

Artykuł ma na celu prezentację związku między wrażliwością na mutageny, niestabilnością chromosomową, a ryzykiem wystąpienia chorób nowotworowych. Przedstawione są możliwości i ograniczenia użyteczności nakierowanej na nowotwory, których etiologia wiąże się z ekspozycją na mutageny środowiskowe. Przedstawiono opis metodyczny testu bleomycynowego jako techniki stosowanej do oceny niestabilności chromosomowej. Ujęto także próby wprowadzenia dalszych modyfikacji mających na celu poszerzenie zakresu stosowalności testu bleomycynowego.

Słowa kluczowe: niestabilność chromosomowa, test bleomycynowy, wrażliwość na kancerogeny

The aim of the article is a presentation of an association between susceptibility to mutagens, chromosome instability and a risk of cancer incidence. This association is best pronounced in cancers induced by environmental carcinogens. The bleomycin test is described as a tool to study chromosome instability in relation to cancer. The recent attempts to extend an applicability of the test are also described.

Key words: chromosome instability, bleomycin test, carcinogen sensitivity

Zastosowanie testu bleomycynowego do określania predyspozycji genetycznej do zachorowania na nowotwory

Determination of genetic risk of cancer using the bleomycin test

Małgorzata Jarmuż, Krzysztof Szyfter

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

WSTĘP

Do rozwoju choroby nowotworowej przyczyniają się zarówno czynniki środowiskowe, jak również cechy osobnicze, a w tym predyspozycja genetyczna. Do dnia dzisiejszego poznano niewiele konstytyutywnych aberracji chromosomowych i samych genów odpowiedzialnych za powstanie określonych chorób nowotworowych. Dlatego też zwrócono uwagę na cechę ogólniejszą niż konkretne aberracje, a mianowicie na niestabilność chromosomową, która jest terminem określającym zwiększoną częstość złamań i innych uszkodzeń chromosomów w porównaniu z populacją kontrolną. Dotyczy to zarówno uszkodzeń spontanicznych, jak i indukowanych różnymi związkami chemicznymi, a także promieniowaniem jonizującym.

Już w latach 70. niestabilność chromosomową zauważono w niektórych zespołach chorobowych, takich jak: *ataxia teleangiectasia*, zespół Blooma, *xeroderma pigmentosum*, anemia Fanconiego. W tab. 1. podano przykłady zespołów, w których występuje niestabilność chromosomowa z uwzględnieniem nowotworów, najczęściej spotykanych w danym zespole [1]. W chorobach tych stwierdzono ponadto niedobory syntezy naprawczej DNA, co logicznie uzasadnia zwiększone ryzyko powstania nowotworów. Niestabilność chromosomową zauważono również, ale słabiej wyrażoną, u osób zdrowych, u których powstał nowotwór [2]. W tym wypadku mówi się o tzw. „ukrytej” niestabilności chromosomowej, ponieważ zwiększona liczba złamań jest wykrywana dopiero po podaniu związku indukującego uszkodzenia. Zaproponowano, że wiąże się to z odziedziczalnymi zmianami struktury chromatyny zwiększającymi jej podatność na uszkodzenia i, być może, utrudniającymi naprawę DNA [3]. Zdaniem Hsu niestabilność jest czynnikiem ułatwiającym powstawanie kolejnych mutacji, które mogą prowadzić do transformacji nowotworowej i dalej do rozwoju choroby nowotworowej u osób predysponowanych genetycznie [4].

W celu doświadczalnego określania poziomu niestabilności chromosomowej w laboratorium T. C. Hsu, Houston, Texas [4,5] opracowano i wprowadzono technikę, nazwaną później **testem bleomycynowym** od nazwy związku wybranego do indukowania uszkodzeń chromosomów. Istotą testu jest indukcja uszkodzeń chromosomów w warunkach hodowli *in vitro*. Do indukowania aberracji chromosomów wybrano bleomycynę (BLM). Związek ten, należący do glikopeptydów, ma bardzo rozbudowaną strukturę chemiczną z licznymi grupami aktywnymi. Struktura ta nadaje mu właściwości radiomimetyczne i cytostatyczne, a w szczególności zdolność reagowania z cząsteczką DNA. Zaproponowano dwa mechanizmy (tlenowy i beztlenowy) reagowania bleomycyny z DNA, w obu przypadkach nakierowane na pozycję C-4' deoksyrybozy [6]. Rezultatem tej reakcji jest generowanie jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA oraz powstawanie miejsc apurynowych/apirymidynowych. Dzięki tak rozbudowanej genotoksyczności wrażliwość na BLM jest traktowana jako wyznacznik szeroko rozumianej wrażliwości na mutageny.

Test bleomycynowy w wersji zaproponowanej przez Hsu i wsp. [4, 5] prowadzi się opierając na hodowli limfocytów krwi obwodowej ze względu na łatwość ich pozyskiwania przy jednoczesnym przyjęciu założenia, że zmiany genetyczne w limfocytach są reprezentatywne dla innych komórek somatycznych. BLM podaje się w późnej fazie S/G₂ cyklu komórkowego. W rezultacie uszkodzenia powodowane przez ten związek mogą zostać utrwalone podczas mitozy i ujawniają się pod postacią złamań chromatyd i innych aberracji chromosomów.

Test bleomycynowy jest testem ilościowym, w którym oznacza się dwie wartości. Podstawowym parametrem jest tzw. wskaźnik b/c (*breaks per cell*), oznaczający liczbę złamań chromatyd przypadającą na komórkę. Dodatkowo określa się udział pro-

Tab. 1. Przykłady chorób z niedoborem syntezy naprawczej DNA

Nazwa choroby	Skłonność do występowania nowotworów
Ataksja Teleangiektazja (AT) homozygoty AT heterozygoty AT	białaczki, chłoniaki rak piersi
Xeroderma Pigmentosum	nowotwory skóry
Anemia Fanconiego	białaczki
Zespół Blooma	białaczki, nowotwory przewodu pokarmowego
Retinoblastoma	siatkówczaki

centowy komórek z uszkodzeniami w całej puli ocenianych komórek. Dla uzyskania miarodajnego wyniku ocenia się 50-100 płytek metafazowych.

Normy dla wskaźnika b/c ustalone przez Hsu i wsp. [5, 7] po przebadaniu dużej grupy osób zdrowych oraz grupy chorych na nowotwory okrężnicy, płuc, głowy i szyi (tab. 2.) zostały przyjęte przez ogół badaczy.

Badania niestabilności chromosomowej za pomocą testu bleomycynowego w wersji zaproponowanej przez Hsu i wsp. [4, 5, 7] zostały podjęte przez wiele laboratoriów (także polskich) i przyniosły szereg ciekawych ustaleń, które zostaną przedstawione poniżej.

Wykazano, że wartości wskaźnika b/c nie są zależne od takich czynników jak wiek, płeć oraz palenie papierosów [7, 8]. Niezależność od wspomnianych czynników osobniczych i egzogennych pozwoliła na przyjęcie wskaźnika niestabilności jako cechy konstytutywnej. Pewne wątpliwości budzi mimo wszystko niezależność niestabilności chromosomowej od czynników egzogennych. Argumentów przeciwko tej tezie dostarczyły badania Michalskiej i wsp. [9] dotyczące niestabilności chromosomowej u osób zdrowych. Wykazano, że średnia wartość wskaźnika b/c malała w następującym szeregu: grupa osób ekspozowanych na mutageny w związku z wykonywaną pracą, grupa osób narażonych na mutageny wskutek wysokiego zanieczyszczenia środowiska (Górny Śląsk) i grupa osób wolnych od ekspozycji zawodowej i środowiskowej (rolnicy z płu.-wsch. Polski). Powyższe ustalenia wskazują na konieczność właściwego doboru grupy kontrolnej wobec grupy badanej.

Następnie postawiono pytanie, czy test bleomycynowy można stosować w ocenie predyspozycji do zachorowania na wszystkie

nowotwory. Odpowiedź daje porównanie niestabilności chromosomowej w różnych chorobach nowotworowych. W tab. 3. zestawiono wartości wskaźnika b/c uzyskanego w badaniach prowadzonych przez różne zespoły. Dla nowotworów głowy i szyi, płuc, okrężnicy, a także wątroby wartości wskaźnika są wyższe w porównaniu z grupami kontrolnymi. Natomiast dla nowotworów centralnego układu nerwowego wskaźnik jest nawet niższy od wskaźnika grupy kontrolnej. Wyniki te wskazują, że test bleomycynowy może być stosowany w ocenie niestabilności chromosomowej, a tym samym predyspozycji do zachorowania na nowotwór, tylko w tych nowotworach, które rozwijają się w tkankach narażonych na działanie kancerogenów środowiskowych. Odnotowano szczególną przydatność oceny wskaźnika b/c w rakach głowy i szyi, ze względu na wysokie poziomy niestabilności chromosomowej.

Pogłębienie badań nad niestabilnością chromosomową przyniosły kolejne ustalenia dotyczące szczególnych grup ryzyka.

Bondy i wsp. [17] wykazali, że pacjenci, którzy wykazują niestabilność chromosomową i są spokrewnieni w pierwszym stopniu z osobą, u której występuje nowotwór, mają ponad dwukrotnie podwyższone ryzyko zachorowania na nowotwór, a u pacjentów spokrewnionych w pierwszym stopniu z dwiema lub większą ilością osób z wykrytym nowotworem współczynnik ryzyka wzrasta 6,6-krotnie. Użyteczność testu bleomycynowego w rozpoznawaniu rodzinnego występowania zwiększonej predyspozycji do zachorowania na nowotwór została potwierdzona także przez innych autorów [18, 19].

Badania niestabilności chromosomowej w raku krtani przyniosły dalsze ciekawe ustalenia. Postulowany od dawna odrębny status genetyczny chorych na raka krtani poniżej 40. roku życia (rak krtani w tej grupie występuje bardzo rzadko) został potwierdzony w zakresie niestabilności chromosomowej. U młodych, dorosłych pacjentów stwierdzono znacząco podwyższone wartości współczynnika b/c w stosunku do grupy chorych po 40. roku życia [20].

Test bleomycynowy może być stosowany nie tylko do wykrywania osób najbardziej predysponowanych do zachorowania na określone nowotwory, lecz również do oceny skłonności do występowania Zespołu Mnogich Nowotworów Pierwotnych. Autorzy

[11] zastrzegają się jednak, że ustalenie to dotyczy tylko nowotworów powstających w tkankach bezpośrednio narażonych na działanie mutagenów.

Dąbrowski i wsp. [13] porównali wartości wskaźnika b/c u pacjentów z rakami krtani o różnym stopniu złośliwości histologicznej, stwierdzając nieznaczny wzrost wskaźnika b/c wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej guza. Niewykluczone zatem, że również złośliwość histologiczna guza jest determinowana przez poziom niestabilności chromosomowej.

Natomiast ustalenia na temat związku niestabilności chromosomowej z przebiegiem choroby nowotworowej nie są jednoznaczne. Wykazano brak związku między wzrostem guza i stadiami choroby, a wartością współczynnika b/c w płaskonabłonkowych rakach głowy i szyi [11]. Jednak wyższe wartości wskaźnika b/c zauważono u osób z nowotworem górnych dróg oddechowych, które rozwinęły drugie i trzecie nowe ognisko nowotworowe [21, 22]. U większości tych osób wartość wskaźnika b/c przekraczała 1 i była wyższa w porównaniu z osobami z jednym nowotworem. Na przykładzie raka górnych dróg oddechowych wskazano także na możliwość rozpoznania niepowodzeń leczenia operacyjnego uzupełnionego radioterapią i wystąpienia nawrotu choroby nowotworowej [23].

Test bleomycynowy pozwala także na identyfikację osób nadwrażliwych na promieniowanie jonizujące i chemioterapeutyki. Busch i wsp. [24] twierdzą, że w celu wykrycia takiej nadwrażliwości należy ocenić wartość wskaźnika b/c w komórkach zdrowych tkanek, co sugeruje nadwrażliwość na działanie promieniowania, a także w komórkach nowotworowych, co określałoby promieniowrażliwość nowotworu. Może to być użyteczne w określaniu tolerancji pacjentów z chorobą nowotworową na radioterapię i chemioterapię przed rozpoczęciem leczenia [25, 26].

Duże zainteresowanie testem bleomycynowym spowodowało podjęcie prób nad rozwinięciem metodycznym testu w kierunku zwiększenia potencjału badawczego, przy zachowaniu istoty testu, z równoczesną zmianą niektórych warunków doświadczenia. Do indukcji złamań chromosomów można wybrać taki związek, którego udział w etiologii nowotworów jest udokumentowany. W zespole M. Spitz zajęto się BPDE, który jest aktywną postacią benzo(a)pirenu, należącego do policyklicznych węglowodorów aromatycznych, występujących w dymie tytoniowym oraz otaczającym nas środowisku. BPDE uchodzi za kancerogen odpowiedzialny za powstawanie nowotworów górnych dróg oddechowych i płuc. Stwierdzono podwyższoną pod wpływem BPDE wartość wskaźnika b/c w grupie chorych na raka płuc i HNSCC w porównaniu z grupą kontrolną [27, 28].

Rozwinięcie metodycznego testu bleomycynowego stanowi także ocena wartości

Tab. 2. Skala wartości wskaźnika b/c w interpretacji Hsu i wsp. [5, 7]

Wartość b/c	Interpretacja
poniżej 0,8	stabilność chromosomowa
0,8 – 1,0	niestabilność chromosomowa
powyżej 1,0	podwyższona niestabilność chromosomowa

Tab. 3. Zestawienie wartości wskaźnika b/c w różnych nowotworach

Grupa	Liczebność	b/c±sd	Referencja
HNSCC	77	1,03±0,51	T.C. Hsu
rak płuc	71	0,98±0,41	i wsp. [5]
rak okrężnicy	83	1,00±0,41	
rak piersi	82	0,64±0,36	
kontrola	335	0,55±0,27	
nowotwory centralnego układu nerwowego	10	0,55±0,27	S.P. Schantz i T.C. Hsu [10]
kontrola	335	0,60±0,35	
HNSCC	50	0,96±0,31	J. Cloos
RUDT (MPT)	20	1,20±0,47	i wsp. [11]
kontrola	52	0,77±0,19	
HNSCC	37	1,22±0,50	T. Kręcicki
kontrola	23	0,79±0,30	i wsp. [12]
rak krtani	61	0,68±0,23	P. Dąbrowski
kontrola	30	0,37±0,15	i wsp. [13]
glejaki	44	0,72±0,45	M.L. Bondy
kontrola	45	0,45±0,35	i wsp. [14]
dziedziczne nowotwory okrężnicy	12	0,59±0,14	J. Kładny
kontrola	12	0,35±0,13	i wsp. [15]
sporadyczne nowotwory okrężnicy	14	0,43±0,14	
kontrola	14	0,42±0,15	
rak wątroby	28	0,92	X. Wu i wsp.
kontrola	110	0,55	[16]

HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) – nowotwory płaskonabłonkowe głowy i szyi,
 RUDT (*respiratory and upper digestive tract*) – układ oddechowy i górny odcinek przewodu pokarmowego,
 MPT (*multiple primary tumours*) – mnogie nowotwory pierwotne

wskaźnika b/c w tkankach innych niż limfocyty krwi obwodowej. Przykładowo, Cloos i wsp. [29] porównali uszkodzenia indukowane bleomycyną w limfocytach krwi obwodowej z uszkodzeniami w fibroblastach i keratynocytach jamy ustnej, tzn. w tkankach bezpośrednio narażonych na działanie kancerogenów. Stwierdzono korelację pomiędzy limfocytami a fibroblastami dla ilości uszkodzonych komórek, ale nie dla liczby złamań przypadających na komórkę. Natomiast keratynocyty okazały się być zbyt wrażliwe na działanie bleomycyny i indeks mitotyczny był zbyt niski by ocenić uszkodzenia chromosomów.

Następną możliwością rozszerzenia testu jest ustalenie, które chromosomy i w którym miejscu najczęściej ulegają uszkodzeniom, tzn. uzupełnienie analizy ilościowej analizą jakościową. W badaniach przeprowadzonych na dziesięcioosobowych grupach największą liczbę złamań w nowotworach głowy i szyi znaleziono w 3 i 7 chromosomie w regionach 3p21, 3q21, 7q22, a w czerniaku złośliwym w chromosomach 1, 6 i 9 w regionach 1p32, 1q32, 6p21, 6q21, 9q11 [30]. Analogiczne badania podjęte w naszym ze-

spole, również wskazują na nieprzypadkowy rozkład złamań chromosomów, ale nie pozwalają jeszcze na wskazanie miejsc uszkodzeń swoistych dla raka krtani [31].

W podsumowaniu należy stwierdzić, że test bleomycynowy pomaga wykryć osoby wykazujące predyspozycję do zachorowania na nowotwór. Jednakże użyteczność jest zawężona do nowotworów indukowanych ekspozycją na mutageny środowiskowe. Zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworu ustalone na podstawie testu bleomycynowego pozostaje wartością probabilistyczną i nie oznacza pewności zachorowania [2, 32]. Dla klinicystów jest to jednak wskazaniem do częstszych kontroli danych pacjentów. Po stronie praktycznej najbliższej użyteczności jest identyfikacja osób nadwrażliwych na promieniowanie, u których można oczekiwać negatywnego odczynu popromiennego.

PIŚMIENNICTWO

- Vogel F, Motulsky AG. *Human Genetics. Problems and approaches*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1982.
- Tzancheva M, Komitowski D. *Hum Genet* 1997; 99, 47-51.

- Pandita TK, Hittelman WN. *Int J Cancer* 1995; 61, 738-743.
- Hsu TC. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23 (9), 591-603.
- Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM i wsp. *Int J Cancer* 1989; 43 (3), 403-409.
- Povirk LF, Austin MJF. *Mutat Res* 1991; 257, 127-143.
- Spitz MR, Fueger JJ, Beddingfield NA, Annerggers JF, Hsu TC, Nevell GR, Schantz SP. *Cancer Res* 1989; 49, 4626-4628.
- Cloos J, Steen I, Joenje H i wsp. *Cancer Lett* 1993; 74, 161-165.
- Michalska J, Motykiewicz G, Kalinowska E, Chorąży M. *Mutat Res* 1998; 418, 43-48.
- Schantz SP, Hsu TC. *Head-Neck* 1989; 11 (4), 337-427.
- Cloos J, Braakhuis BJM, Steen I, Copper MP, de Vries N, Nauta JJP, Snow GB. *Int J Cancer* 1994; 56, 816-819.
- Kręcicki T, Schlade K, Blinn N, Szaśniadek M. *Onc Rep* 1997; 4, 1383-1385.
- Dąbrowski P, Kita S, Szyfter W, Szmaja Z, Jarmuż M, Szyfter K. *Otolaryng Pol* 1999; w druku.
- Bondy ML, Kyritsis AP, Gu J, de Andrade M, Cunningham J, Levin VA, Bruner JM, Wei Q. *Cancer Res* 1996; 56, 1484-1486.
- Kładny J, Zajączek S, Lubiński J. *J Appl Genet* 1996; 37 (4), 385-392.
- Wu X, Gu J, Patt Y, Hassan M, Spitz MR, Beasley RP, Hwang LY. *Cancer Epidem Biomark Prevent* 1998; 7, 567-570.
- Bondy ML, Spitz MR, Halabi S, Fueger JJ, Schantz SP, Sample D, Hsu TC. *Cancer Epidem Biomark Prevent* 1993; 2, 103-106.
- Liang JC, Pinkel DP, Bailey NM, Trujillo JM. *Cancer* 1989; 64, 1474-1479.
- Li AT, Wang TT, Yang RF, Luan XY, Wang MY. W: „*Head & Neck Cancer – Advances in Basic Research*”, Werner JA, Lippert BM i Rudert HH (red.) Elsevier Science BV, Amsterdam 1996, 3-8.
- Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, Moser RP. *JAMA* 1989; 262 (23), 3313-3315.
- Spitz MR, Hoque A, Trizna Z i wsp. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86 (22), 1681-1684.
- Miller DG, Tiwari R, Pathak S, Hopwood VL, Gilbert F, Hsu TC. *Cancer Epidem Biomark Prevent* 1998; 7, 321-327.
- Spitz MR, Lippman SM, Jiang H i wsp. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90, 243-245.
- Busch D. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30 (4), 997-1002.
- Markowska J, Czub M, Głuszak B. *Eur J Gynecol Oncol* 1994; 15: 372-374.
- Dąbrowski P. Praca doktorska, AM w Poznaniu, 1998.
- Wei Q, Gu J, Cheng L, Bondy ML, Jiang H, Hong WK, Spitz MR. *Cancer Res* 1996; 56, 3975-3979.
- Wang LE, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. *Clinical Cancer Res* 1998; 4, 1773-1778.
- Cloos J, Reid CBA, van der Sterre MLT, Tobi H, Leemans ChR, Snow GB, Braakhuis BJM. *Mutagenesis* 1999; 14, 87-93.
- Dave B, Hsu TC, Hong WK, Pathak S. *Int J Onc* 1994; 5, 733-740.
- Biegalska J, Biegalski W, Jeżewska A i wsp. Materiały: Poznański Kongres Studentów Medycyny 1999; 25-26.04.
- Cloos J, Reid CBA, Snow GB, Braakhuis BJM. *Eur J Cancer* 1996; 32B (6), 367-372.

ADRES DO KORESPONDENCJI

mgr Małgorzata Jarmuż
 Zakład Genetyki Człowieka PAN
 ul. Strzeszyńska 32
 60-497 Poznań