημερινή προσπάθεια πρώιμης διάγνωσης του ΠΚ.

4. Απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH)

Μέχρι σήμερα, μεταβολές των μικροδορυφόρων του DNA έχουν ανιχνευθεί σε ειδικά κύτταρα που διαχωρίστηκαν από τα υπόλοιπα κύτταρα των πτυέλων. Οι μεταβολές αυτές αφορούσαν κύτταρα με παθολογικά χαρακτηριστικά⁷¹. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι στα πτύελα υπάρχουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Ωστόσο, αυτή η ερευνητική προσέγγιση δεν είναι πρακτική για μαζικό έλεγχο πληθυσμών, εκτός εάν αποδειχθεί ότι οι ανωμαλίες αυτές στα πτύελα με μεταπλάσια υποδηλώνουν μια μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης ΠΚ από ό,τι η μεταπλάσια από μόνη της.

5. Πρόσθετα του DNA

Είναι πιθανό να ανιχνευθούν λιποφιλικά πρόσθετα (adducts) στα πτύελα καπνιστών⁷². Δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα συσχέτιση αυτών των προσθέτων με κίνδυνο εμφάνισης ΠΚ, αλλά η μέθοδος είναι κοπιώδης και μη εφαρμόσιμη για μαζικό έλεγχο πληθυσμών.

6. Εξέταση του RNA

Με τη βοήθεια της RT-PCR, εξετάσθηκε το RNA των πτυέλων ασθενών και υγιών μαρτύρων⁷³. Βρέθηκε ότι επτά νευροενδοκρινείς δείκτες, μεταξύ των οποίων και το preprogastrin releasing peptide, διέφεραν σημαντικά μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών. Αυτό είναι αξιοσημείωτο, επειδή 5/23 δείγματα πτυέλων από ασθενείς με μικροκυτταρικό ΠΚ ήταν θετικά για τους παραπάνω δείκτες, ενώ οι περισσότεροι από τους άλλους νουκλεϊνικούς δείκτες είναι ειδικό για το μη μικροκυτταρικό ΠΚ. Η εργασία με το RNA απαιτεί ειδική προσοχή ώστε να αποφευχθεί η κατάτμηση του RNA. Θεωρητικά η ανάλυση του RNA μπορεί να είναι χρήσιμη για την ανίχνευση του ΠΚ, αν και αυτές οι δοκιμασίες είναι ακόμη σε προκαταρκτικό στάδιο ανάπτυξης.

Επίλογος

Η εξέταση των κυττάρων των πτυέλων είναι χρήσιμη για την πρώιμη ανίχνευση του ΠΚ. Επιπλέον η ανάλυση του DNA και η ανάλυση της πυρηνικής εικόνας δείχνουν προοπτικές βελτίωσης της διαγνωστικής συ-

νεισφοράς της κυτταρολογικής πτυέλων. Απαιτείται πάντως ο τεχνικός έλεγχος των διαφόρων εργαστηρίων ώστε να τεκμηριωθεί η επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία των τεχνικών αυτών.

Βιβλιογραφία

- Miller YE, Franklin WA. Molecular events in lung carcinogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11:215-34.
- Hirsch FR, Franklin WA, Gazdar AF, et al. Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology. *Clin Cancer Res* 2001; 7:5-22.
- Tockman MS. Advances in sputum analysis for screening and early detection of lung cancer. *Cancer Control* 2000; 7:19-24.
- Wiest JS, Franklin WA, Drabkin H, et al. Genetic markers for early detection of lung cancer and outcome measures for response to chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 1997; 28/29:64-73.
- Sozzi G, Oggionni M, Alasio L, et al. Molecular changes track recurrence and progression of bronchial precancerous lesions. *Lung Cancer* 2002; 37:267-70.
- Wistuba II, Mao L, Gazdar AF. Smoking: molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* 2002; 21:7298-306.
- Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1303-7.
- Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking, 1955-1960 vs. 1970-1977. *N Engl J Med* 1979; 300:381-5.
- Boers JE, Velde GP Mt, Thunnissen FBJM. P53 in squamous metaplasia: a marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am Rev Respir Dis* 1996; 153:411-16.
- Martin B, Verdebout JM, Mascoux C, et al. Expression of p53 in preneoplastic and early neoplastic bronchial lesions. *Oncol Rep* 2002; 9:223-9.
- Venmans BJ, van Boxem TJ, Smit EF, et al. Outcome of bronchial carcinoma in situ. *Chest* 2000; 117:1572-6.
- Bota S, Aliac 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; 164:1688-93.
- Saccomanno G, Archer VE, Auerbach O, et al. Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* 1974; 33:256-70.
- Ng AB, Horak GC. Factors significant in the diagnostic accuracy of lung cytology in bronchial washing and sputum samples. II. Sputum samples. *Acta Cytol* 1983; 27:397-402.
- Field JK, Brambilla C, Caporaso N, et al. Consensus statements from the second international lung cancer molecular biomarkers workshop: a European strategy for developing lung cancer molecular diagnostics in high risk populations. *Int J Oncol* 2002; 21:369-73.
- Kennedy TC, Proudfoot SP, Piantadosi S, et al. Efficacy of two sputum collection techniques in patients with air flow obstruction. *Acta Cytol* 1999; 43:630-6.
- Agusti C, Xaubet A, Monton C, et al. Induced sputum in the diagnosis of peripheral lung cancer not visible endoscopically. *Respir Med* 2001; 95:822-8.
- Roby TJ, Swan GE, Sorensen KW, et al. Discriminant analysis of lower respiratory tract components associated with cigarette smoking, based on quantitative sputum cytology. *Acta Cytol* 1990; 34:147-154.
- Mehta AC, Marty JJ, Lee FY. Sputum cytology. *Clin Chest Med* 1993; 14:69-85.
- Schumann GB, Roby TJ, Swan GE, et al. Quantitative sputum cytologic findings in 109 nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:601-603.
- Feng Z, Tian D, Lan Q, et al. A sensitive immunofluorescence assay for detection of p53 protein accumulation in sputum. *Anticancer Res* 1999; 19:3847-52.
- Johnston WW, Bossen EH. Ten years of respiratory cytopathology at Duke University Medical Center. II. The cytopathologic diagnosis of lung cancer during the years 1970 to 1974, with a comparison between cytopathology and histopathology in the typing of lung cancer. *Acta Cytol* 1981; 25:499-505.
- Sing A, Freudenberg N, Kortsik C, et al. Comparison of the sensitivity of sputum and brush cytology in the diagnosis of lung carcinomas. *Acta Cytol* 1997; 41:399-408.
- Risse EK, van't Hof MA, Vooijs GP. Relationship between patient characteristics and the sputum cytologic diagnosis of lung cancer. *Acta Cytol* 1987; 31:159-65.
- Risse EK, van't Hof MA, Laurini RN, et al. Sputum cytology by the Saccomanno method in diagnosing lung malignancy. *Diagn Cytopathol* 1985; 1:286-91.
- Frost JK, Ball WC Jr, Levin ML, et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins study. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:549-54.
- Woolner LB, Fontana RS, Cortese DA, et al. Roentgenographically occult lung cancer: pathologic findings and frequency of multicentricity during a 10-year period. *Mayo Clin Proc* 1984; 59:453-66.
- Sobue T, Moriyama N, Kaneko M, et al. Screening for lung cancer with low-dose helical computed tomography: anti-lung cancer association project. *J Clin Oncol* 2002; 20:911-20.
- Dobray GS. The evaluation of cytology in the early diagnosis of pulmonary carcinoma. *Acta Cytol* 1970; 14:95-103.
- Bechtel JJ, Kelley WR, Petty TL, et al. Outcome of 51 patients with roentgenographically occult lung cancer detected by sputum cytologic testing: a community hospital program. *Arch Intern Med* 1994; 154:975-80.
- Strauss GM, Gleason RE, Sugarbaker DJ. Chest X-ray screening improves outcome in lung cancer. A reappraisal of randomized trials on lung cancer screening. *Chest* 1995; 107:2705-95.
- Shaw GL. Screening for lung cancer. In: Johnson BE, Johnson DH, editors. *Lung Cancer*. New York: Wiley-Liss; 1995. p. 41-54.
- Sanderson DR. Lung cancer screening. The Mayo study. *Chest* 1986; 89:3245.
- Kennedy TC, Proudfoot SP, Franklin WA, et al. Cytopathological analysis of sputum in patients with airflow obstruction and significant smoking histories. *Cancer Res* 1996; 56:4673-8.
- Kennedy TC, Miller Y, Prindville S. Screening for lung cancer revisited and the role of sputum cytology and fluorescence bronchoscopy in a high-risk group. *Chest* 2000; 117:725-95.
- Greenberg SD, Hunter NR, Taylor GR, et al. Application of cell-image analysis to the diagnosis of cellular atypias in sputum: a review. *Diagn Cytopathol* 1986; 2:168-74.
- Thunnissen FB, Diegenbach PC, van-Hattum AH, et al. Further evaluation of quantitative nuclear image features for classification of lung carcinomas. *Pathol Res Pract* 1992; 188:531-5.
- Petty TL, Tockman MS, Palcic B. Diagnosis of roentgenographically occult lung cancer by sputum cytology. *Clin Chest Med* 2002; 23:59-64.
- Payne PW, Sebo TJ, Doukine A, et al. Sputum screening by quantitative microscopy: a reexamination of a portion of the National Cancer Institute cooperative early lung cancer study. *Mayo Clin Proc* 1997; 72:697-704.
- Palcic B, Garner DM, Beveridge J, et al. Increase of sensitivity of sputum cytology using high-resolution image cytometry: field study results. *Cytometry* 2002; 50:168-76.
- Marek W, Kotschy-Lang N, Muti A, et al. Can semi-automated image cytometry on induced sputum become a screening tool for lung cancer? Evaluation of quantitative semi-automated sputum cytometry on radon- and uranium-exposed workers. *Eur Respir J* 2001; 18:942-50.
- Qiao YL, Tockman MS, Li L, et al. A case-cohort study of an early biomarker of lung cancer in a screening cohort of Yunnan tin miners in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:893-900.
- Tockman MS, Erozan YS, Gupta P, et al. The early detection of second primary lung cancers by sputum immunostaining. LCEWVDG investigators. *Lung cancer early detection group*. *Chest* 1994; 106:3855-3905.
- Tockman MS, Mulshine JL, Piantadosi S, et al. Prospective detection of preclinical lung cancer: results from two studies of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression. *Clin Cancer Res* 1997; 3:2237-46.
- Sueoka E, Goto Y, Sueoka N, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers. *Cancer Res* 1999; 59:1404-7.
- Sueoka E, Sueoka N, Goto Y, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as early cancer biomarker for occult cancer of human lungs and bronchial dysplasia. *Cancer Res* 2001; 61:1896-902.
- Anderson M, Sladon S, Michels R, et al. Examination of p53 alterations and cytokeratin expression in sputa collected from patients prior to histological diagnosis of squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem Suppl* 1996; 25:185-90.
- Steven FS, Payne PW, Palcic B, et al. Sputum cells from lung tumour patients carry a cell surface marker not found in normal sputum. *Anticancer Res* 1998; 18:2855-8.
- Steven FS, Katsumi T, Payne PW, et al. Evidence for the induction of a tumour associated cell surface protease on cytologically normal epithelial cells present in the sputum of patients possessing lung tumours. *Anticancer Res* 1999; 19:3491-3.
- Huang MM, Arnheim N, Goodman MF. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:4567-73.
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:3546-51.
- Rhodes CH, Honsinger C, Porter DM, et al. Analysis of the allele-specific PCR method for the detection of neoplastic disease. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6:49-57.
- Mao L, Hruban RH, Boyle JO, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54:1634-7.
- Shiono S, Omoe K, Endo A. K-ras gene mutation in sputum samples containing atypical cells and adenocarcinoma cells in the lung. *Carcinogenesis* 1996; 17:1683-6.
- Yakubovskaya MS, Spiegelman V, Luo FC, et al. High frequency of K-ras mutations in normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. *Int J Cancer* 1995; 63:810-14.
- Nakajima E, Hirano T, Konaka C, et al. K-ras mutation in sputum of primary lung cancer patients does not always reflect that of cancerous cells. *Int J Oncol* 2001; 18:105-10.
- Behn M, Thiede C, Neubauer A, et al. Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by a PNA-mediated "enriched PCR" protocol. *J Pathol* 2000; 190:69-75.
- Kersting M, Friedl C, Kraus A, et al. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* 2000; 18:3221-9.
- Somers VAMC, Pietersen AM, Theunissen PHMH, et al. Detection of K-ras point mutations in sputum from patients with adenocarcinoma of the lung by Point-EXACCT. *J Clin Oncol* 1998; 16:3061-3068.
- Somers VAMC, Leimbach DA, Theunissen PHMH, et al. Validation of the Point-EXACCT method in non-small cell lung carcinomas. *Clin Chem* 1998; 44:1404-9.
- Somers VA, Thunnissen FB. Detection of K-ras point mutations in sputum from patients with adenocarcinoma of the lung by point-EXACCT. *Methods Mol Med* 2003; 75:305-23.
- Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 2002; 33:632, 634, 636-49.
- Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, et al. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002; 21:5450-61.
- Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11891-6.
- Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 2002; 62:2370-7.
- Gilliland FD, Harms HJ, Crowell RE, et al. Glutathione S-transferase P1 and NADPH quinone oxidoreductase polymorphisms are associated with aberrant promoter methylation of P16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in sputum. *Cancer Res* 2002; 62:2248-52.
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60:5954-8.
- Chen JT, Chen YC, Wang YC, et al. Alterations of the p16(ink4a) gene in resected nonsmall cell lung tumours and exfoliated cells within sputum. *Int J Cancer* 2002; 98:724-31.
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:E65-5.
- Chen JT, Ho WL, Cheng YW, et al. Detection of p53 mutations in sputum smears precedes diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20:2687-90.
- Miozzo M, Sozzi G, Musso K, et al. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res* 1996; 56:2285-8.
- Nia AB, Maas LM, Van Breda SG, et al. Applicability of induced sputum for molecular dosimetry of exposure to inhalatory carcinogens: 32P-postlabeling of lipophilic DNA adducts in smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:367-72.
- Lacroix J, Becker HD, Woerner SM, et al. Sensitive detection of rare cancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preproGRP-specific RT-PCR. *Int J Cancer* 2001; 92:1-8.
- Thunnissen FB, Ellis IO, Jutting U, et al. Interlaboratory comparison of DNA image analysis. Management group report of internal quality assurance programme in the CAAC breast cancer project. *Zentralbl Pathol* 1994; 139:443-7.