

Magdalena Potempa¹, Paweł Jonczyk¹, Marzena Zalewska-Ziob²

¹Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Ogólnej Biologii Lekarskiej w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze

²Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze

Molekularne uwarunkowania raka płuca

Molecular determinants of lung cancer

Adres do korespondencji:

Magdalena Potempa
Katedra i Zakład Ogólnej
Biologii Lekarskiej
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,
Wydział Lekarski z Oddziałem
Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze
Tel: 502 730 040
e-mail: magdalenapotempa@o2.pl

STRESZCZENIE

Rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym i stanowi główną przyczynę zgonów na świecie. Pomimo stałego postępu w diagnostyce i terapii 5-letnie przeżycia pozostają niezadowolające, co spowodowane jest głównie rozpoznawaniem tego nowotworu w wysokim stopniu zaawansowania i brakiem możliwości radykalnego leczenia chirurgicznego. Stały postęp w metodach diagnostycznych i terapeutycznych, związany w dużej mierze z wykorzystaniem technik biologii molekularnej, rodzi nadzieje na poprawę rokowania u chorych na raka płuca. W pracy przedstawiono podłoże molekularne raka płuca, opisano najważniejsze funkcje białek p53, Rb, p16, MYC, RAS oraz skutki mutacji w kodujących je genach. Autorzy przedstawili również wpływ czynników wzrostowych, apoptozy, angiogenezy oraz telomerazy na rozwój procesu nowotworowego, a także nieprawidłowości genetyczne, które mogą służyć za molekularne czynniki predykcyjne.

Słowa kluczowe: rak płuca, podłoże molekularne raka płuca, molekularne czynniki predykcyjne

ABSTRACT

Lung cancer is the most common malignant neoplasm and the main cause of human death. Despite persistent development in the diagnostics and therapy process, 5-year survival is still unsatisfactory. It is caused mostly by detecting lung cancer in advanced stage and that is why there is no possibility for radical treatment resection. Diagnostic and therapeutical progress in molecular biology creates a chance to make overall survival longer. In this paper authors present molecular determinants of lung cancer including main functions of p53, Rb, p16, MYC, RAS proteins and consequences of mutations within the genes encoding them. There is also showed a role of growth factors, apoptosis, angiogenesis and telomerase in the oncogenic transformation. Beside this authors described genetics dysfunctions which may be a molecular predictive factors for lung cancer.

Key words: lung cancer, molecular base of lung cancer, molecular predictive factors

Onkologia w Praktyce Klinicznej
2014, tom 10, nr 4, 199–211
Copyright © 2014 Via Medica
ISSN 1734-3542
www.opk.viamedica.pl

Onkol. Prak. Klin. 2014; 10, 4: 199–211

Wstęp

Rak płuca jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych w większości krajów i stanowi główną przyczynę zgonów na świecie wśród chorób nowotworowych. Szacuje się, że każdego roku rak płuca jest rozpoznawany u niemal 1 miliona mężczyzn i 400 tysięcy kobiet [1]. Nowa klasyfikacja TNM z 2009 roku obejmuje podział tego nowotworu na drobnokomórkowego raka płuca (DRP) oraz niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), do którego należy rak płaskon-

łonkowy, gruczolakorak, rak wielkokomórkowy oraz inne — bardzo rzadkie typy patomorfologiczne. Rakowiak, który jak dotąd nie podlegał żadnej klasyfikacji i nie przypisywano mu żadnego stopnia zaawansowania klinicznego, teraz został uwzględniony w obrębie systemu TNM [2].

Mimo stałego postępu w diagnostyce i terapii wskaźniki przeżycia chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca wciąż pozostają niezadowolające. Przeżycia 5-letnie wynoszą około 15% [3, 4], co jest spowodowane głównie rozpoznawaniem tego

nowotworu w wysokim stopniu zaawansowania i brakiem możliwości radykalnego leczenia chirurgicznego [5]. W DRP wskaźnik przeżycia 3-letniego mieści się w granicach 12–25% dla stadium choroby ograniczonej i maleje do 2% w stadium rozległym nowotworu [6]. Największą zachorowalność na raka płuca obserwuje się pomiędzy 55. a 70. rokiem życia [4]. Liczne badania epidemiologiczne i doświadczalne przeprowadzone już w latach 70. XX wieku potwierdzają, że najistotniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju raka płuca jest wieloletnie palenie tytoniu [7], co pozostaje aktualne po dzień dzisiejszy [8].

W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój badań molekularnych pozwalających lepiej zrozumieć mechanizmy kancerogenezy. Fakt ten skłonił autorów do napisania niniejszej pracy i przedstawienia roli czynników genetycznych w rozwoju raka płuca jako podstawy do zrozumienia patogenezy tego nowotworu.

Podłoże molekularne raka płuca

Pod pojęciem podłoża molekularnego raka płuca należy rozumieć kumulację w jądrze komórki wielu zmian genetycznych i epigenetycznych, które powstają w długim okresie [9]. Proces nowotworowy zostaje zainicjowany, gdy dana komórka wyłamie się spod kontroli mechanizmów decydujących o jej podziałach i lokalizacji. Jej cykl komórkowy przebiega podobnie jak komórek prawidłowych z tą różnicą, że komórka ta nie poddaje się mechanizmom regulującym i staje się

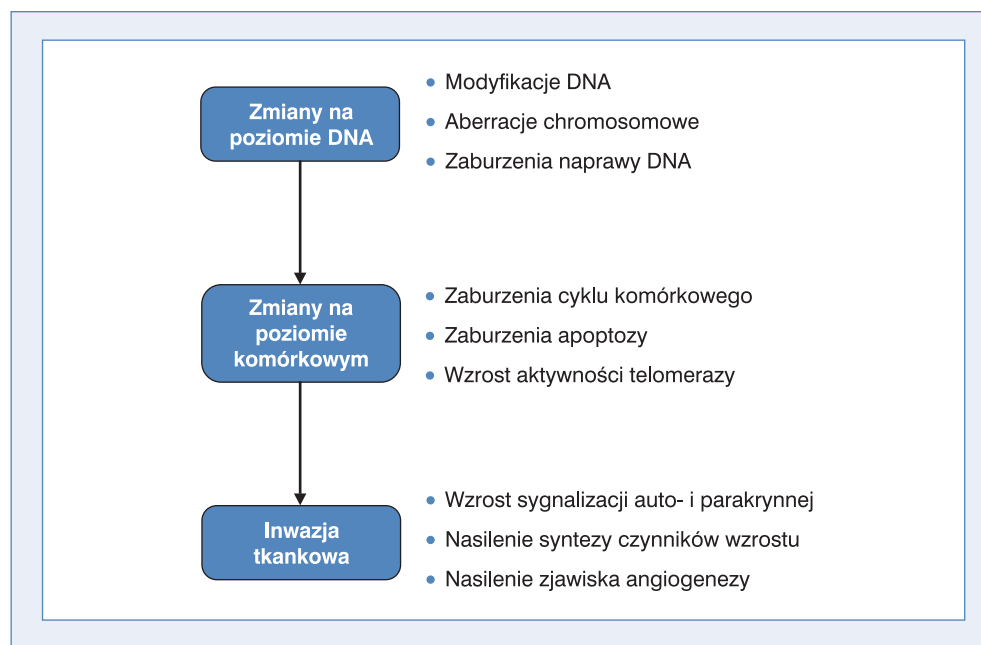
niewrażliwa na sygnały pochodzące od innych komórek. Zaburzenia ekspresji genów regulujących cykl komórkowy odgrywają kluczową rolę w każdej transformacji nowotworowej. Na zainicjowanie i progresję procesu nowotworowego wpływają:

- nieprawidłowości w regulacji cyklu komórkowego
- mutacje protoonkogenów i genów supresorowych;
- zaburzenia procesu naprawy DNA;
- wzmożona ekspresja czynników wzrostu i angiogenezy;
- unikanie apoptozy (mutacje genów anty- i proapoptotycznych);
- wzmożona aktywność telomerazy;
- inwazja tkankowa i proces metastazy (ryc. 1) [10].

Dużą rolę odgrywa również niestabilność całego genomu komórki, pojawiająca się już na początku procesu nowotworzenia. Jest ona efektem stopniowej akumulacji różnych nieprawidłowości genetycznych. Prowadzi to do osłabienia struktury DNA i większej jego podatności na kolejne mutacje [11].

Zaburzenia regulacji cyklu komórkowego

Zaburzenia regulacji cyklu komórkowego dotyczą mutacji w protoonkogenach i genach supresorowych. Brak hamowania proliferacji bądź proliferacja przyspieszona na tyle, by komórka nie była wrażliwa na sygnały hamujące, to istota każdego procesu nowotworowego.



Rycina 1. Podłoże molekularne raka płuca

Geny supresorowe

Geny supresorowe (TSG, *tumor suppressor genes*), zwane też antyonkogenami, są dużą grupą genów odpowiedzialnych za hamowanie nadmiernego wzrostu komórek. Należą one do genów recesywnych, co oznacza, że aby doszło do transformacji nowotworowej, potrzeba mechanizmu dwustopniowego, to jest inaktywacji białkowego produktu genu na skutek mutacji punktowej bądź zmian epigenetycznych w obu allelach. Proces ten nosi nazwę utraty heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*) [12]. Do genów supresorowych, w których najczęściej spotyka się mutacje w komórkach nowotworowych raka płuca, należą *TP53*, *RB* oraz *p16*.

Gen *TP53*

Gen *TP53* z *locus* na 17. chromosomie ze względu na funkcje regulacyjne w procesach komórkowych nosi nazwę „strażnika genomu” bądź molekularnego hamulca w rozwoju nowotworu.

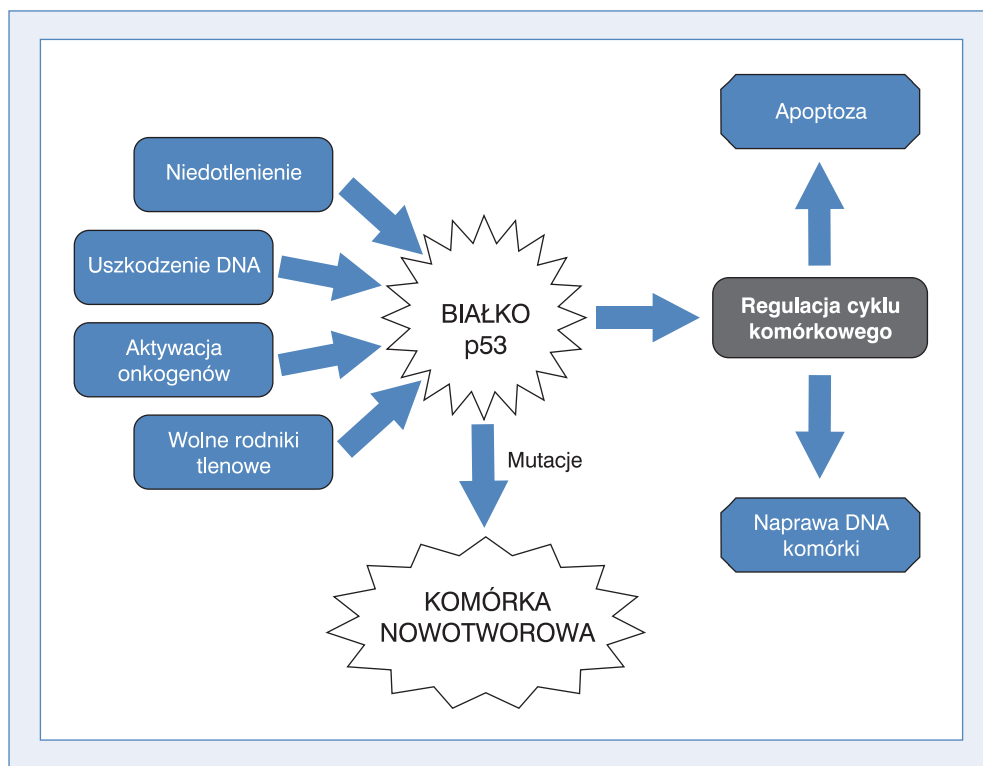
Produkt ekspresji genu *TP53* — białko p53 — hamuje przejście komórki z fazy G1 przez fazę S w fazę G2 cyklu komórkowego. Zatrzymanie to daje komórce czas na naprawę uszkodzeń w obrębie aparatu genetycznego komórki. Gdy naprawa staje się niemożliwa, białko p53 kieruje komórkę na drogę apoptozy (ryc. 2) [13]. Inaktywacja tego białka występuje w około 70% raków

płuca [14]. W prawidłowych komórkach białko p53 jest niewykrywalne metodami immunohistochemicznymi, gdyż występuje w postaci kompleksu z innym białkiem — mdm2, będącym głównym regulatorem komórkowym białka p53 [15].

Mutacje w genie kodującym białko p53 stanowią jedną z najobszerniej opisanych zmian molekularnych w nowotworach złośliwych. Do najczęstszych należą mutacje zmiany sensu z transwersją G→T występujące głównie u palaczy tytoniu. Liczba mutacji w genie *TP53* jest zależna nie tylko od ekspozycji na dym tytoniowy, ale również od konsumpcji alkoholu. Mutacje u chorych na NDRP spożywających jedną porcję alkoholu (40, 150 oraz 360 ml odpowiednio alkoholu wysokoprocentowego, wina oraz piwa) przynajmniej raz dziennie przez okres średnio około 20 lat przed rozpoznaniem u nich NDRP były dużo powszechniejsze niż u osób spożywających mniej alkoholu w ciągu dnia (72% vs. 39%). Największa liczba nieprawidłowości w genie *TP53* występowała u osób palących tytoń oraz spożywających alkohol (76%) [16].

Gen *RB*

Gen supresorowy *RB* (*retinoblastoma* — siatkówczak) ma swoje *locus* na 13. chromosomie, a produktem ekspresji tego genu jest białko Rb o charakterze fosfoproteiny. Aktywną formą białka Rb jest forma nieufosforylowana, która za pomocą wiązania czynnika transkryp-



Rycina 2. Główne funkcje białka p53

cyjnego E2F hamuje przejście komórki z fazy G1 w fazę S cyklu komórkowego, dzięki czemu nie dopuszcza do replikacji nieprawidłowego DNA. Ufosforylowane białko działa hamująco na proces apoptozy przez inhibicję wybranych czynników proapoptotycznych. Ponadto białko Rb współuczestniczy z białkiem p53 w regulacji cyklu komórkowego oraz utrzymaniu równowagi między różnicowaniem a proliferacją komórek [17].

Nieprawidłowości w obrębie genu *RB* w raku płuca to między innymi delecje, mutacje nonsensowne czy chromosomalne delecje [10]. Mutacje w tym genie spotyka się w około 90% przypadków DRP w porównaniu z 15–30% w NDRP [18].

Gen *p16*

Kolejnym genem, którego mutacje są istotne w patogenezie raka płuca jest gen *p16* znajdujący się na chromosomie 9. W wyniku modyfikacji mRNA produktem jego ekspresji mogą być dwa białka. Pierwsze z nich — białko p16 — jest inhibitorem szlaku kinaz cyklinozależnych, który oddziałuje na białko Rb [19]. Zaburzenie funkcji białka p16 skutkuje hiperfosforylacją białka Rb, które staje się nieaktywne i nie hamuje progresji cyklu komórkowego. Drugie kodowane białko — p14 — zwiększa dostępność białka p53 przez wiązanie czynnika hdm2 — homologu mdm2 [18].

Ciekawym zjawiskiem jest odwrotna korelacja między genem *p16* a *RB*. W DRP, gdy gen *RB* ulega mutacji, ekspresja genu *p16* nie jest zaburzona. Z kolei w NDRP gdy ekspresja genu *p16* jest nieprawidłowa, gen *RB* nie ulega mutacji [18].

Protoonkogeny

Do protoonkogenów należą białka regulatorowe cyklu komórkowego, białka biorące udział w procesie apoptozy oraz białka spełniające w komórce inne istotne funkcje, na przykład tworzące kanały jonowe [20]. Mutacje w protoonkogenach należą do mutacji o charakterze dominującym, to jest gdy jeden z 2 alleli ulegnie mutacji, wówczas wadliwy produkt jego ekspresji dominuje funkcjonalnie nad produktem genu prawidłowego [21]. Protoonkogeny, które najczęściej ulegają mutacjom w raku płuca, to rodziny genów *MYC*, *RAS* oraz *HER*. Duże znaczenie przypisuje się również procesowi rearanżacji genu *ALK*.

Rodzina protoonkogenów *MYC* (*c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC*)

Funkcjonalnie są one czynnikami transkrypcyjnymi, których zadanie polega na promocji przejścia komórki z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego. Dodatkowo białka *MYC* aktywują transkrypcję genów zaangażowanych w procesy wzrostu, apoptozy, transformacji, angiogenezy i immortalizacji komórek. Stężenie białek

MYC jest zwiększone na skutek amplifikacji kodujących je genów i ich nadekspresji [22]. Jest to związane ze zwiększoną agresywnością nowotworu oraz zdolnością do dawania przerzutów. Istnieje przypuszczenie, iż poziom amplifikacji genów *MYC* wzrasta wraz z rozwojem oporności na terapię przeciwnowotworową w DRP [23].

Rodzina protoonkogenów *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*)

Produktami genów należących do tej grupy są białka G (mające zdolność hydrolizy GTP), które przenosząc sygnały z receptorów powierzchniowych komórki do jej wnętrza, wpływają na jej prawidłową proliferację i dojrzewanie. Do prawidłowego funkcjonowania białka *RAS* niezbędna jest jego enzymatyczna modyfikacja za pomocą transferazy farnezyli. Tylko w farnezylowanej formie białko jest aktywne i spełnia prawidłowo swoją funkcję w komórce.

W komórkach nowotworowych podstawowymi mutacjami genu *RAS* są mutacje powodujące zmianę aktywności GTP-azy. Prowadzi ona do fałszywego i niczym niekontrolowanego wysyłania sygnału o proliferacji komórki do jądra komórkowego [24]. W DRP mutacje te są bardzo rzadkie, w przeciwieństwie do gruczolakoraków, gdzie częstość tych mutacji ocenia się na około 15–25% [25]. Z reguły są to mutacje punktowe (substytucje) indukowane przez substancje znajdujące się w dymie tytoniowym — benzopiren czy nitrozaminy. Protoonkogen *RAS* to główny protoonkogen ulegający mutacji pod wpływem palenia tytoniu [26].

Rearanżacje genu *ALK*

Zidentyfikowany po raz pierwszy w NDRP w 2007 roku onkogen fuzji jądrowej EML4-anaplastycznej kinazy chłoniaka (*ALK*) jest jednym z białek aktywujących szlaki sygnalizacji komórkowej w komórkach zmienionych nowotworowo [27, 28]. W wyniku inwersji bądź translokacji chromosomowej na chromosomie 2. dochodzi do utworzenia wspomnianego genu fuzyjnego EML4-*ALK*. Rearanżację *ALK* stwierdza się w 2–5% przypadków NDRP, a w typie gruczolowym z częstością 4–6%, niezależnie od rasy [27]. Pomimo relatywnie niskiej częstotliwości występowania połączenia EML4-*ALK* wydaje się istotne wykonywanie badań w kierunku wykrycia rearanżacji *ALK*, ponieważ jej obecność w komórkach raka płuca jest związana z wysoką wrażliwością na specyficzne leczenie — inhibitorami *ALK*. W niedawno przeprowadzonym badaniu I fazy z użyciem inhibitora *ALK* (crizotinib) w EML4-*ALK*-pozytywnych NDRP wykazano, że ogólny odsetek odpowiedzi na leczenie wynosił 57%, a poziom kontroli choroby sięgał aż 90%. To doprowadziło do przyspieszonego zatwierdzenia crizotinibu przez Agencję Żywności i Leków do leczenia zaawansowanego NDRP z obecną rearanżacją *ALK* [28].

Nadekspresja receptorów dla czynników wzrostu i angiogenezy oraz mutacje w kodujących je genach

Receptory dla czynników wzrostu

Czynniki wzrostu stanowią szeroką grupę związków peptydowych produkowanych przez różne typy komórek i wpływających na proliferację i różnicowanie oraz zdolność przetrwania i apoptozę. Receptory dla nich znajdują się na powierzchni komórek i pełnią istotną funkcję w przenoszeniu sygnału z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórki.

Jednym z czynników wzrostowych jest naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), który w NDRP wraz ze swoim receptorem (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) ma największe znaczenie. Receptor EGFR należy do rodziny receptorów ErbB (HER) i składa się z części zewnątrzkomórkowej (odpowiedzialnej za wiązanie ligandu), domeny śródbłonowej oraz części wewnątrzkomórkowej. Ta ostatnia posiada aktywność kinazy tyrozynowej i stanowi szlak sygnałowy prowadzący do jądra komórki [29]. Receptor EGFR występuje dość powszechnie na błonach komórkowych różnego typu komórek. Aktywacja receptora powoduje jego homo- lub heterodimeryzację. Dimeryzacja prowadzi do autofosforylacji domeny wewnątrzkomórkowej, co uruchamia wspomniany już sygnał przenoszony do jądra komórkowego.

Zaburzenie jego funkcji jest jednym z najistotniejszych elementów w patogenezie raka płuca. Funkcje tego receptora mogą być zaburzone na drodze różnych mechanizmów. Należy tu wymienić nadmierną ekspresję *EGFR*, wadliwy mechanizm hamowania aktywności receptora, zwiększone stężenie ligandu, samopobudzanie *EGFR* na drodze mechanizmu autokrynego (*autocrine switch*), heterodimeryzację, wymianę sygnałów pomiędzy receptorami (*cross-talk*) oraz fosforylację krzyżową (*cross-phosphorylation*) [29]. Nadekspresja *EGFR* występuje w 34–90% przypadków raka płuca, co stanowi drugie miejsce ze względu na częstość występowania tej nieprawidłowości, za nowotworami złośliwymi głowy i szyi [30]. Nadekspresja genu *EGFR* jest znamienna przede wszystkim w NDRP i występuje z największą częstością w typie płaskonabłonkowym [31]. Obecnie w praktyce klinicznej znaczenie w NDRP ma nie tyle nadmierna ekspresja *EGFR*, co mutacje w genie kodującym to białko (zlokalizowanym na krótkim ramieniu chromosomu 7), które powodują liczne implikacje w funkcjonowaniu receptora [29]. Są one czynnikiem predykcyjnym dla leczenia anty-EGFR w NDRP [32]. Do głównych mutacji w obrębie genu *EGFR* w raku płuca należy mutacja domeny wewnątrzkomórkowej receptora posiadającej aktywność kinazy tyrozynowej. Powoduje ona ciągłe pobudzanie kinazy i przekazywanie w głąb komórki sygnału do dalszej proliferacji [33].

Spośród 28 eksonów składających się na gen kodujący EGFR, eksony 18.–21. są odpowiedzialne za kodowanie domeny wewnątrzkomórkowej receptora. Mutacje występujące w ich obrębie mogą być rozmaite, lecz tylko niektóre z nich wiążą się z konsekwencjami klinicznymi. Znaczna część mutacji (ok. 50%) w NDRP mieści się w eksonie 19. i polega na delecji jego fragmentu. Są to głównie utraty kilku do kilkunastu par zasad [34]. Jedną z częściej występujących mutacji w tym eksonie polega na utracie aminokwasów w pozycjach 746–750 i jest określona symbolem $\Delta E746-A750$ [35]. Poza tym w eksonie 19. z częstotliwością około 1% wśród chorych na NDRP występuje insercja 6 aminokwasów kodująca część kinazy tyrozynowej [36].

Kolejną obok delecji w eksonie 19. nieprawidłowością w obrębie *EGFR* spotykaną najczęściej w NDRP jest mutacja punktowa w eksonie 21., polegająca na zamianie leucyny (L) w argininę (R) w pozycji 858 łańcucha białkowego, czyli L858R (ok. 33–40%). Jest to tak zwana mutacja aktywująca, ponieważ przyczynia się do niekontrolowanej aktywacji kinazy tyrozynowej w EGFR. U nosicieli mutacji aktywujących kinazę tyrozynową *EGFR* przekazywanie sygnału odbywa się głównie poprzez szlak białek RAS-MAPK-STAT i prowadzi do zahamowania apoptozy. Stąd też ich obecność oraz wywołany efekt wiążą się z pozytywną odpowiedzią chorych na NDRP z wykrytymi tego rodzaju mutacjami na inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*) — erlotynib, gefitynib i afatynib [37]. Zastosowanie TKI prowadzi do apoptozy komórek guza, co klinicznie przejawia się szybką regresją. Mutacje te nie wpływają na stabilność białka, co wyjaśnia brak zależności między odpowiedzią na lek a ekspresją *EGFR* [38]. Istnieją też doniesienia o pozytywnej korelacji pomiędzy obecnością tych mutacji a wrażliwością na radioterapię [39].

Opisano też mutacje warunkujące efekt przeciwny, to jest oporność na terapię TKI EGFR. Do tej grupy mutacji należy między innymi mutacja centrum katalitycznego kinazy tyrozynowej (T790M) w eksonie 20., gdzie zamiast treoniny (T) znajduje się metionina (M). Oporność ta w większości przypadków ma charakter wtórny [40].

Insercje w eksonie 20. między aminokwasami w pozycji 767–774 są również czynnikiem warunkującym zmniejszoną skuteczność TKI EGFR. Jest to również trzecia w kolejności spośród najczęściej występujących mutacji w obrębie *EGFR*. Jej obecność stwierdza się w 4–9,2% przypadków NDRP [41] (ryc. 3). Wyniki niedawnych badań wskazują na obecność w tym eksonie mutacji A763_Y764insFQEA, która wiąże się z wrażliwością na leczenie za pomocą TKI, w odróżnieniu od innych insercji występujących w regionie genu *EGFR* [42].

Mutacje w obrębie eksonów 18.–21. genu dla EGFR występowały znamienne częściej w NDRP o typie gruczołowym, u płci żeńskiej oraz u osób niepalących

tytoniu [35]. Patrząc globalnie, najczęściej tego rodzaju mutacje występują w krajach azjatyckich (ok. 25–40%) [38]. U przedstawicieli rasy kaukaskiej ich częstość ocenia się na 10–16% [43, 44]. Ma to odbicie w lepszej odpowiedzi na terapię ukierunkowaną molekularnie za pomocą TKI w populacji azjatyckiej w porównaniu z rasą kaukaską (27% vs. 10,4%) [45].

Tak zwany wariant III mutacji EGFR — EGFRvIII ($\Delta EGFR$) — powodujący utratę miejsca wiążącego ligand występuje w 16% przypadków raka płuca. Mutacja ta polega na delecji fragmentu genu *EGFR* zawierającego eksony 2–7., które kodują aminokwasy z części zewnątrzkomórkowej receptora, powodując stałą aktywację domeny wewnątrzkomórkowej receptora niezależnie od ligandu [46, 47].

International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) rekomenduje analizę genu *EGFR* (metoda badania nie jest sprecyzowana) u pacjentów z zaawansowanym, nowo wykrytym NDRP [48]. Jest to istotny punkt diagnostyki w praktyce klinicznej, ponieważ wykrycie tej mutacji kwalifikuje chorego do leczenia ukierunkowanego molekularnie. Biorąc pod uwagę ograniczoną skuteczność tego rodzaju sposobu leczenia w ogólnej populacji chorych, prawdopodobieństwo wystąpienia groźnych działań niepożądanych w przypadku niewłaściwej kwalifikacji do chemioterapii oraz względy ekonomiczne (wysoki koszt leczenia), analiza mutacji w genie *EGFR* podczas diagnostyki NDRP wydaje się uzasadniona.

HER2 (ErbB2/neu) (HER, *human epidermal growth factor*) jest kolejnym białkiem należącym do rodziny receptorów HER. Do nieprawidłowości mających znaczenie w praktyce klinicznej terapii raka płuca należą, podobnie jak w *EGFR*, mutacje punktowe zmieniające aktywność domeny kinazy tyrozynowej, głównie o charakterze aktywującym. Ich występowanie określa się na 4% w NDRP [49]. Najczęściej występującą mutacją

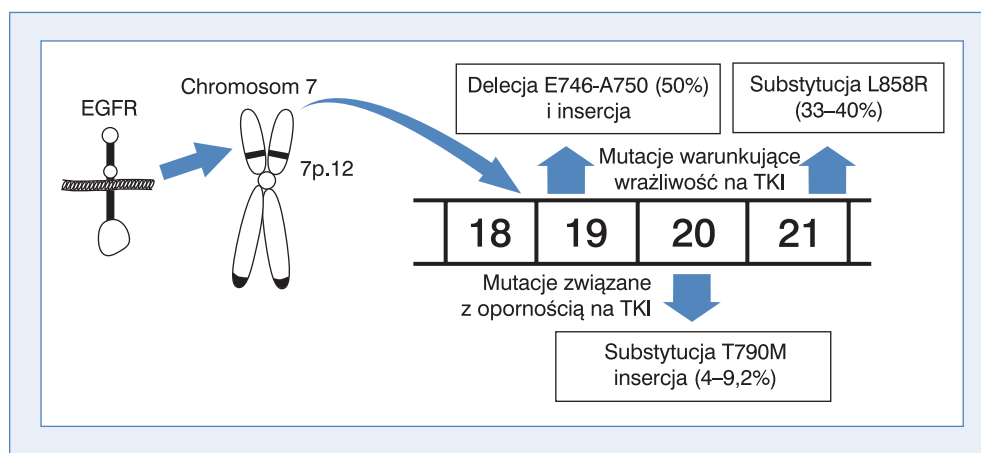
(83%) jest duplikacja bądź insercja w eksonie 20., w obrębie kodonu 775, zawierająca sekwencję aminokwasową o nazwie YVMA (775YVMA) [50]. Obecność mutacji w genie *HER2* wraz z mutacjami aktywującymi w genie *EGFR* powoduje oporność komórek guza na inhibitory kinazy tyrozynowej *EGFR* (erlotynib, gefitynib), ale zachowana zostaje ich wrażliwość na inhibitory *HER2/EGFR* (afetynib) [51].

W raku płuca znaczenie mają również nieprawidłowości w genach kodujących białka bądź domeny wewnątrzkomórkowe receptorów czynników wzrostu o charakterze kinaz, będące częścią szlaków przekazywania informacji z błony komórkowej do jądra. Są to między innymi geny *PiK3CA*, *DDR2*, *BRAF*. Ich aktywacja powoduje ciągłą stymulację komórki do dojrzewania, dzielenia się, proliferacji i przeżycia. Występują one w NDRP z częstością 1–4% z przewagą w typie gruczolowym (*PiK3CA*, *DDR2*) lub płaskonabłonkowym raka płuca (*BRAF*) [52–54].

Czynniki angiogenezy

Unaczynienie jest bardzo istotnym elementem struktury wszystkich tkanek zarówno prawidłowych, jak i patologicznie zmienionych. Fizjologicznie proces ten ma wymiar samoograniczający się, w przeciwieństwie do nieprawidłowej angiogenezy, kiedy to komórki śródbłonkowe dzielą się kilkaset razy dłużej, a ich czas przeżycia jest znacznie dłuższy.

Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) należy do głównych i najsilniejszych czynników proangiogennych. Jest to glikoproteina syntetyzowana przez wiele typów komórek w odpowiedzi na liczne czynniki, między innymi hipoksję [55]. Proangiogenny efekt VEGF jest realizowany za pomocą dwóch transbłonowych receptorów:



Rycina 3. Główne mutacje w domenie kinazy tyrozynowej w obrębie genu *EGFR*. TKI (*tyrosine kinase inhibitors*) — inhibitory kinazy tyrozynowej

VEGFR1 i VEGFR2, których ekspresję wykazują komórki nowotworowe raka płuca [56]. W neoangiogenezie biorą również udział receptory dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR, *platelet-derived growth factor*) i fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR, *fibroblast growth factor*).

W guzie nowotworowym szlak z udziałem VEGF jest stale aktywowany i przewaga czynników proangiogennych nad antyangiogennymi umożliwia wzrost guza. Guz osiągający rozmiary powyżej 3 mm średnicy potrzebuje własnej sieci naczyniowej do dalszego wzrostu [9]. Stąd moment nabycia zdolności tworzenia własnych naczyń odżywiających guz jest czynnikiem niezwykle istotnym w progresji procesu nowotworowego. Kwas mRNA dla VEGF jest obecny w większości komórek nowotworowych, w tym w raku płuca. W komórkach śródbłonna obserwuje się większą ekspresję VEGFR niż samego VEGF. Sugeruje to, iż VEGF w komórkach guza może działać parakrynnie — wydzielony z komórek nowotworowych działa za pomocą receptorów na komórki śródbłonna i je aktywuje. Zostało również udowodnione, że VEGF gromadzi się w pobliżu ogniska nowotworowego nie dalej niż 0,5 mm od granicy guza [57]. Naczynia odżywiające guz mają chaotyczny układ, zmienną średnicę, są kruche i łamliwe, czego skutkiem może być jeden z objawów klinicznych — krwioplucie, które zawsze powinno zwiększyć czujność onkologiczną u lekarza prowadzącego takiego chorego.

Unikanie apoptozy

Apoptoza, nazywana także programowaną, samobójczą, aktywną czy fizjologiczną śmiercią komórki, jest procesem, które warunkuje homeostazę ustroju.

W komórce istnieją 3 główne szlaki prowadzące do apoptozy: szlak aktywacji receptora śmierci (zewnętrzna droga aktywacji), droga mitochondrialna (wewnętrzna droga aktywacji), która rozpoczyna się od zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwolnienia czynników apoptotycznych do cytozolu (przede wszystkim cytochromu C) [58]. Na tej drodze swoje proapoptotyczne funkcje realizuje białko p53. Trzeci szlak prowadzący do śmierci komórki to tak zwany szlak pseudoreceptorowy, odbywający się z udziałem perforyny i granzymu B [59].

Obniżenie zdolności komórek do prawidłowego przeprowadzania apoptozy jako odpowiedzi na bodźce pochodzące z otaczającego środowiska jest istotnym czynnikiem w patogenezie raka płuca.

Bcl-2

Spośród wszystkich znanych dotychczas białek komórkowych Bcl-2 jest najsilniejszym inhibitorem

apoptozy. Oddziałuje ono na mitochondrialny szlak apoptozy przez wiązanie się z cytozolową stroną błony mitochondrialnej. Białko Bcl-2 hamuje uwolnienie cytochromu C z mitochondrium do cytoplazmy, gdzie współtworzy apoptosom. Ten doprowadza do śmierci komórki przez bezpośrednią aktywację kaspaz wykonawczych [60].

W raku płuca dochodzi do nadekspresji białka Bcl-2, co przyczynia się do powstrzymania zainicjowanego procesu apoptozy, a konsekwencją tego może być przetrwanie klonów komórek ze zmienionym kodem genetycznym. Nadekspresję Bcl-2 stwierdza się w 75–95% DRP oraz w 10% gruczolakoraków [61].

Szlak PD-1-PDL-1/PDL-2

Białko zaprogramowanej śmierci-1 (PD-1) jest receptorem hamującym należącym do nadrodziny białek CD28. Jego ligand PD-L1 odgrywa ważną rolę w stosunku do limfocytów T CD8⁺, które utraciły już swoje funkcje podczas przewlekłego zakażenia wirusowego. W badaniach dotyczących ekspresji PD-L1 w tkankach nowotworowych wykazano, że obecność białka PD-L1 w guzach litych u chorych silnie koreluje z niekorzystnym rokowaniem. Ponadto udowodniono, że komórki T CD8⁺ naciekające powierzchnię guza posiadają nasiloną ekspresję białka PD-1. Skutkuje to większymi zaburzeniami układu odpornościowego, w tym zmniejszeniem zdolności produkcyjnej cytokin i pogorszeniem zdolności do proliferacji limfocytów T. Blokada szlaku PD-1/PD-L1 przez PD-L1, specyficzne przeciwciała, częściowo przywraca produkcję cytokin i zwiększa proliferację komórek. Dane te stanowią bezpośredni dowód, że szlak PD-1/PD-L1 jest zaangażowany w pojawiającą się u pacjentów z NDRP dysfunkcję limfocytów T CD8⁺. Ponadto blokada tego szlaku stanowi potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu raka płuca [62]. Najnowsze osiągnięcia nauk klinicznych pozwoliły na stworzenie trzech leków stosowanych w leczeniu NDRP opierających swoje działanie na inhibicji swoistych białek receptorowych na limfocytach. Niwolumab i pembrolizumab to w pełni ludzkie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko cząsteczce PD-1, natomiast ipilimumab jest przeciwciałem monoklonalnym wykazującym działanie blokujące receptor CTLA-4 [63, 64].

Aktywność telomerazy

Telomery to fragmenty DNA zbudowane z wielokrotnych powtórzeń sekwencji złożonej z 6 nukleotydów. W toku kolejnych podziałów komórki telomery ulegają stopniowemu skracaniu, aż staną się na tyle krótkie, że dalsze podziały komórki nie są już możliwe. Telomer

jest więc „molekularnym zegarem”, który informuje komórkę o przekroczeniu krytycznej liczby podziałów i kieruje ją na drogę spoczynku lub apoptozy. Telomery działają jak supresory procesu nowotworzenia, ponieważ ograniczona liczba podziałów (60–70) zapobiega nagromadzeniu się krytycznej liczby (4–6) mutacji prowadzących do rozwoju nowotworu [65].

Kluczową rolę w utrzymaniu długości telomerów i integralności chromosomów odgrywa telomeraza — kompleks złożony z RNA i białka katalitycznego o aktywności odwrotnej transkryptazy. Pozostaje ona stale aktywna w komórkach macierzystych i płciowych, natomiast fizjologicznie nie stwierdza się jej aktywności w komórkach somatycznych. Uaktywnienie telomerazy w komórkach transformowanych eliminuje stopniowe skracanie się telomerów po kolejnych podziałach, a „nieśmiertelne” komórki uzyskują zdolność do nieograniczonej proliferacji. Składowe telomerazy są kodowane przez dwa geny: *TERC* oraz *TERT* [66–68] (ryc. 4).

Wysoką aktywność tego enzymu stwierdzono w prawie 100% przypadków DRP i w około 80% przypadków NDRP [69]. Oznaczanie aktywności telomerazy może być przydatnym markerem prognostycznym w raku płuca, jednak wskaźnik ten nie koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego i typem patomorfologicznym nowotworu [65].

Molekularne wskaźniki predykcyjne w chemioterapii raka płuca

W aspekcie klinicznym raka płuca czynniki molekularne mają zastosowanie do oceny rokowania oraz określenia prawdopodobieństwa uzyskania odpowiedzi na leczenie. Ma to uzasadnienie w stwierdzeniu, że nie wszyscy chorzy, będąc w tym samym stadium choroby nowotworowej według klasyfikacji TNM i dobrym stanie

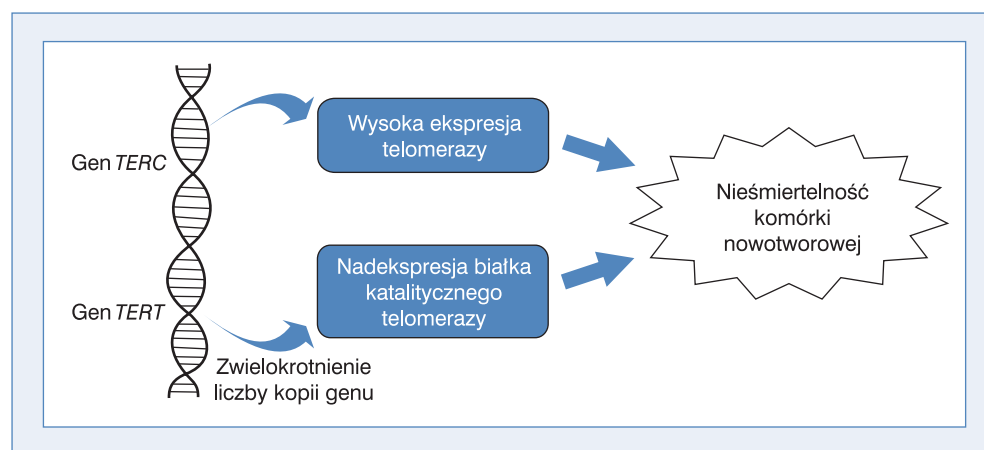
ogólnym, reagują tak samo zadowolająco na leczenie. Co więcej, terapia adjuwantowa przynosi korzyści u około 5–15% pacjentów z NDRP po operacyjnej resekcji guza nowotworowego [70]. W tym celu poszukuje się coraz to nowszych wskaźników na poziomie molekularnym, dzięki którym będzie możliwa precyzyjna kwalifikacja chorych do leczenia przeciwnowotworowego, a tym samym leczenie to będzie bardziej skuteczne. W badaniach klinicznych ocenie poddano korzyści z zastosowania wybranej metody leczenia zgodnie z molekularnym profilem nowotworu.

Do genów, w których liczne mutacje i/lub zaburzona ekspresja są powodem niepowodzeń standardowych terapii i tym samym skłaniają klinicystę do wyboru bardziej ukierunkowanej strategii leczniczej, należą między innymi geny *BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1* oraz *EGFR*. Natomiast w DRP znaczenie predykcyjne mają między innymi zaburzenia w genie kodującym topoisomerazę II α — *TOPO II α* [71].

Gen *BRCA1*

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień naukowych o znaczeniu predykcyjnym tego genu w NDRP. Różny poziom ekspresji tego genu jest przyczyną zmiennej chemiowrażliwości guzów nowotworowych raka płuca.

Gen *BRCA1* ma charakter genu supresorowego. Jego funkcja jest związana z naprawą DNA i utrzymaniem stabilności genomu. Domeny genu *BRCA1* odpowiedzialne za tę funkcję to między innymi domena o charakterze palców cynkowych RING związana z białkiem o nazwie BARD1 (*BRCA1-associated RING domain*) [72]. Białka związane z C-końcowym fragmentem genu *BRCA1*, BRCT — Abraxas i RAP80 — są niezbędne do realizacji funkcji naprawczej i regulującej cykl komórkowy. Zostało udowodnione, iż w momencie nieobecności



Rycina 4. Mechanizm aktywacji telomerazy w komórkach nowotworowych

tych białek komórki nowotworowe stają się wrażliwsze na promieniowanie [73].

Produkt ekspresji genu *BRCA1*, białko o tej samej nazwie, bierze udział w różnych rodzajach procesu naprawy DNA, przede wszystkim w naprawie uszkodzeń obu nici DNA (DSB, *double-strand break*), szczególnie niebezpiecznych dla komórki, ponieważ mogą powodować nieodwracalne zmiany w genomie [72]. Ponadto białko BRCA1 współtworzy wiele kompleksów białkowych przeznaczonych do naprawy DNA, między innymi kompleksu BASC (*BRCA1, associated genome surveillance complex*) [74].

Bardzo ważną funkcją białka BRCA1 z punktu widzenia praktyki klinicznej jest regulacja tworzenia wrzeciona podziałowego poprzez oddziaływanie z β -tubuliną [72]. Ma to swoje implikacje w wyborze metody leczenia. Z niskim poziomem ekspresji mRNA dla białka BRCA1 są związane zaburzenia formowania się wrzeciona podziałowego, co może wpłynąć na skuteczność doksetakselu lub paklitakselu oddziałujących z wrzecionem podziałowym. Natomiast wysoka ekspresja genu *BRCA1* jest związana z intensywnym tworzeniem się wrzeciona kariokinetycznego, stąd duża wrażliwość komórek na te leki.

Niska ekspresja genu *BRCA1* koreluje z pozytywną odpowiedzią komórek NDRP na leczenie związkami platyny, które formują addukty z DNA komórek nowotworowych i zaburzają w nich proces replikacji tymi lekami. Niska ekspresja *BRCA1* powoduje, że naprawa materiału genetycznego uszkodzonego przez pochodne platyny nie może być wykonana i komórki giną. Natomiast chemiooporność obserwuje się w przypadku wysokiego poziomu ekspresji genu *BRCA1* [75–78].

Poziom ekspresji genu *BRCA1* ma również związek z paleniem tytoniu. U chorych na NDRP palących tytoń stwierdzono wyższy poziom ekspresji genu *BRCA1* niż u niepalących. Zróznicowanie poziomu ekspresji genu *BRCA1* dotyczy także typu patomorfologicznego NDRP i wskazuje na typ gruczolowy NDRP, w którym ekspresja tego genu jest najwyższa [79].

Zaburzenia ekspresji genu *BRCA1* są uwarunkowane zaburzeniami epigenetycznymi — hipermetylacją miejsca promotorowego, która skutkuje zmniejszoną ekspresją tego genu. Istnieją doniesienia pokazujące, że hipermetylacja występuje aż w 30% przypadków NDRP i stanowi to mechanizm decydujący w aspekcie posiadania przez komórki nowotworowe niskiego poziomu ekspresji genu *BRCA1* [80]. Autorzy innej pracy wykazali zaś niewielką liczbę takich nieprawidłowości (ok. 4%) [81].

Geny *ERCC1* i *RRM1*

Poszukiwania czynników predykcyjnych dla NDRP skłoniły badaczy do zainteresowania się genami *excision*

repair cross-complementation group 1 (ERCC1) oraz *ribonucleotide reductase M1 (RRM1)*. Pierwszy z nich jest jednym z najważniejszych genów biorących udział w procesie naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów (NER, *nucleotide excision repair*) i jego aktywacja następuje w odpowiedzi na pojawienie się wiązań krzyżowych w obrębie nici DNA. Produkt ekspresji tego genu, białko enzymatyczne o tej samej nazwie, rozpoznaje miejsca uszkodzenia materiału genetycznego i je wycina. Gen ten ma również istotne znaczenie kliniczne w kontekście terapii związkami platyny, które powodują uszkodzenia DNA usuwane właśnie przy udziale białka ERCC1. Tak więc wysoka ekspresja kodującego go genu wiąże się z realną szansą naprawy uszkodzonego przez związki platyny DNA, co w konsekwencji nie powoduje śmierci komórki, a terapia związkami platyny staje się nieskuteczna bądź jej skuteczność jest osłabiona [82].

Markerem, którego poziom ekspresji wraz z ekspresją genu *ERCC1* może stanowić jeszcze silniejszy czynnik predykcyjny u chorych na NDRP, jest białko MSH2 (*MSH2, MutS human homolog 2*). Białko MSH2 jest niezbędne do naprawy molekularnych uszkodzeń powodowanych przez związki platyny. Niska ekspresja tego białka może skutkować większą skutecznością tych leków i wydłużeniem przeżycia chorych. Równocześnie niska ekspresja zarówno *ERCC1*, jak i *MSH2* stanowi jeszcze silniejszy czynnik predykcyjny. Hipermetylacja miejsca promotorowego genu kodującego białko MSH2 powoduje zaś jego deregulację i jest związana z gorszym rokowaniem głównie wśród niepalących kobiet chorych na NDRP [83].

Rola prognostyczna genu *ERCC1* w NDRP została opisana w 2006 roku. Wykazano, że chorzy z doszczętnie wyciętym guzem i brakiem bądź niską ekspresją mRNA dla *ERCC1* otrzymali korzyść z terapii adjuwantowej związkami platyny w przeciwieństwie do chorych wykazujących wysoką ekspresję tego genu w guzie nowotworowym [82].

Produktem genu *RRM1* jest białko spełniające rolę domeny katalitycznej reduktazy rybonukleotydowej, tworzącej deoksorybonukleotydy przede wszystkim dla komórek o dużym potencjale proliferacji (komórki nowotworowe).

Badania przedkliniczne wskazują na fakt, iż wysoka ekspresja tego genu koreluje ze zmniejszeniem proliferacji komórek, mniejszą inwazyjnością nowotworu i mniejszym potencjałem metastatycznym. W aspekcie skuteczności chemioterapii nadekspresja genu *RRM1* ma znaczenie podczas leczenia zaawansowanego NDRP za pomocą gemcytabiny (inhibitor reduktazy rybonukleotydowej). Wysoka ekspresja *RRM1* wiąże się z opornością komórek na działanie tego leku [84, 85]. Wyniki najnowszych badań na ten temat potwierdzają tę zależność [86]. Gemcytabina jako analog 2-deoksycytydyny podlega wewnątrzkomórkowemu

procesowi podwójnej fosforylacji, a następnie jest rozpoznawana przez reduktazę rybonukleotydową jako właściwy substrat [87]. Dodatkowo istnieje doniesienie na temat znaczenia pomiaru poziomu mRNA dla *RRM1* w limfocytach krwi obwodowej w aspekcie chemiowrażliwości. Niska ekspresja tego genu we krwi obwodowej wiąże się z pozytywną odpowiedzią na leczenie gemcytabiną oraz dobrym rokowaniem u chorych na zaawansowanego NDRP [88]. Wykazano jednak, że po leczeniu chirurgicznym NDRP w stadium mniej zaawansowanym, bez chemioterapii pooperacyjnej, wysoka ekspresja *RRM1* korelowała z dłuższym czasem przeżycia [89].

Gen *TOPO IIα*

Gen *TOPO IIα* koduje topoisomerazę *IIα*, białko katalityczne z rodziny topoisomeraż zaangażowane we wszystkie procesy związane z rozplataniem komplementarnych nici DNA.

Ludzka topoisomeraza typu II jest białkiem jądrowym mającym znaczenie przy podziale komórki, kiedy niezbędne jest rozdzielenie dwóch kopii każdego z chromosomów. By uniknąć splatania się razem dwóch siostrzanych chromosomów, topoisomeraza II umożliwia jednej helisie DNA przejście przez inną helisę. Topoisomeraza II posiada dwie izoformy: α i β . W regulacji cyklu komórkowego izoforma β związana jest z segregacją nowo zreplikowanych par chromosomów, kondensacją i formowaniem szkieletu chromosomów oraz modyfikacją superhelisy DNA. Natomiast ekspresja izoformy β pozostaje na stałym poziomie podczas trwania cyklu komórkowego, a jej funkcja nie została do końca dokładnie określona [90, 91].

Zmiany w ekspresji topoisomerazy *IIα* mają znaczenie w rozwoju oporności wielolekowej (MDR, *multidrug resistance*). To zjawisko jest jedną z głównych przyczyn niepowodzeń systemowej terapii przeciwnowotworowej [92]. Wykazano, że w raku płuca występuje jeden typ MDR, tak zwany atypowy spowodowany przez zmiany ekspresji *TOPO IIα*. Ten typ oporności wiąże się z obniżoną ekspresją genu bądź z zaistnieniem mutacji

zmieniających interakcje enzymu z lekiem ku niemu skierowanym lub z DNA [93].

W ostatnim czasie szczególne zainteresowanie budzi predykcyjna wartość oznaczenia ekspresji genu *TOPO IIα* w raku płuca. Większe jego znaczenie obserwuje się w DRP, w którym leki hamujące aktywność topoisomerazy *IIα* są stosowane częściej niż w NDRP [94]. Wysoka ekspresja *TOPO IIα* była obserwowana między innymi w raku piersi i NDRP, lecz nie miała ona znaczenia rokowniczego [95]. Nie wykazała też istotnej korelacji z rokowaniem i odpowiedzią na terapię [96].

W DRP dowiedziono, że wyższa ekspresja *TOPO IIα* wiąże się z nabyciem przez komórki nowotworowe chemiooporności [97]. Niski poziom ekspresji tego genu, podobnie jak genu *ERCC1* w NDRP, w DRP wiązał się z lepszymi wskaźnikami przeżycia podczas terapii cisplatyną oraz etopozydem [98]. Dodatkowo pojawiły się w literaturze doniesienia o możliwości wywoływania przez *TOPO IIα* oporności krzyżowej na inne rodzaje leków przeciwnowotworowych używane również w NDRP. Jednak wiedza na ten temat jest jeszcze niepełna [99].

Podsumowanie najważniejszych wiadomości dotyczących wykorzystania w praktyce klinicznej molekularnych wskaźników predykcyjnych w raku płuca znajduje się w tabeli 1.

Podsumowanie

Przedstawione przez autorów podłoże molekularne raka płuca pokazuje, że do powstania tego nowotworu potrzebna jest kumulacja wielu nieprawidłowości genetycznych. Szybki rozwój biologii molekularnej, jaki obserwuje się w ostatnich latach, stwarza szanse na dogłębną analizę zmian w genomie, które prowadzą do rozwoju nowotworu.

W trakcie karcynogenezy kluczowe znaczenie mają mutacje w genie *p53*, którego działanie jest wielokierunkowe. Mutacje innych genów (*Rb*, *MYC*, *RAS*, *EGFR*) współistniejące z dysfunkcją białka *p53* powodują znacznie większe prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej. W praktyce klinicznej dużego znaczenia

Tabela 1. Poziom ekspresji genów będących czynnikami predykcyjnymi w raku płuca i ich znaczenie w terapii tego nowotworu

Typ raka płuca	Gen	Leczenie	Poziom ekspresji genu	
			Niski	Wysoki
Niedrobnokomórkowy rak płuca	<i>BRCA1</i>	Pochodne taksoidów	Oporność	Wrażliwość
		Związki platyny	Wrażliwość	Oporność
	<i>ERCC1</i>	Związki platyny	Wrażliwość oraz	Oporność oraz mniejsza
			skuteczniejsza terapia adjuwantowa	skuteczność terapii adjuwantowej
	<i>RRM1</i>	Gemcytabina	Wrażliwość	Oporność
Drobnokomórkowy rak płuca	<i>TOPO IIα</i>	Związki platyny, etopozyd	Wrażliwość	Oporność

nabiera poszukiwanie nieprawidłowości w konkretnych genach, które — jako molekularne czynniki predykcyjne — mogą przyczynić się do bardziej ukierunkowanej i skuteczniejszej terapii przeciwnowotworowej oraz decydować o lepszym rokowaniu. Stosowanie w praktyce klinicznej testów predykcyjnych z użyciem wszystkich wymienionych w niniejszej pracy markerów nie stanowi jeszcze procedury rutynowej. Jednak niektóre z nich są silnym punktem procesu diagnostycznego w raku płuca i zostały wpisane w algorytm postępowania terapeutycznego. Należy do nich określenie profilu mutacji w genie *EGFR*, na podstawie którego chory jest kwalifikowany do leczenia celowanego TKI *EGFR*. Także oznaczanie rearanżacji w genie *ALK* stanowi podstawę do terapii inhibitorami *ALK*. Autorzy pracy mają jednak nadzieję, że dzięki postępowi w diagnostyce molekularnej możliwe będzie w niedalekiej przyszłości wykrywanie raka płuca we wczesnym, nieinwazyjnym stadium, co stworzy szansę skutecznej terapii przeciwnowotworowej.

Podziękowania

Autorzy pracy składają serdecznie podziękowania Panu Prof. Maciejowi Krzakowskiemu za pomoc w powstaniu tej pracy, poświęcony czas oraz za cenne uwagi merytoryczne. Bardzo dziękujemy.

Piśmiennictwo

- Boyle P., Lenin B. World Cancer Report 2008; WHO, IARC; Lyon 2008: 390–390.
- Goldstraw P. International Association for The Study of Lung cancer Staging manual in Thoracic Oncology. Orange Park, Editorial Rx Press 2009.
- Krzakowski M. Niedrobnokomórkowy rak płuca. Postępy Nauk Med. 2011; 2: 123–125.
- Rzyman W. Rak płuca. Forum Med. Rodz. 2008; 2: 407–419.
- Didkowska J. Epidemiologia i etiopatogeneza nowotworów płuca. W: Jassem J., Krzakowski M. (red.). Nowotwory klatki piersiowej. Praktyczny przewodnik dla lekarzy. Wydanie II. Via Medica, Gdańsk 2013: 1–19.
- Krzakowski M., Orlowski T., Roszkowski K., Reinfuss M., Olszewski W. Drobnokomórkowy rak płuca. Zalecenia diagnostyczno-terapeutyczne Polskiej Grupy Raka Płuca. Onkol. Prak. Klin. 2007; 1: 1–7.
- Doll R., Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctor. Br. Med. J. 1976; 2: 1525–1536.
- Jassem E., Szymanowska A., Siemińska A., Jassem J. Palenie tytoniu a rak płuca. Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 469–473.
- Panom S. Z. Molecular biology of the lung cancer. Radiol. Oncol. 2005; 39: 197–210.
- Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57–70.
- Massion P.P., Carbone D.P. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. Respir. Res. 2003; 4: 1–12.
- Jorde Lynn B., Carem J.C., Bamshad M.J., White R.L. Genetyka nowotworów. Genetyka Medyczna; Elsevier, Wrocław 2014: 208–225.
- Kowalczyk P. Gen p53 jako hamulec molekularny przeciwdziałający powstawaniu nowotworów. Med. Rodz. 2010; 2: 31–38.
- Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. Ann. NY Acad. Sci. 2000; 910: 121–137.
- Manfredi J.J. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. Genes Dev. 2010; 24: 1580–1589.
- Ahrendt S.A., Chow J.T., Yang S.C. i wsp. Alcohol Consumption and Cigarette Smoking Increase the Frequency of p53 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Res. 2000; 60: 3155–3159.
- Vietri M., Bianchi M., Ludlow J.W., Mitnacht S., Villa-Moruzzi E. Direct interaction between the catalytic subunit of Protein Phosphatase 1 and pRb. Cancer Cell International. 2006; 6: 3.
- Rom W.N., Hay J.G., Lee T.C., Jiang Y., Tchou-Wong K.M. Molecular and genetic aspects of lung cancer. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161: 1355–1367.
- Shackelford R.E., Kaufmann W.K., Paules R.S. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. Environ. Health Perspect. 1999; 107: 5–24.
- Kopczyński P., Krawczyński M.R. Rola onkogenów i genów supresji nowotworowej w ontogenezie. J. Med. Sci. 2012; 6: 679–681.
- Gawron K., Wiczowski A., Adamek B. Molekularne wskaźniki procesów nowotworowych w diagnostyce klinicznej. Pol. Merkuriusz Lek. 2005; 18: 323–327.
- Forgacs E., Zochbauer-Muller S., Olah E., Minna J.D. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. Pathol. Oncol. Res. 2001; 7: 6–13.
- Paulson K.G., Lemos B.D., Feng B. i wsp. Array-CGH reveals recurrent genomic changes in Merkel cell carcinoma including amplification of L-Myc. J. Invest. Dermatol. 2009; 6: 1547–1555.
- Mascaux C., Iannino N., Martin B. i wsp. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. Br. J. Cancer 2005; 92: 131–139.
- Brose M.S., Volpe P., Feldman M. i wsp. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer Res. 2002; 62: 6997–7000.
- Ahrendt S.A., Decker P.A., Alawi E.A. i wsp. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. Cancer 2001; 6: 1525–1530.
- Takamochi K., Takeuchi K., Hayashi T. i wsp. A rational diagnostic algorithm for the identification of ALK rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of surgically treated Japanese patients. PLoS One 2013; 8 (8): e69794.
- Li Y., Pan Y., Wang R. i wsp. ALK-rearranged lung cancer in Chinese: a comprehensive assessment of clinicopathology, IHC, FISH and RT-PCR. PLoS One 2013; 8 (7): e69016.
- Wojtkiewicz M.Z., Rybaltowski M., Sierko E. Podstawy biologiczne terapii ukierunkowanej na receptor czynnika wzrostu naskórka (EGFR). Nowotwory 2008; 3: 260–271.
- Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. Endocr. Relat. Cancer 2001; 8: 3–9.
- Golecki M. Postępy w terapii celowanej niedrobnokomórkowego raka płuca. Adv. Clin. Exp. Med. 2006; 6: 1107–1112.
- Fukuoka M., Wu Y.L., Thongprasert S. i wsp. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). J. Clin. Oncol. 2011; 29: 2866–2874.
- Doebele R.C., Oton A.B., Peled N., Ross Camidge D., Bunn Jr. P.A. New strategies to overcome limitations of reversible EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2010; 69: 1–12.
- Mitsudomi T., Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. FEBS J. 2010; 277: 301–308.
- Szumera-Ciećkiewicz A., Olszewski W.T., Tysarowski A. i wsp. EGFR mutation testing on cytological and histological samples in non-small cell lung cancer: a Polish, single institution study and systematic review of European incidence. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2013; 6: 2800–2812.
- He M., Capelletti M., Nafa K. i wsp. EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. Clin. Cancer Res. 2012; 18: 1790–1797.
- Sordella R., Bell D.W., Haber D.A., Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate the anti-apoptotic pathways. Science 2004; 350: 1163–1167.
- Kowalczyk A., Szutowicz-Zielińska E., Dziadziuszko R., Jassem J. Znaczenie inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. Onkol. Prak. Klin. 2005; 1: 217–224.
- Sierko E., Wojtkiewicz M.Z. Patofizjologiczne podstawy kojarzenia radioterapii z leczeniem ukierunkowanym na hamowanie funkcji EGFR. Onkol. Prakt. Klin. 2010; 5: 255–263.
- Mitsudomi T., Kosaka T., Endoh H. i wsp. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 2513–2520.
- Arcila M.E., Nafa K., Chaff J.E. i wsp. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. Mol. Cancer Ther. 2013; 12: 220–229.
- Yasuda H., Park E., Yun C.H. i wsp. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR)

- exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci. Transl. Med.* 2013; 18 (5): 216ra177.
43. Rosell R., Moran T., Queralt C. i wsp. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 958–967.
 44. Marchetti A., Martella C., Felicioni L. i wsp. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 857–865.
 45. Fukuoka M., Yano S., Giaccone G. i wsp. Multi-Institutional Randomized Phase II Trial of Gefitinib for Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 2237–2246.
 46. Okamoto I., Kenyon L.C., Emler D.R. i wsp. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2003; 94: 50–56.
 47. Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Szambora P. Patofizjologiczne podstawy terapii ukierunkowanej na zahamowanie funkcji receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR). *Onkol. Prak. Klin.* 2010; 6: 217–227.
 48. Lindeman N.I., Cagle P.T., Beasley M.B. i wsp. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J. Mol. Diagn.* 2013; 15: 415–453.
 49. Li C., Sun Y., Fang R. i wsp. Lung adenocarcinomas with HER2-activating mutations are associated with distinct clinical features and HER2/EGFR copy number gains. *J. Thorac. Oncol.* 2012; 7: 85–89.
 50. Arcila M.E., Chaff J.E., Nafa K. i wsp. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 4910–4918.
 51. Garrido-Castro A.C., Felip E. HER2 driven non-small cell lung cancer (NDRP): potential therapeutic approaches. *Transl. Lung Cancer Res.* 2013; 2 (2): 122–127.
 52. Kawano O., Sasaki H., Endo K. i wsp. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer* 2006; 54 (2): 209–215.
 53. Brose M.S., Volpe P., Feldman M. i wsp. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 2002; 62 (23): 6997–7000.
 54. Hammerman P.S., Sos M.L., Ramos A.H. i wsp. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discovery* 2011; 1 (1): 78–89.
 55. Grosicki S., Grosicka A., Hołowiecki J. Kliniczne znaczenie angiogenezy i czynników ją modyfikujących w onkematologii. *Wiad. Lek.* 2007; 60: 39–46.
 56. Hicklin D.J., Ellis L.M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Oncol.* 2005; 5: 1011–1027.
 57. Dvorak H.F., Sioussat T.M., Brown L.F. i wsp. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J. Exp. Med.* 1991; 5: 1275–1278.
 58. Łabędzka K., Grzanka A., Izdebska M. Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2006; 60: 439–446.
 59. Stępień A., Izdebska M., Grzanka A. Rodzaje śmierci komórki. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2007; 61: 420–428.
 60. Karczmarek-Borowska B., Zmorzyński S., Filip A., Wojciorowski J. BCL-XL jako czynnik prognostyczny nowotworów? *Wspol. Onkol.* 2010; 1: 7–10.
 61. Kaiser U., Schilli M., Haag U. i wsp. Expression of bcl-2-protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1996; 15: 31–40.
 62. Zhang Y., Huang S., Gong D. i wsp. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol. Immunol.* 2010; 7 (5): 389–395.
 63. Zielinski C., Knapp S., Mascaux C. i wsp. Rationale for targeting the immune system through checkpoint molecule blockade in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2013; 24 (5): 1170–1179.
 64. Langer C.J. Emerging Immunotherapies in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NDRP): The Role of Immune Checkpoint Inhibitors. *Am. J. Clin. Oncol.* 2014. Epub ahead of print. PubMed PMID: 24685885.
 65. Kowalska A., Kowalik A. Telomer i telomeraza w onkogenezie. *Wspol. Onkol.* 2006; 10: 485–496.
 66. Heaphy C.M., Meeker A.K. The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 15: 1227–1238.
 67. Blasco M.A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Gen.* 2005; 6: 611–622.
 68. Wyczońska B. Zachowanie długości telomerów. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2013; 67: 1319–1330.
 69. Albanell J., Lonardo F., Rusch V. i wsp. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997; 89: 1609–1615.
 70. Hotta K., Matsuo K., Ueoka H., Kiura K., Tabata M., Tanimoto M. Role of adjuvant chemotherapy in patients with resected non-small-cell lung cancer: reappraisal with a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 3860–3867.
 71. Skrzypski M. Molekularne wskaźniki rokownicze i predykcyjne w nowotworach klatki piersiowej. W: Jassem J., Krzakowski M. (red.). *Nowotwory klatki piersiowej. Praktyczny przewodnik dla lekarzy.* Wyd. II. Via Medica, Gdańsk 2013: 66–74.
 72. Gachechiladze M., Skarda J. The role of BRCA1 in non-small cell lung cancer. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech Repub.* 2012; 156: 200–203.
 73. Wang B., Matsuo K., Ballif B. i wsp. Abraxas and Rap80 form a novel BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* 2007; 316: 1194–1198.
 74. Wang Y., Cortez D., Yazdi P., Neff N., Elledge S. J., Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 2000; 14: 927–939.
 75. Taron M., Rosell R., Felip E. i wsp. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13: 2443–2449.
 76. Rosell R., Perez-Roca L., Sanchez J.J. i wsp. Customized Treatment in Non-Small-Cell Lung Cancer Based on EGFR Mutations and BRCA1 mRNA Expression. *PLoS One* 2009; 4: e5133.
 77. Yang Y., Xie Y., Xian L. Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) predict clinical outcome in platinum- and taxol-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer (NDRP) patients: a system review and meta-analysis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2013; 32: 15.
 78. Rosell R., Skrzypski M., Jassem E. i wsp. BRCA1: A Novel Prognostic Factor in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2007; 2: e1129.
 79. Han Y., Li G., SU C. i wsp. Exploratory study on the correlation between 14 lung cancer-related gene expression and specific clinical characteristics of NDRP patients. *Mol. Clin. Oncol.* 2013; 1: 887–893.
 80. Lee M., Tseng R.C., Hsu H.S. i wsp. Epigenetic Inactivation of the Chromosomal Stability Control Genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 832–838.
 81. Carmen J., Marsit C.J., Liu M. i wsp. Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene* 2004; 23, 1000–1004.
 82. Olausson K.A., Dunant A., Fouret P. i wsp. DNA Repair by ERCC1 in Non-Small-Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 983–991.
 83. Hsu H., Wen C., Tang Y. i wsp. Promoter Hypermethylation is the predominant mechanism in hMLH1 and hMSH2 deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 5410–5416.
 84. Rosell R., Danenberg K.D., Alberola V. i wsp. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced nonsmall cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 1318–1325.
 85. Einhorn L.H., Bonomi P., Paul A. i wsp. Summary Report 7th Annual Targeted Therapies of the Treatment of Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2008; 3: 545–555.
 86. Dong X., Hao Y., Wei Y., Yin Q., Du J., Zhao X. Response to First-Line Chemotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer According to RRM1 Expression. *PLoS One* 2014; 9: e92320.
 87. Shao J., Zhou B., Chu B., Yen Y. Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design. *Curr. Cancer Drug Targets* 2006; 6: 409–431.
 88. Wang L., Zhang G., Chen J. i wsp. RRM1 gene expression in peripheral blood is predictive of shorter survival in Chinese patients with advanced non-small-cell lung cancer treated by gemcitabine and platinum. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2011; 12: 174–179.
 89. Carvalho L., Silva A., Andrade C. i wsp. ERCC1 and RRM1 genes in lung cancer. *Rev. Port. Pneumol.* 2009; 15: 683–696.
 90. Meyer K.N., Kjeldsen E., Straub T. i wsp. Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J. Cell Biol.* 1997; 136: 775–788.
 91. Jarvinen T.A., Liu E.T. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha — simultaneous drug targets in cancer. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2003; 6: 455–470.
 92. Lenart K., Szyda A., Kielbasiński M., Duś D., Podolak-Dawidziak M. Kliniczne skutki oporności. *Onkol. Prakt. Klin.* 2005; 1: 18–26.

93. Scagliotti G.V., Novello S., Selvaggi G. Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 1999; 10: S83–S86.
94. Krzakowski M., Ormowski T., Roszkowski K. i wsp. Drobnokomórkowy rak płuca. Zalecenia diagnostyczno-terapeutyczne Polskiej Grupy Raka Płuca. *Onkol. Prakt. Klin.* 2007; 3: 1–7.
95. Dingemans A.C., Van Ark-Otte J., Span S. i wsp. Topoisomerase II alpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 32: 117–128.
96. Erguden H.C., Koksall D., Demirag F. i wsp. The association of topoisomerase 2 α expression with prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer (NDRP) patients. *J. Thorac. Dis.* 2012; 4: 352–357.
97. Ceppi P., Longo M., Volante M. i wsp. excision repair cross complementing-1 and topoisomerase II alpha gene expression in small cell lung cancer treated with platinum and etoposide: a retrospective study. *J. Thorac. Oncol.* 2008; 3: 583–589.
98. Karachaliou N., Papadaki C., Lagoudaki E. i wsp. Predictive Value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPOI, TOPO-IIA, TOPOIIB and C-MYC Genes in Patients with Small Cell Lung Cancer (SCLC) Who Received First Line Therapy with Cisplatin and Etoposide. *PLoS One* 2013; 8: e74611.
99. Kasahara K., Fujiwara Y., Sugimoto Y. i wsp. Determinants of response to the DNA topoisomerase II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992; 84: 113–118.