

Nowe spojrzenie na proliferację nowotworów

Anna Gasińska^{1, 2}, Beata Biesaga¹

W ostatnich latach, dzięki postępowi badań nad mechanizmami zjawisk biologicznych, odpowiedzialnych za odpowiedź popromienną nowotworu, zrewidowano pogląd dotyczący proliferacji komórek nowotworowych. Obecnie, za istotnie mające wpływ na leczenie, zamiast szybko proliferujących, uważa się pulę powoli proliferujących komórek, która może zawierać nowotworowe komórki macierzyste. Przedstawiono różne modele proliferacji komórek nowotworowych oraz metody pomiaru szybkości wzrostu nowotworów, stosowane w praktyce klinicznej. Ze względu na wykazany wpływ innych czynników biologicznych na szybkość wzrostu komórek nowotworowych i stwierdzaną heterogenność tej cechy w obrębie jednego typu histologicznego, proliferacja komórek nowotworowych straciła swoje predykcyjne znaczenie w praktyce klinicznej.

A new look at tumour proliferation

Recently, due to the progress in the research in the field of biological mechanisms affecting radiation response, tumour cell kinetics has been revised. Presently, it is assumed that of the population of slowly proliferating tumour cells has crucial influence on the results of radiotherapy results, contrary to previous beliefs that this effect is associated with fast proliferating tumour cells. The most likely reason may arise from the fact that this slowly proliferating population may contain malignant stem cells. In this review we present different models of tumour cell kinetics and methods of measuring cell proliferation in clinical practice. Due to the influence of other biological factors on the growth rate of tumour cells and the heterogeneity of this feature within one histological tumour type, proliferation rate has lost its predictive value in clinical practice.

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, modele proliferacji komórek, repopulacja, metody oceny proliferacji komórek
Key words: cell cycle, cell proliferation models, repopulation, cell proliferation assessment methods

Z początkiem lat 80. XX wieku, zaczęto publikować wyniki licznych badań klinicznych wykazujących, że u chorych na ten sam typ nowotworu złośliwego, leczonych taką samą dawką promieniowania i tym samym sposobem frakcjonacji, z różną częstością dochodzi do miejscowych wyleczeń nowotworu i inny jest także stopień nasilenia popromiennych odczynów tkanek prawidłowych. Zdano sobie wówczas sprawę, że za różnice w odpowiedzi guzów na leczenie mogą być odpowiedzialne cechy biologiczne nowotworu. W 1975 r. Withers wyróżnił cztery procesy biologiczne, które mogą być odpowiedzialne za popromienną reakcję guza i określił je mianem „4R” radioterapii [1]. Należą do nich: naprawa uszkodzeń DNA, redystrybucja komórek w cyklu, repopulacja (proliferaacja komórek przeżywających napromienianie) i reoksygenacja niedotlenowanych (hipoksycznych) komórek nowotworowych. W 1989 r. Steel i wsp. [2] uzupełnili tę listę o piątą „R” – wewnątrzkomórkową promieniowrażliwość.

Od tego czasu podjęto intensywne badania nad oceną wartości prognostycznej (dotyczące wyników leczenia) i predykcyjnej (dotyczącej skuteczności różnych wariantów leczenia) cech biologicznych nowotworu, odpowiedzialnych za wymienione procesy.

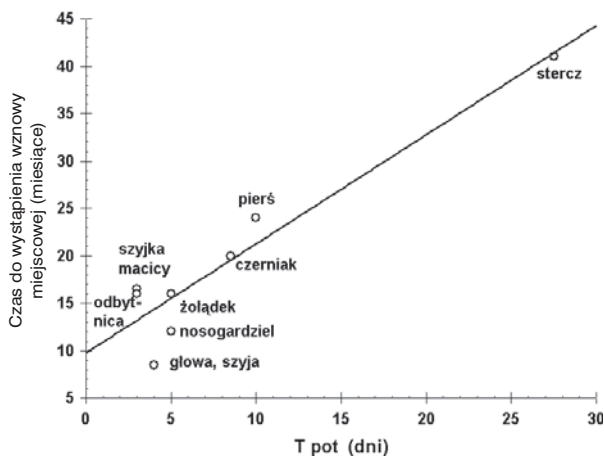
Wszystkie wymienione procesy biologiczne w różnym stopniu wpływają na przebieg i wyniki leczenia indywidualnego chorego. Jednak w celu indywidualizacji leczenia (predykcyjna rola) zwracano uwagę głównie na trzy parametry: proliferację komórek nowotworowych, wewnątrzkomórkową promieniowrażliwość i niedotlenowanie komórek – hipoksję. Niestety, pomimo ponad dwudziestoletnich badań nad indywidualizacją leczenia w oparciu o cechy biologiczne nowotworów, do chwili obecnej nie został opracowany panel testów dla żadnego typu nowotworu, pozwalający osiągnąć zamierzony cel. Istnieje szereg przyczyn tego stanu rzeczy. Po pierwsze, nie zdawano sobie sprawy z heterogenności nowotworu pod względem każdej z badanych cech biologicznych. Po drugie, nie opracowano standardowych, obiektywnych metod oceny biologicznych cech nowotworów. Po trzecie, w wielu publikowanych pracach, dotyczących tego tematu, formułowano wnioski na podstawie analizy mało licznych grup chorych, o zbyt krótkim czasie

¹ Zakład Radiobiologii Klinicznej
Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Krakowie

² Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa
Katedra Kosmetologii w Katowicach

obserwacji, co doprowadzało do publikowania sprzecznych wyników pomiędzy poszczególnymi ośrodkami. Dodatkowo, w ostatnich latach wprowadzenie do badań radiobiologicznych nowoczesnych metod biologii molekularnej, przyczyniło się do rewizji, niektórych dogmatów radiobiologicznych obowiązujących od wielu lat, jak też doprowadziło do nowego spojrzenia na rolę czynników biologicznych w radioterapii. Dotyczy to między innymi proliferacji komórek nowotworowych. Dlatego niniejszy przegląd będzie poświęcony przedstawieniu nowych poglądów dotyczących tego zagadnienia.

Przez dziesiątki lat w społeczności klinicystów i radiobiologów obowiązywał pogląd, że niepowodzenia radioterapii związane są głównie z występowaniem w guzach puli szybko proliferujących komórek nowotworowych. Wysoka aktywność proliferacyjna komórek nowotworowych była bowiem uznawana za jeden z czynników decydujących o przyspieszonej repopulacji nowotworów złośliwych. Uważano, że ocena szybkości wzrostu komórek nowotworowych przed leczeniem może mieć znaczenie predykcyjne i stanowić podstawę dla zmian schematu radioterapii. Poglądy te sformułowano na podstawie przesłanek, pochodzących między innymi z badań klinicznych. I tak, z analiz przeprowadzonych w grupie nowotworów terenu głowy i szyi wynikało, że średni czas wznowy wynosi około 6 miesięcy od zakończenia leczenia, co jest zgodne z czasem podwojenia klonogennych komórek nowotworowych, wynoszącym kilka dni [3, 4]; może on mieć wpływ na czas pojawienia się wznów po leczeniu. Na podstawie wielu badań klinicznych wykazano związek między szybkością proliferacji różnych nowotworów i czasem do wystąpienia wznów. Zależność tę przedstawia Rycina 1 [5, 6]. Wyniki badań klinicznych wykazały także negatywny wpływ wydłużenia czasu radioterapii przez wprowadzenie przerwy podczas leczenia, bez podwyższenia wysokości dawki całkowitej. Prowadzi to do zmniejszenia odsetka wyleczeń miejscowych [3, 7]. Na zjawisko to zwrócili uwagę Withers i wsp. [8], którzy wykazali przyspieszoną repopulację komórek raka nosowej części gardła u chorych w przedłużonym czasie lecze-



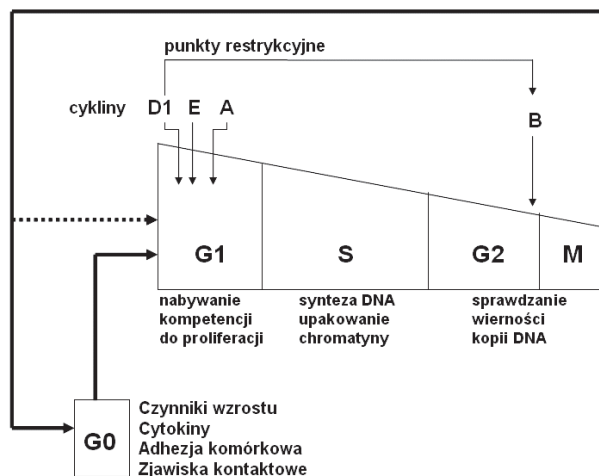
Ryc. 1. Zależność między tempem proliferacji różnych nowotworów (wyrażonym jako potencjalny czas podwojenia – T_{pot}) i czasem do wystąpienia wznowy miejscowej po zakończeniu radioterapii. Rycina wg Trotta i wsp. [5] i Wilsona [6], w modyfikacji własnej

nia (z 5 do 8 tygodni). W celu przeciwdziałania takiemu efektowi repopulacji należy podwyższyć dawkę o 0,6 Gy na każdy dzień przedłużonej radioterapii.

Omawiane prace stały się podstawą do wprowadzenia skróconych reżimów frakcjonacji w radioterapii, jak również przyczyniły się do powstania koncepcji głoszącej, że szybko proliferujące nowotwory będą reagowały lepiej na skrócone leczenie napromienianiem. W celu wyeliminowania zjawiska repopulacji wprowadzono, między innymi, schemat radioterapii CHART (*continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy*), polegający na podawaniu w ciągu 12 dni leczenia 3 małych dawek frakcyjnych dziennie z 8-godzinną przerwą [9]. U chorych leczonych według tego schematu przeprowadzono także ocenę szybkości wzrostu komórek nowotworowych przed leczeniem. Niestety, analiza ponad 500 chorych leczonych według schematu CHART nie wykazała istotnej różnicy w przeżyciu chorych na szybko i wolno proliferujące nowotwory, aczkolwiek uzyskanie takiego samego odsetka wyleczeń miejscowych dla niższej dawki całkowitej, podanej w znacznie krótszym czasie, mogło pośrednio wskazywać na wyeliminowanie repopulacji jako przyczyny niepowodzenia [10]. Choć w tym i w innych badaniach nie wykazano znaczenia prognostycznego szybkiej proliferacji komórek nowotworowych, sformułowano radiobiologiczny dogmat, zgodnie z którym szybko proliferujące nowotwory powinny być leczone według przyspieszonych schematów radioterapii.

Należy zaznaczyć, że w latach 70. ubiegłego wieku niektórzy badacze [11, 12] wskazywali na kliniczne znaczenie subpopulacji powoli dzielących się komórek nowotworowych. Ta subpopulacja miała wywodzić się z populacji szybko proliferujących komórek, w wyniku wydłużania cyklu komórkowego i po radioterapii ulegać przyspieszonemu wzrostowi. Te głosy jednak nie były brane pod uwagę. Badacze ci ponadto sugerowali, że subpopulacja tych komórek może odgrywać podstawową rolę dla tempa wzrostu heterogennej populacji komórek. Argumentowali, że gdyby w nowotworze szybka proliferacja odgrywała decydującą rolę, to szybko stałaby się populacją dominującą i przerosłaby wszystkie inne, w nim występujące.

Od lat badano mechanizmy komórkowe i środowiskowe, wpływające na przyspieszenie tempa proliferacji komórek nowotworowych. Poznano organizację proliferujących komórek i mechanizmy kontroli cyklu komórkowego. W latach 80. XX wieku obowiązywał klasyczny model proliferacji komórek – model fazy spoczynkowej (*G0 repose model*) [13]. Zakładał on, że większość komórek tkanek ssaków znajduje się w fazie spoczynkowej (*G0*) i dopiero stymulacja (np. czynnikami wzrostu) powoduje wejście komórek w cykl przez fazę *G1*, a następnie *S*, *G2* do *M* (Ryc. 2). Model ten powstał w oparciu o tkanki prawidłowe. W procesie prawidłowego różnicowania większość komórek *in vivo* nie proliferuje, choć pozostają żywotne i aktywne metabolicznie. Wywodzą się one z komórek proliferujących, w których w procesie różnicowania metabolizm został przesterowany w stan spoczynku [13]. Decyzja o losie



Ryc. 2. Model fazy spoczynkowej (G0) proliferacji komórek. Rycina wg Wilsona [22], w modyfikacji własnej. Zaznaczona rola cyklin w poszczególnych fazach cyklu (szczególnie cykliny D w punkcie restrykcyjnym w fazie G1). Rekrutacja komórek do cyklu (faza G1) odbywa się po stymulacji komórek w fazie G0

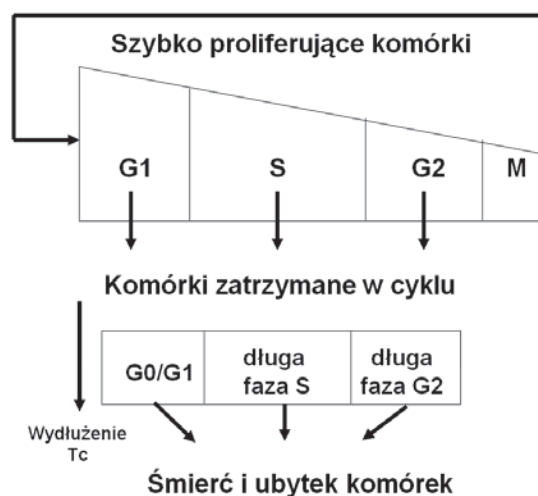
komórki odnośnie przejścia do stanu spoczynku (faza G0) lub wzrostu podejmowana jest w fazie G1. W przeciwieństwie do procesu prawidłowego różnicowania (ruch komórek z fazy G1 do G0) założono, że komórki nowotworowe mogą wchodzić na drogę proliferacji lub nowotworzenia z fazy G0 (ruch komórek z fazy G0 do G1). Model ten zakładał, że w nowotworze, w fazie G0 znajdują się komórki nieproliferujące, wycofane z cyklu (np. wskutek braku tlenu i środków odżywczych), zróżnicowane i nekrotyczne. Tworzą one, w odróżnieniu od komórek proliferujących (przedział P) przedział nieproliferacyjny (przedział Q), spoczynkowy (*quiescent*), w którym komórki pod względem biologicznym różnią się znacznie od komórek z przedziału proliferacyjnego. Ten hipotetyczny model zakładał, że komórki znajdujące się w fazie G0 mają dwie możliwości: ponowne wejście do cyklu poprzez fazę G1, co może nastąpić w odpowiedzi na bodźce, takie jak, na przykład, czynniki wzrostu i cytokiny, czy dostęp do tlenu i środków odżywczych. Druga możliwość to obumarcie komórki, gdy niekorzystne warunki do życia trwają zbyt długo. W odpowiedzi na wyżej wymienione bodźce komórka może przejść pełny cykl podziałowy (rozpoczynając obieg w cyklu od fazy G1, poprzez S, G2 i M), albo też z powrotem zostać wycofana do fazy G0, czyli do fazy pomiotycznej (przedział Q) i poddać się procesowi różnicowania. Model ten zakładał więc, że istnieją zasadnicze różnice biologiczne między komórkami dzielącymi się i spoczynkowymi. Zakładał również, że śmierć komórek może następować głównie po wyjściu z fazy G0 i przedziału Q.

W latach 80. ubiegłego stulecia panował pogląd, że po zakończeniu leczenia ogniska wznowy powstają w wyniku aktywności proliferacyjnej kilku komórek klonogennych (czyli dzielących się), które przeżyły pomimo leczenia. Tak więc intuicyjnie za najważniejszą z punktu widzenia odpowiedzi na radioterapię uznano subpopulację komórek szybko dzielących się w guzie. Minimalizowano znaczenie powoli proliferujących komórek lub

znajdujących się w fazie G0 nowotworowych komórek macierzystych (przez analogię do tkanek prawidłowych). Obecność nowotworowych komórek macierzystych za często nawet negowano [14]. Zdawano sobie jednak sprawę z tego, że w wyniku reoksygenacji, zachodzącej w czasie radioterapii, komórki te mogły być przesuwane do przedziału proliferacyjnego, co umożliwiło im mnożenie się, czyli repopulację.

Jakkolwiek model wyróżniający fazę G0 dobrze opisuje cykl podziałowy prawidłowych komórek, jednak nie tłumaczy zróżnicowania populacji komórek nowotworowych w guzie, pod względem kinetyki wzrostu i proliferacji. W tkankach prawidłowych istnieje równowaga pomiędzy produkcją komórek i ich utratą. W nowotworach natomiast przeważa proliferacja, co doprowadza do większego (w przypadku braku środków odżywczych i tlenu) wycofywania komórek z fazy G1 do G0. Głównie z tego powodu w litych guzach liczba komórek nowotworowych w fazie G0 jest znacznie większa.

W 1995 r. roli Baisch i wsp. [15] zaproponowali nowy model proliferacji (*the growth retardation model*), uwzględniający opóźnienia komórek nowotworowych w przechodzeniu przez cykl podziałowy (Ryc. 3). W przeciwieństwie do poprzedniego modelu założono, że komórki krążą w cyklu w szybkim tempie, dopóki nie ulegną spowolnieniu w fazie S lub ulegną apoptozie albo procesowi różnicowania. W modelu tym, w odróżnieniu od poprzedniego, założono również, że w przypadku nieprzychylnych warunków, wycofywanie komórek do fazy spoczynkowej (G0) może mieć miejsce w każdej fazie cyklu, a nie tylko w fazie G1. Również utrata komórek może zachodzić w każdej fazie cyklu, także w fazach S i G2 (Ryc. 3). Subpopulacja komórek mających dobre warunki do wzrostu może proliferować szybko. Jednak wraz ze wzrostem odległości od naczyń krwionośnych tempo wzrostu może ulegać spowolnieniu, a komórki



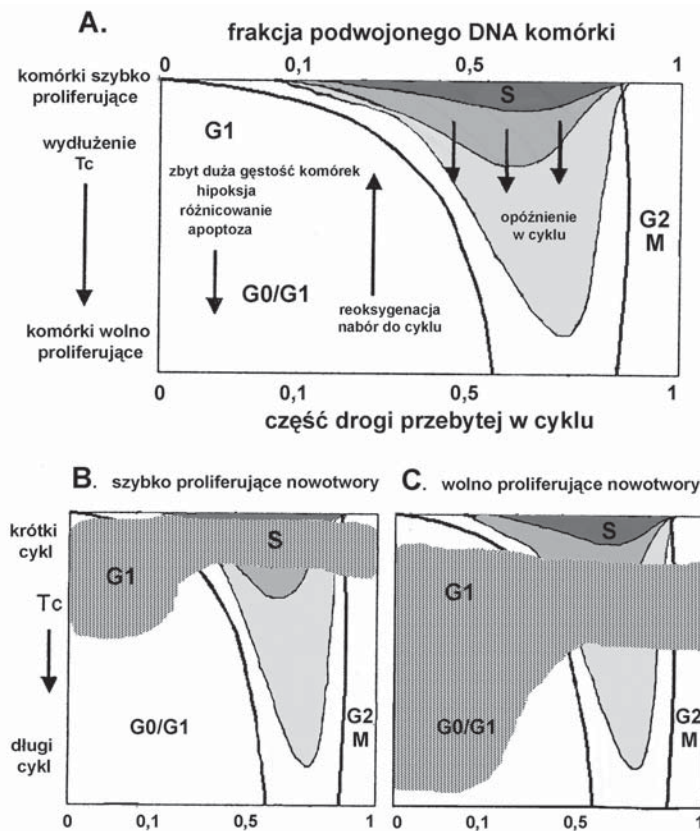
Ryc. 3. Model zróżnicowanej proliferacji komórek wg Baischa i wsp. [15]. Rycina w modyfikacji własnej wg Wilsona [21]. Brak tlenu i środków odżywczych w wyniku niewystarczającego unaczynienia, brak czynników wzrostu lub duża gęstość komórek mogą powodować zatrzymanie komórek w każdej fazie cyklu, co doprowadza do wydłużenia czasu trwania cyklu (T_c – ang. *time cycle*), a w skrajnych przypadkach mogą powodować śmierć komórki

mogą podlegać opóźnieniu w cyklu, co zachodzi wraz ze wzrostem guza. Model Baischa i wsp. dobrze tłumaczy zjawisko zróżnicowania komórek w guzie pod względem przebiegu cyklu komórkowego. Jednak jego wadą jest założenie, że wolno proliferujące komórki powstają z puli komórek szybko dzielących się i ich udziałem jest większa śmiertelność komórek.

Opisywany model nie zyskał powszechnej akceptacji, dlatego w 1999 r. Shackney i Shankey [16] zaproponowali wielopoziomowy model proliferacji komórek nowotworowych (*the proliferation plane model*) (Ryc. 4). Łączy on cechy poprzednich modeli, a także zwraca uwagę na występowanie w obrębie jednej populacji różnych subpopulacji komórek, różniących się tempem wzrostu oraz cechami fizjologicznymi i molekularnymi. Model uwzględnia zarówno różne tempo przechodzenia komórek przez cykl, jak i ich rekrutacji do cyklu. W celu lepszego przedstawienia tego modelu czas przejścia komórki przez cykl, autorzy przedstawili graficznie w płaszczyźnie poziomej (liniowo), w której początek cyklu (faza G1/0) znajduje się w punkcie 0, na początku drogi, faza S w połowie drogi (0,5), a podział komórki (1) na końcu jej celu. Opóźnienie w cyklu (strzałka w dół na Rycinie

4) jest wyrażone czasem trwania cyklu komórkowego (tj. czasem, jaki upływa od zakończenia jednej mitozy do końca następnej), czyli od krótkiego (8-12 godz.) do długiego cyklu (kilkaset tysięcy godzin w niektórych ludzkich nowotworach) (Ryc. 4 A) [16]. Rekrutacja komórek do cyklu jest zaznaczona linią wznoszącą i oznacza przejście komórek z długiego do krótkiego cyklu. Każdy punkt na schemacie cyklu ma określony związek z szybkością syntezy DNA i jego zawartością.

Model prezentuje ograniczoną płaszczyznę, w której komórki przechodzą z lewej do prawej strony; oś x przedstawia część przebytej drogi do mitozy, oś y określa całkowity czas trwania cyklu komórkowego. Górna granica (najciemniejszy kolor) na schemacie prezentuje komórki z najkrótszym cyklem, w którym faza S zajmuje największą część cyklu komórkowego i charakteryzuje się najwyższą szybkością syntezy DNA (najwyższy odsetek IWBrdUrd). Dolna granica natomiast prezentuje najwolniej dzielące się komórki, gdzie szybkość przejścia przez cykl jest tak powolna, że niemożliwe jest odróżnienie ich od komórek zatrzymanych w cyklu (przedział Q). W tych komórkach wolno przesuujących się w cyklu, faza S zajmuje znacznie mniejszą część cyklu i mniejsza jest też



Ryc. 4. Przestrzenny model proliferacji komórek wg Shackneya i Shankeya [16] w modyfikacji własnej. A. Główny schemat modelu. Oś x przedstawia liniowo drogę przejścia komórek w cyklu, od lewej strony do prawej (na podstawie ilości podwojonego DNA komórki), natomiast oś y obrazuje czas trwania cyklu komórkowego. Komórki szybko proliferujące charakteryzuje krótki czas trwania cyklu T_c (górna część płaszczyzny), a komórki najwolniej proliferujące – długi T_c ; znajdują się one w dolnej części płaszczyzny. Najciemniejszy odcień szarości na płaszczyźnie przedstawia szybką proliferację komórek, którą cechuje krótki cykl komórkowy. Na rycinie przedstawiono również hipotetyczne modele rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu (zakresowane pola) dla szybko (B) i powoli dzielących się nowotworów (C), w których większość komórek znajduje się w fazach G0/1

szybkość syntezy DNA (najniższe wartości IWBrdUrd), a większość z nich przebywa w fazie G0/1.

Model jest próbą dostosowania różnego tempa przechodzenia komórek przez cykl i ich rekrutacji do cyklu. Można go zastosować zarówno do szybko (Ryc. 4B), jak i powoli proliferujących komórek (Ryc. 4C). Proces przechodzenia komórek z jednego stanu aktywności mitotycznej w drugi jest możliwy przy założeniu, że punkty restrykcyjne komórek różniących się szybkością wzrostu nie są zamknięte (powolna proliferacja) czy otwarte (szybka proliferacja), ale są otwarte w szybko dzielących się komórkach, a częściowo zamknięte w powoli proliferujących komórkach [16].

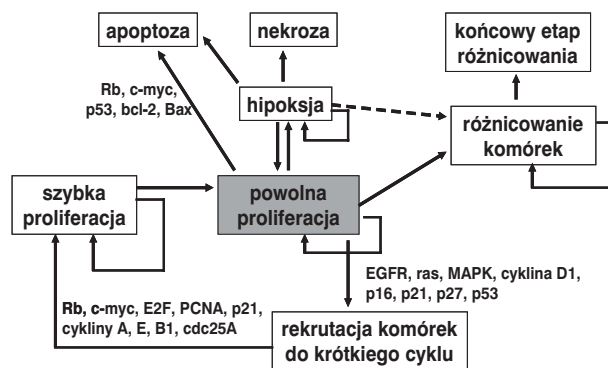
Charakterystyczną cechą cyklu komórek szybko proliferujących jest stosunkowo krótki czas trwania fazy G1 w stosunku do czasu trwania fazy S. W przypadku komórek o powolnym tempie podziałów dochodzi do odwrócenia tych proporcji, najwięcej czasu zajmuje komórkom przejście przez fazy G0/G1, a stosunkowo najmniej przez fazę S. Guzy szybko i powoli dzielące się różnią się także rozkładem komórek w poszczególnych fazach cyklu. W przypadku nowotworów szybko dzielących się stosunkowo niewiele komórek znajduje się w przedziale G0/G1 (Ryc. 4B), natomiast w guzach powoli proliferujących przedział ten obejmuje większość komórek (Ryc. 4C). Przypuszcza się, że część subpopulacji wolno dzielących się komórek po zakończeniu leczenia zachowuje zdolność do podziałów (prawdopodobnie klonogenne komórki nowotworowe) i stają się one odpowiedzialne za późniejszy odrost guza. Tak więc wykazanie powolnego tempa proliferacji nowotworu może wskazywać na potencjalnie dużą pulę komórek zdolnych do podziału po zakończeniu leczenia [17].

W 2003 r., po serii publikacji [18-20] wykazujących pozytywne znaczenie prognostyczne szybkiego tempa proliferacji komórek nowotworowych w radioterapii, George Wilson zaproponował nowy model – zintegrowany model wzrostu nowotworu [21, 22], który jest modyfikacją modelu Shackneya i Shankeya [16]. Uwzględnia on nie tylko różne subpopulacje w nowotworze, ale bierze pod uwagę również różne czynniki wpływające na wzrost nowotworu, takie jak: zróżnicowanie, apoptozę i czynniki mikrośrodowiska. W modelu tym, za podstawową subpopulację komórek, odpowiedzialną za repopulację w trakcie i po radioterapii, uważa się subpopulację powoli proliferujących komórek, z której komórki mogą wchodzić i wychodzić z cyklu w wyniku rekrutacji, różnicowania, apoptozy i nekrozy (Ryc. 5). Jest to subpopulacja komórek zróżnicowana pod względem kinetyki podziałów i trudna do wyróżnienia. Składa się ona nie tylko z powoli dzielących się komórek, ale również z takich, które w odpowiedzi na niesprzyjające warunki środowiskowe wyszły z cyklu do fazy spoczynkowej (G0), a także z komórek charakteryzujących się szybkim tempem podziałów, które uległy zatrzymaniu w fazie S.

Rekrutacja do tej puli powoli proliferujących komórek może być ułatwiona, szczególnie dla komórek nowotworowych, które w dużej części charakteryzują się rozregulowaniem procesów kontrolujących cykl podziałowy, na

skutek mutacji genów kodujących białka odpowiedzialne za ten proces (TP53, cyklina D1). Pula wolno proliferujących komórek może decydować o odpowiedzi na radioterapię, ponieważ stanowi swoisty rezerwuuar, z którego komórki mogą być rekrutowane do krótkiego cyklu i powodować przyspieszoną repopulację (poprzez aktywację receptora tyrozynowej ras-raf-MAP), w wyniku odpowiedzi na uszkodzenie lub redystrybucję komórek. Z populacji tej komórki mogą być również wycofywane z cyklu w procesie np. różnicowania, czy też na skutek niesprzyjających warunków środowiskowych (Ryc. 5) [16]. W procesie tym odgrywa rolę gen supresorowy Rb, punkt restrykcyjny w G1, oraz cyklina D, które chronią powoli proliferujące komórki nowotworowe przed apoptozą i umożliwiają prawidłowe różnicowanie, natomiast w szybko proliferujących nowotworach ochronna rola tych czynników jest wątpliwa [16]. Jak wykazały badania kliniczne, dobrze zróżnicowane raki płaskonabłonkowe mają większy potencjał do przyspieszonej repopulacji po radioterapii niż raki anaplastyczne [23]. Mutacja genu Rb może powodować nasilenie apoptozy, czego kompensacją może być szybka proliferacja komórek nowotworowych.

W populacji komórek nie poddanej działaniu czynników cytotoksycznych apoptozę i różnicowanie komórek stwierdza się preferencyjnie w powoli proliferującej lub nieproliferującej populacji komórek [16]. Przykładem są tkanki prawidłowe (np. nabłonek jelitowy, skóra właściwa, szpik kostny) lub lite guzy, gdzie rejony różnicowania i śmierci komórek są przestrzennie oddzielone od obszaru szybkiej proliferacji, związanej z dopływem krwi.



Ryc. 5. Schemat kluczowych genów i szlaków zaangażowanych w proces wzrostu nowotworu, uwzględniający zróżnicowanie komórek nowotworowych pod względem tempa proliferacji. Rycina wg Wilsona [21], w modyfikacji własnej

Z wielu badań wynika, że komórki spowalniają tempo podziałów, gdy zaczynają proces różnicowania i opuszczenia cyklu. Podobna reakcja występuje w przypadku braku tlenu, środków odżywczych i czynników wzrostu. Schemat ten bardzo dobrze odpowiada konfiguracji kluczowych genów, bardzo często zmutowanych w procesie onkogenezy.

Wydaje się, że najważniejszą zaletą modeli Shankeya i wsp. [16] oraz Wilsona [21] jest zwrócenie uwagi na potencjalne prognostyczne i predykcyjne znaczenie subpopulacji wolno proliferujących komórek w guzie

nowotworowym, jak też przedstawienie molekularnych mechanizmów kontroli cyklu podziałowego komórek nowotworowych. Jest to ważne, ponieważ wykazano, że w tkankach prawidłowych system kontroli cyklu jest jednakowy, natomiast w nowotworach różni się znacznie nawet w obrębie nowotworów tego samego typu histologicznego [24]. Należy jednak pamiętać, że identyfikacja subpopulacji komórek nowotworowych wolno krążących w cyklu jest bardzo trudna. Jest to heterogenna subpopulacja komórek, w której skład wchodzi zarówno komórki mające znaczenie dla radioterapii, które mogą z powrotem wejść w cykl, jak również takie, których przeznaczeniem jest śmierć. W tej grupie mogą znajdować się również nowotworowe komórki macierzyste, które mogą przebywać w fazie G0 (przez analogię do komórek macierzystych tkanek prawidłowych) lub proliferować bardzo powoli, a wykazanie ich obecności na podstawie dostępnych metod, stosowanych w ocenie proliferacji, jest bardzo trudne.

Metody oceny proliferacji komórek nowotworowych

W praktyce klinicznej stosowanych jest wiele metod do oceny kinetyki komórek nowotworowych. Najprostszą i najtańszą, często wykorzystywaną przez patologów do oceny stopnia złośliwości nowotworu, jest liczba mitoz (Tab. I). Stosowane są również metody wyróżniające licz-

bę komórek przeprowadzających syntezę DNA (faza S) i indeks wiązania bromodeoksyurydyny (IW_{BrdUrd}).

W celu oceny **IWBrdUrd** fragmenty nowotworu inkubuje się w medium z BrdUrd przez 1 godz. w 37°C. W czasie godzinnej inkubacji BrdUrd (która jest analogiem tymidyny, nukleotydu wykorzystywanego przez komórki do syntezy DNA) wbudowuje się do komórek aktualnie syntetyzujących DNA. Po ich utrwaleniu i wybarwieniu przeciwciałami monoklonalnymi, sprzężonymi z barwnikami fluorescencyjnymi, analizę przeprowadza się w cytofluorymetrze lub immunohistochemicznie. Indeks wiązania ocenia się na podstawie odsetka komórek, które wbudowały BrdUrd.

Generalnie w analizie jednoparametrycznej IW_{BrdUrd} koreluje z wyleczalnością miejscową nowotworu; wyższe wartości IW_{BrdUrd} wskazują na gorsze wyniki leczenia, ale ten parametr nie ma wpływu na przeżycie chorych. Wyniki są jednak niespójne.

Przeprowadzona w naszym ośrodku analiza $IWBrdUrd$ dla ponad 1000 chorych wykazała odwrotne wyniki. Szybkie tempo wzrostu raka szyjki macicy (leczonego napromienianiem), odbytnicy (przedoperacyjnym napromienianiem) i płuca (operacyjnie) było korzystnym czynnikiem rokowniczym [20, 25-26]. Jednak dla leczonych operacyjnie nowotworów mózgowia to powolne tempo wzrostu (niskie wartości IW_{BrdUrd}) było pozytywnym czynnikiem rokowniczym [27]. Można przypuszczać,

Tab. I. Metody oceny szybkości wzrostu komórek nowotworowych

Metoda	Opis	Zalety	Ograniczenia
Indeks mitotyczny	Ocena liczby mitoz w preparatach histologicznych w mikroskopie świetlnym	Metoda tania i prosta Możliwość oceny preparatów archiwalnych	Subiektywizm w ocenie preparatów Związek z proliferacją może nie być liniowy
Odsetek komórek w fazie S	Ocena indeksu wiązania bromodeoksyurydyny (IW_{BrdUrd}) przy użyciu przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko BrdUrd: 1. analiza cytofluorymetryczna	Wymaga niewielkiej objętości tkanki Możliwość szybkiej analizy tysięcy komórek Metoda powtarzalna Możliwość oceny <i>in vivo</i> po dożylnym podaniu BrdUrd (bez udziału BrdUrd – ocena odsetka komórek w fazie S)	Brak możliwości oceny preparatów archiwalnych, wymaga świeżej tkanki Słaba powtarzalność wyników ze względu na heterogenność wewnątrz nowotworu Słaba zgodność między ośrodkami, ze względu na brak standaryzacji metody
	2. analiza immunohistochemiczna	Względnie prosta i tania	Brak standaryzacji metody Subiektywizm w ocenie preparatów
Markery proliferacji: 1. Cykliny (A, B, E) 2. Antygeny proliferacyjne (Ki-67/MIB, PCNA)	Immunohistochemiczna ocena ekspresji białek w preparatach histologicznych przy zastosowaniu odpowiednich przeciwciał	Wymaga niewielkiej objętości tkanki Możliwość oceny preparatów archiwalnych Względnie tania i prosta Możliwość oceny typu proliferacji	Słaba powtarzalność wyników, ze względu na brak standaryzacji metody Subiektywizm w ocenie preparatów
PET	Wyróżnienie związków fluorotymidyny (FLT) za pomocą obrazowania PET	Metoda nieinwazyjna Możliwość oceny proliferacji w trakcie leczenia Możliwość oceny całej tkanki nowotworowej Eliminacja heterogenności, związanej z pobieraniem materiału z różnych miejsc guza	Metoda droga, wymagająca podania promieniotwórczych znaczników, a więc związana z narażeniem chorego na promieniowanie Ograniczone zastosowanie ze względu na wysoki wychwyty FLT w wątrobie

że znaczenie prognostyczne oceny szybkości wzrostu może zależeć od histologicznego typu nowotworu, jego lokalizacji lub sposobu leczenia. Generalnie, ta metoda uważana jest za najlepszą do oceny proliferacji komórek, ponieważ na jej podstawie uzyskano najlepsze korelacje pomiędzy tempem proliferacji a wynikami leczenia. Dokładniejsze wyniki uzyskuje się po dwukrotnej analizie materiału: przed i w czasie leczenia [20, 28-29], co jednak znacznie komplikuje stosowanie tej metody w praktyce klinicznej.

Na podstawie ekspresji cykliny A, która jest markerem fazy S, możliwe jest wyróżnienie komórek syntetyzujących DNA. Cyklina B jest regulatorem fazy mitotycznej. Wzrost odsetka komórek wykazujących ekspresję cyklin A, B i E wskazuje na szybką proliferację nowotworu.

Kolejna metoda polega na wyróżnieniu komórek krążących w cyklu na podstawie antygenu, znajdującego się na powierzchni jądra komórki. Najczęściej wykorzystuje się antygeny Ki-67 i PCNA. Tą metodą można określić, w przybliżeniu, frakcję wzrostową nowotworu.

W celu oceny IWKi-67 preparaty histologiczne nowotworu barwi się przeciwciałem monoklonalnym anti-Ki-67 o nazwie MIB-1. Poprzez zastosowanie drugorzędowego przeciwciała i barwnika otrzymuje się barwną reakcję, w której komórki znajdujące się w cyklu zostają wybarwione na brązowo. Odsetek komórek wybarwionych pozytywnie odzwierciedla szybkość wzrostu nowotworu, a sposób ułożenia wybarwionych komórek wskazuje na typ proliferacji, który może być uważany za czynnik rokowniczy dla wyników leczenia [16]. Do oceny szybkości proliferacji stosuje się też cykliny, białka charakterystyczne dla cyklu komórkowego.

W latach 80. ubiegłego wieku za najlepszą metodę oceny szybkości wzrostu komórek nowotworowych uznawano potencjalny czas podwojenia nowotworu (T_{pot}), który określa najkrótszy czas, w którym populacja komórek nowotworowych podwaja swą liczbę, bez uwzględnienia utraty komórek ($T_{pot} = \lambda \times T_s / IW$, gdzie λ oznacza poprawkę na nierówny rozdział komórek w cyklu, T_s – czas trwania fazy S, a IW odsetek komórek prowadzących syntezę DNA) [30]. Metoda ta jednak okazała się słabym czynnikiem predykcyjnym i prognostycznym. W wielu badaniach klinicznych wykazano, że T_{pot} nie ma związku z wyleczalnością miejscową i przeżyciem chorych [31]. T_{pot} wykorzystano ostatnio w europejskim badaniu wieloośrodkowym (EORTC 22851), w którym wykazano brak przydatności oceny T_{pot} . Badanie przerwano przed czasem ukończenia, ze względu na zbyt duże różnice w wynikach, otrzymane w 11 ośrodkach biorących w nich udział. Z tego powodu metoda ta nie jest rekomendowana do stosowania w praktyce klinicznej.

Pomiar kinetyki komórek *per se* okazał się nieprzydatny do indywidualizowania leczenia, ponieważ na ten parametr może mieć wpływ wiele czynników, jak np. stan zróżnicowania komórek, czynniki mikrośrodowiska obejmujące stopień utlenowania i dostępność do środków odżywczych, poziom lokalnych czynników wzrostu czy deregulacja genów kontrolujących cykl komórkowy.

Wszystkie te czynniki powodują wysoki stopień wewnątrznowotworowej zmienności.

Wymienione techniki mają szereg ograniczeń. Są metodami inwazyjnymi, wymagającymi pobrania wycinka, co jest trudne w przypadku głębiej położonych guzów. Ponadto, biopsja może nie być reprezentatywna (guzy są heterogenne pod względem proliferacji), a także metody oceny są często subiektywne. Niestety, żadna ze stosowanych metod stosowana pojedynczo nie zyskała cech czynnika predykcyjnego. Dodatkowo, niektórzy badacze [32] sugerują, że na rozbieżności w ocenach prognozy mogą mieć wpływ różnice płciowe między chorymi, co może wskazywać na wpływ hormonów na przebieg procesu nowotworowego. Wykazano ostatnio [32], że nadekspresja EGFR w przerzutowych rakach jelita grubego u kobiet była pozytywnym, a u mężczyzn negatywnym czynnikiem rokowniczym. Na tej podstawie autorzy sugerują, że markery molekularne powinny być analizowane oddzielnie dla kobiet i mężczyzn. Jeśli to okaże się prawdą, to może również wyjaśnić przyczynę różnic w ocenie wartości predykcyjnej szybkiej proliferacji komórek nowotworowych pomiędzy chorymi na raka terenu głowy i szyi (głównie mężczyźni) i szyjki macicy.

Problem reprezentacyjnej próbki materiału do analizy i heterogenności w obrębie nowotworu może pokonać nowa, nieinwazyjna metoda oceny szybkości wzrostu nowotworów – technika czynnościowego obrazowania, jaką jest pozytonowa tomografia emisyjna – **PET**, z wychwytem 18-fluoro-3-deoksy-3-fluorotymidyny (FLT) [33]. Jej atutem są: możliwość ujawnienia przestrzennej organizacji proliferujących komórek w guzie (czego metoda cytofluometryczna nie zapewnia) i możliwość wykonania wielokrotnych pomiarów *in vivo*. Istnieją dane wskazujące na korelację pomiędzy wychwytem FLT a aktywnością proliferacyjną guza [34]. FLT nie jest toksyczna, ma długi połowiczny czas rozkładu wynoszący 110 minut [33]. Ograniczeniem tej metody jest wysoki wychwyty FLT w wątrobie (raki wątroby wykluczone) i niemożliwość wykonania wielu skanów.

Najnowsza metoda oceny proliferacyjnego potencjału komórek polega na zastosowaniu mikromacierzy DNA, wykazujących aktywność genów związanych z cyklem komórkowym, lecz przydatność tej metody musi być dopiero zbadana.

Wraz z rozwojem technik radiobiologii molekularnej kładzie się również nacisk na obecność, niewykrywanych dostępnymi metodami, „długo żyjących” nowotworowych komórek macierzystych, odpowiedzialnych za repopulację w czasie i po leczeniu. Jak wykazano ostatnio, komórki te mogą zawierać mniejszą liczbę reaktywnych form tlenu (RFT), odgrywających znaczącą rolę w radioterapii i większą liczbę enzymów antyoksydacyjnych, w porównaniu do komórek prawidłowych, co może powodować ich promieniooporność [35]. Identyfikacja przeciwciałami monoklonalnymi tych komórek i opracowanie metod ich eliminacji może okazać się przełomem w leczeniu nowotworów złośliwych i może wyznaczać nowe kierunki badań.

Podsumowanie

W ostatnich latach, dzięki postępowi badań nad mechanizmami zjawisk biologicznych, odpowiedzialnych za odpowiedź popromienną nowotworu, zrewidowano pogląd dotyczący proliferacji komórek nowotworowych. Obecnie, za istotnie mające wpływ na leczenie, zamiast szybko proliferujących, uważa się pulę powoli proliferujących komórek, która może zawierać nowotworowe komórki macierzyste. Ze względu na wykazany wpływ innych czynników biologicznych na szybkość wzrostu komórek nowotworowych i stwierdzaną heterogenność tej cechy w obrębie jednego typu histologicznego, proliferacja komórek nowotworowych straciła swoje predykcyjne znaczenie w praktyce klinicznej.

Podziękowania

Autorki dziękują Panu prof. dr hab.

Janowi Skołyszewskiemu za cenne uwagi do maszynopisu.

Prof. dr hab. med. Anna Gasińska

Zakład Radiobiologii Klinicznej
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Garncarska 11, 31-115 Kraków
e-mail: z5gasins@cyf-kr.edu.pl

Piśmiennictwo

- Withers R. The four R's of radiotherapy. *Adv Radiat Biol* 1975; 5: 242-7.
- Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5R's of radiobiology. *Int J Radiat Biol* 1989; 56: 1045-8.
- Maciejewski B, Preuss-Bayer G, Trott KR. The influence of the number of fractions and of overall treatment time on local control and late complication rate in squamous cell carcinoma of the larynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983; 9: 321-8.
- Stell PM. Time to recurrence of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1991; 13: 277-81.
- Trott KR, Kummermehr J. What is known about tumour proliferation rates to choose between accelerated fractionation or hyperfractionation? *Radiation Oncol* 1985; 3: 1-9.
- Wilson GD. Cell kinetics. *Clinical Oncol* 2007; 19: 370-84.
- Overgaard J, Hjelm-Hansen M, Johansen LV i wsp. Comparison of conventional and split-course radiotherapy as primary treatment in carcinoma of the larynx. *Acta Oncol* 1988; 27: 147-52.
- Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol.* 1988; 27: 131-46.
- Saunders MI, Dische S, Fowler JF i wsp. Radiotherapy employing three fractions on each twelve consecutive days. *Acta Oncol* 1988; 27: 163-67.
- Dische S, Saunders M, Barrett A i wsp. A randomised multicentre trial of CHART versus conventional radiotherapy in head and neck cancer. *Radiation Oncol* 1997; 44: 123-36.
- Tubiana M. The kinetics of tumour cell proliferation and radiotherapy. *Br J Radiol* 1971; 44: 325-47.
- Lamerton LF. Cell proliferation kinetics and the differential response of normal and malignant tissues. *Br J Radiol* 1972; 45: 161-70.
- Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1974; 71: 1286-90.
- Denekamp J. Tumour stem cells: facts, interpretation and consequences. *Radiation Oncol* 1994; 30: 6-10.
- Baisch H, Otto U, Hatje U i wsp. Heterogeneous cell kinetics in tumors analyzed with a simulation model for bromodeoxyuridine single and multiple labeling. *Cytometry* 1995; 21: 52-61.
- Shackney SE, Shankey TV. Cell cycle models for molecular, biology and molecular oncology: exploring new dimensions. *Cytometry* 1999; 35: 97-116.
- Wilson GD, Saunders MI, Dische S i wsp. Pre-treatment proliferation and outcome of conventional and accelerated radiotherapy. *Europ J Cancer* 2006; 42: 363-71.
- Zamulaeva IA, Podgorodnichenko VK, Guseva LI i wsp. Prognostic significance of S-phase fraction detected by antithymidine antibodies in epidermoid cervix carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36: 685-8
- Palmqvist R, Oberg A, Bergström C i wsp. Systematic heterogeneity and prognostic significance of cell proliferation in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 917-25.
- Gasinska A, Urbanski K, Jakubowicz J i wsp. Tumour cell kinetics as a prognostic factor in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Radiation Oncol* 1999; 50: 77-84.
- Wilson GD. A new look at proliferation. *Acta Oncol* 2001; 40: 989-94.
- Wilson GD. Proliferation models in tumours. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 525-30.
- Hansen O, Overgaard J, Hansen AS i wsp. Importance of overall treatment time for the outcome of radiotherapy of advanced head and neck carcinoma: dependency on tumor differentiation. *Radiation Oncol* 1997; 43: 47-51.
- Tubiana M. Repopulation in human tumors. *Acta Oncol* 1988; 27: 83-8.
- Gasinska A, Skolyszewski J, Popiela T i wsp. Bromodeoxyuridine labelling index as an indicator of early tumor response to preoperative radiotherapy in patients with rectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 520-28.
- Gasinska A, Kolodziejski L, Biesaga B. Tumour cell kinetics as prognostic factor In surgically-treated-non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1997; 18: 159-70.
- Gasinska A, Skolyszewski J, Glinski B i wsp. Age and bromodeoxyuridine labelling index as prognostic factors in high-grade gliomas treated with surgery and radiotherapy. *Clin Oncol* 2006; 18: 459-65.
- Silvestrini R, Molinari R, Costa A i wsp. Short-term variation in labelling index as a predictor of radiotherapy response in human oral cavity carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 965-9.
- Courdi A, Tubiana M, Chavaudra N i wsp. Changes in labeling indices of human tumors after irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980; 6: 1639-44.
- Steel GG. Growth kinetics of tumours. Oxford: Clarendon Press; 1997.
- Begg AC, Haustermans K, Hart AAM i wsp. The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis. *Radiation Oncol* 1999; 50: 13-23.
- Press OA, Zhang W, Gordon MA i wsp. Gender-related survival differences associated with EGFR polymorphisms In metastatic colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 3037-42.
- Shields AF, Grierson JR, Dohmen BM i wsp. *Nature Med* 1998; 4: 1334-36.
- Francis DL, Freeman A, Visvikis D i wsp. In vivo imaging of cellular proliferation in colorectal cancer using positron emission tomography. *Gut* 2003; 52: 1602-6.
- Diehn, Cho RW, Lobo NA i wsp. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458: 780-3.

Otrzymano: 29 września 2009 r.

Przyjęto do druku: 1 października 2009 r.