

Czy kinaza pirogronianowa może być markerem raka niedrobnokomórkowego płuca?

Is it possible for pyruvate kinase to be a non-small cell lung cancer marker?

ALEKSANDRA KAMIŃSKA^{B, C, D, F}, ADAM RZETCHONEK^{D, F, G}, JERZY KOŁODZIEJA^{A, G}

Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

A – przygotowanie projektu badania, B – zbieranie danych, C – analiza statystyczna, D – interpretacja danych, E – przygotowanie maszynopisu, F – opracowanie piśmiennictwa, G – pozyskanie funduszy

Streszczenie **Wstęp.** Nowotwory złośliwe płuca są najczęstszą przyczyną zachorowań i zgonów spośród wszystkich chorób nowotworowych. Dominującym typem nowotworu płuca jest rak niedrobnokomórkowy. Wczesne wykrycie choroby oraz leczenie jej w możliwie najniższym stopniu zaawansowania daje największe szanse na długoletnie przeżycie chorego. Wobec narastających wskaźników zapadalności na NDRP konieczne jest rozwijanie diagnostyki chorób nowotworowych, co pozwoli na wczesne wdrożenie leczenia.

Cel pracy. Ustalenie stopnia klinicznej przydatności diagnostycznej oznaczeń dimerycznej formy kinazy pirogronianowej w surowicy krwi osób chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca przy wykorzystaniu metody spektrofotometrycznej.

Materiał i metody. Uczestnikami badania byli pacjenci Dolnośląskiego Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu. W dwóch grupach badanych znaleźli się pacjenci ze zdiagnozowanym rakiem płuca – pierwszą stanowili chorzy na gruczolakoraka (*adenocarcinoma*), a drugą – na raka płaskonabłonkowego (*carcinoma planoepitheliale*). Grupę kontrolną stanowili pacjenci, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej. Materiałem badanym była surowica krwi, którą poddano pomiarowi aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej.

Wyniki. Analiza wykazała, że między grupami badanymi a grupą kontrolną występują znaczne różnice w aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej. Procentowy przyrost wartości aktywności był najwyższy w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego (134,5%), a następnie w grupie z rakiem gruczolakowym (132,1%). W grupie kontrolnej parametr ten osiągnął wartość 116%.

Wnioski. Pomiar aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej może być dodatkową metodą, obok badań obrazowych, pomocną w rozpoznawaniu raka niedrobnokomórkowego płuca. Charakteryzuje się stosunkowo dużą czułością i małą inwazyjnością.

Słowa kluczowe: rak niedrobnokomórkowy płuca, kinaza pirogronianowa, diagnostyka.

Summary **Background.** Lung cancer is the most common cause of morbidity and mortality among all cancers. The dominant type of lung cancer is non-small cell lung cancer. Early diagnosis, rapid and least possible invasive treatment gives the best chance to extend life expectancy. Considering increasing level of NSCLC morbidity it is extremely important to develop cancer diagnostics, which will allow to implement necessary treatment in early stages.

Objectives. The main focus of this paper is to establish level of usability for dimeric form of the pyruvate kinase in NSCLC patient plasma using spectrophotometric method.

Material and methods. Participants of the study were chosen from patients of the Lower Silesian Lung Disease Centre in Wrocław. Patients were allocated in to two study groups: first containing patients who were diagnosed with adenocarcinoma, second containing patients who were diagnosed with carcinoma planoepitheliale. The control group was chosen from patients who were not diagnosed with cancer. Material in question was plasma, tested on pyruvate kinase activity.

Results. Analysis showed a difference in pyruvate kinase activity between patients in study groups and test group. The highest increase in enzyme activity was found in group of patients diagnosed with carcinoma planoepitheliale (134.5%). In the group of patients diagnosed with adenocarcinoma enzyme activity increase reached 132.1% and in test group, 116%.

Conclusions. Testing enzyme activity of pyruvate kinase can be an additional helpful method in NSCLC diagnoses, besides diagnostic imaging. This method is characterised by high sensitivity and low invasiveness.

Key words: non-small cell lung cancer, pyruvate kinase, diagnostics.

Fam Med Prim Care Rev 2016; 18(2): 114–122

Wstęp

Nowotwory złośliwe płuca wnoszą corocznie do światowych statystyk zachorowań na choroby nowotworowe około 20% przypadków i powodują niemal 30% zgonów wywołanych nowotworami (ok. 1,5–1,6 mln) [1, 2]. Wśród nowotworów złośliwych płuca dominującym typem (ok. 80–85% przypadków) jest niedrobnokomórkowy rak płuca

(NDRP) [3, 4]. W Polsce od wielu lat utrzymuje się poziom ponad 20 tys. zachorowań na raka płuca i porównywalna (wzrastająca) liczba zgonów. W 2011 r. na raka płuca zachorowało 20 805 osób, a zmarło 22 216 osób [5].

Najbardziej skuteczną metodą terapeutyczną w NDRP jest radykalne leczenie operacyjne, szczególnie efektywne, gdy dotyczy guzów do 3 cm, otoczonych zdrowym mięszem płucnym i bez zajęcia węzłów chłonnych oraz przy



braku przerzutów [6]. Statystyki wskazują jednak, że w około 70% przypadków rak płuca rozpoznawany jest w stadiach IIIB lub IV, kiedy mocno ograniczone są możliwości interwencji terapeutycznej [7]. Relatywnie niskie są przeżycia 5-letnie chorych na NDRP. W grupach poddanych doświetlonej resekcji wynoszą 20–60%, w zależności od stadium choroby, a w grupie wszystkich chorych – 5–15% [8]. Większość chorych dyskwalifikuje z leczenia operacyjnego zbyt późne rozpoznanie choroby, będące wynikiem braku metodycznego poddawania się przez pacjentów okresowym ocenom stanu zdrowia, utrudnionego dostępu do specjalisty pulmonologa albo zwłoki w podjęciu właściwych badań i/lub ich długotrwałości [9, 10]. Utrudnienie w sprawnej diagnostyce raka płuca sprawiają też mało skuteczne narzędzia diagnostyczne. Podstawowe wciąż narzędzie przesiewowe w NDRP – badanie RTG – ma tę wadę, że często nie ujawnia nowotworu umiejscowionego w okolicach o ograniczonej dostępności (śródpierście, szczyt płuca) oraz nie pozwala na wiarygodną interpretację guzów małych [11]. Także dokonane w ostatnich dziesięcioleciach postępy w diagnostyce raka płuca (niskodawkowa TK, nowoczesne techniki bronchoskopowe) nie spowodowały istotnego przełomu w skutecznej walce z tą chorobą [7].

W ostatnich latach w literaturze medycznej ukazało się wiele obiecujących doniesień naukowych o przydatności w diagnozowaniu nowotworów różnych narządów przez liczne biomarkery nowotworowe – związki chemiczne (m.in.: białka, enzymy, hormony, glikoproteiny, antygeny) pochodzenia endogenne, które odzwierciedlają zwiększoną proliferację komórek nowotworowych oraz ich różnicowanie i obumieranie. Występują one w tkance nowotworu lub są przez nią wytwarzane (markery bezpośrednie), bądź są produkowane przez inne tkanki i narządy chorego jako odpowiedź na pojawienie się i wzrost nowotworu (markery pośrednie). Związki te są syntetyzowane i wydzielane do płynu pozakomórkowego głównie przez żywe komórki nowotworowe lub uwalniane z obumierających komórek guza, lecz także przez komórki prawidłowe [12]. Najogólniej podzielić je można na: a) krążące w krwi, b) wydalane z różnymi wydalaminami i c) występujące na powierzchni komórek nowotworowych [13]. Można je oznaczać za pomocą różnych metod (chemicznych, immunologicznych, biologii molekularnej). Warunkiem nadania danej substancji statusu markera jest stwierdzenie jej znacząco wyższego wytwarzania w nowotworze niż w komórce prawidłowej.

Jednym z biomarkerów badanym klinicznie w odniesieniu do wielu narządów jest dimeryczna forma kinazy pirogronianowej, określana jako Tumor M2-PK. Doniesienia z badań wskazują na skuteczność Tu M2-PK w diagnozowaniu raka jelita grubego (RJG). Przy czułości na poziomie 68,8–91% i swoistości rzędu 71,9–100% M2-PK stała się dobrym, nieinwazyjnym parametrem przesiewowym dla RJG [14]. Obiecujące parametry (czułość – 71%; swoistość – 68%) uzyskano przy zastosowaniu M2-PK w odniesieniu do raka trzustki, a także raka żołądka (czułość w przedziale 57–71%) [15]. Inne doniesienia wskazują na możliwość wykorzystania Tu M2-PK w diagnostyce nowotworów płuc, przewodu pokarmowego i nerek [14], choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelit [16]. Wzrost poziomu Tu M2-PK ma miejsce także przy wielu stanach zapalnych w organizmie [17, 18]. Jest więc markerem o wszechstronnym zastosowaniu, niespecyficznym.

Kinaza pirogronianowa (*pyruvate kinase* – PK) jest enzymem komórkowym, który występuje powszechnie w organizmach jedno- i wielokomórkowych i jest białkiem szczególnie istotnym w tkankach o wysokim obrocie energetycznym [19, 20]. PK jest enzymem z klasy transferaz, biorącym udział w szlaku glikolizy, katalizując przeniesienie grupy fosforanowej z fosfoenolpirogronianu (PEP) na ADP, w wyniku czego powstaje pirogronian i cząsteczka ATP [21].

W organizmie człowieka i innych ssaków występuje w czterech izoformach: M1, M2, R i L, które nieznacznie różnią się od siebie formami molekularnymi tego samego enzymu, odróżnialnymi metodą elektroforezy. Pełnią w organizmie tę samą funkcję, więc nie powodują widocznych zmian fenotypu. Za „prototypową” uważana jest izoforma kinazy pirogronianowej M2, gdyż jest typową dla tkanek płodowych, pojawiającą się w rozwoju ontogenetycznym jako pierwsza. Wraz z rozwojem organizmu izoforma M2 zastępowana jest przez inne, tkankowo specyficzne izoenzymy: w mięśniach szkieletowych, sercu i mózgu przez izoformę M1, w tkankach krwiotwórczych i erytrocytach – przez izoformę R, a w wątrobie – przez izoformę L [19, 22, 23].

We wszystkich zdrowych organach tkankowo swoiste izoformy PK występują w postaci złożonej z czterech podjednostek (tetramer). Nieaktywna forma, złożona z dwóch podjednostek (dimer), jest charakterystyczna dla guzów, a także innych, intensywnie proliferujących tkanek, np. przewlekłych stanów zapalnych [19, 25]. Ujawnienie obecności w organizmie dimerowej postaci kinazy (Tu M2-PK) stanowi więc sygnał o potencjalnych zmianach nowotworowych, przy czym zaznaczyć należy, że mają one miejsce tam, gdzie występuje przewaga izoformy dimerowej nad tetramerową [26, 27].

Specyficzny dla komórek nowotworowych jest o wiele wyższy, niż w przypadku komórek normalnych, poziom glikolizy i intensywniejszy rozkład glutaminy, a także redukcja glukoneogenezy [22] oraz poziom produkcji mleczanu, przy czym ma to miejsce nawet w warunkach dużej dostępności tlenu (tzw. efekt Warburga) [28]. M2-PK wydzielana jest przez komórki silnie proliferujące, także nowotworowe, w których zawsze dominuje [26, 27]. Współczesny stan wiedzy pozwala na uogólnienie, że większość nowotworów wykazuje zwiększoną ekspresję izoenzymu M2 oraz na to, że forma dimerowa – w przeciwieństwie do formy tetramerycznej – pozbawiona jest niemal całkowicie właściwości katalitycznych. Wiadomo też, że za dysocjację tetrameru do dimeru odpowiedzialne są onkoproteiny [24].

Cel pracy

Celem głównym pracy było ustalenie stopnia klinicznej przydatności oznaczeń dimerycznej formy kinazy pirogronianowej w surowicy krwi osób chorych na NDRP przy wykorzystaniu metody spektrofotometrycznej.

Cele szczegółowe obejmowały:

- 1) doświadczenie potwierdzenie podwyższonych parametrów dimerycznej formy kinazy pirogronianowej (Tu M2-PK) u osób chorych na NDRP pod wpływem aktywacji przez F-1,6-BP;
- 2) zbadanie poziomu czułości i swoistości narządowej M2-PK w NDRP na podstawie przeprowadzonych badań;
- 3) porównanie i zweryfikowanie uzyskanych wyników z doniesieniami o efektach dotychczasowych prób klinicznych z Tu M2-PK jako potencjalnym markerem NDRP;
- 4) porównanie uzyskanych w badaniu parametrów w odniesieniu do raka gruczołowego i płaskonabłonkowego;
- 5) dokonanie oceny zastosowanej metody badawczej;
- 6) wyciągnięcie wniosków dotyczących potencjalnej rekomendacji Tu M2-PK jako markera w diagnozowaniu NDRP.

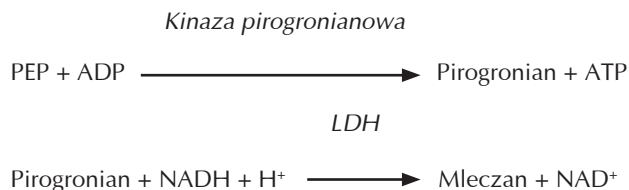
Materiał i metody

Uczestnicy badań rekrutowali się spośród pacjentów Dolnośląskiego Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu. Na

badanie uzyskano akceptację Komisji Bioetycznej, a pacjenci podpisali stosowną zgodę. W dwóch grupach badanych znaleźli się pacjenci ze zdiagnozowanym rakiem płuca. Pierwszą stanowili chorzy na gruczolakoraka (*adenocarcinoma*), a drugą – na raka płaskonabłonkowego (*carcinoma planoepitheliale*). Utworzono też grupę kontrolną, złożoną z osób, u których nie stwierdzono nowotworu. Dwanaścioro spośród nich przeżyło leczenie operacyjne z powodu łagodnego guza płuca (*hamartoma bronchiale*), u ośmiorga stwierdzono guz zapalny.

1. Grupa kontrolna liczyła 20 osób, w tym 10 kobiet i 10 mężczyzn w przedziale wieku 22–76 lat (średnia wieku – 48,3; mediana – 53,5).
2. Grupa badana (*adenocarcinoma*) – 27 osób, w tym: 7 kobiet i 20 mężczyzn, w przedziale wieku 42–83 lata (średnia wieku – 60,5; mediana – 66,0).
3. Grupa badana (*carcinoma planoepitheliale*) – 23 osoby, w tym: 10 kobiet i 13 mężczyzn, w przedziale wieku 54–83 lata (średnia wieku – 70,4; mediana – 72).

Od uczestników badań, którzy wzięli w nich udział na zasadzie dobrowolności, pobrano krew, z której odciągnięto i odwirowano surowicę. Oznaczone próbki surowicy po przygotowaniu mieszaniny reakcyjnej ($V = 800 \mu\text{l}$), zawierającej: 50 mM BTR; 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 10 mM MgCl_2 ; 0,17 NADH; 1,88 mM ADP; 0,5 mM PEP; 1U LDH i 150 μl surowicy, poddano pomiarowi aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej. Pomiar wykonano przy wykorzystaniu metody optycznej (spektrofotometr) z reakcją pomocniczą i wskaźnikową. W pomiarach próbek wykorzystano pomocniczy układ enzymatyczny w postaci sprzężonych ze sobą reakcji:



Szybkość utleniania NADH mierzono przy przyjętej dla tej reakcji długości fali świetlnej – 340 nm. Za jednostkę aktywności enzymu (1U) przyjęto ilość enzymu katalizującą przekształcenie 1 μmola substratu w ciągu 1 minuty, przy temperaturze 37°C, w środowisku $\text{pH} = 7,5$. Molowy współczynnik reakcji absorpcji dla NADH wynosił $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Wyniki uzyskanych badań poddano opracowaniu statystycznemu. Dla wszystkich grup zostały wyliczone wartości średnia (\bar{X}), mediana (M), kwartyle (25Q–75Q), zakres (min–max) i odchylenie standardowe (SD) badanych parametrów ciągłych. Weryfikację hipotezy o równości średnich parametrów w grupach przeprowadzono ze względu na małą liczbę przypadków (założono brak rozkładu normalnego) testem nieparametrycznym sumy rang Kruskala-Wallisa.

Dla parametrów dyskretnych częstość występowania cechy w grupach analizowano testem χ^2 z poprawką Yatesa.

Dla wybranych grup wyliczono: czułość i swoistość wybranych parametrów, wyniki prawdziwie dodatnie (PD), wyniki fałszywie ujemne (FU), wyniki prawdziwie ujemne (PU) oraz wyniki fałszywie dodatnie (FD).

$P \leq 0,05$ uznawano za znamienne statystycznie. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując komputerowy pakiet programów statystycznych EPIINFO Ver. 7.1.1.14 (z dnia 2.07.2013).

Wyniki

Surowice krwi pobrane od wszystkich uczestników badania poddano pomiarowi na stężenie Tu M2-PK (dane w tab. 1 i 2). Z analizy statystycznej wynika, że między badanymi grupami występują znaczne różnice w średniej aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej, przy czym najwyższe parametry średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego miały miejsce w odniesieniu do grupy kontrolnej. Parametry te w przypadku grup chorych (*adenocarcinoma* i *planoepitheliale*) nie odbiegały tak istotnie, choć były wyższe w przypadku chorych na raka gruczolowego (dane w tab. 3–5). Dla uzasadnienia tych wyników przyjęć można dwie hipotezy. Pierwsza opiera się na ustaleniach, że wysokie stężenie kinazy pirogronianowej jest charakterystyczne nie tylko dla nowotworów, czy trwającego procesu nowotworzenia, ale też dla wielu stanów zapalnych i chorób przewlekłych [17, 18]. Druga podnosi aspekt korelacji wieku i aktywności enzymatycznej, która z wiekiem maleje [30]. W omawianym przypadku zarówno średnie wieku, jak i mediana wieku były znacząco niższe w grupie kontrolnej. Jednak mimo niższej bezwzględnej wartości aktywności kinazy pirogronianowej u osób w podeszłym wieku wzrost aktywności enzymu po aktywacji pozostaje na podobnym poziomie. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej fruktozo-1,6-bisfosforanu (FBP) spowodowało znaczny wzrost aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej w próbach badanej surowicy krwi. Wzrost nastąpił we wszystkich grupach. Procentowy przyrost wartości aktywności enzymatycznej PK był najwyższy w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego (134,5%), a następnie w grupie z rakiem gruczolowym (132,1%). W grupie kontrolnej parametr ten osiągnął wartość 116%. Porównywalne były mediany w grupie chorych na raka gruczolowego i w grupie kontrolnej. Odchylenia standardowe w grupach chorych były znacząco wyższe niż w grupie kontrolnej (dane w tab. 3–5).

W zależności od stopnia zaawansowania nowotworu, niezależnie od typu histopatologicznego, najwyższą średnią aktywność zanotowano u chorych w stopniu III – 146,3%, natomiast aktywność w stopniu II i I nie różniły się znacząco, wynosząc odpowiednio: 127,3 i 126,6%. Wyniki badania aktywności kinazy pirogronianowej u poszczególnych pacjentów przedstawiają tabele 1 i 2.

Tabela 1. Wzrost aktywności kinazy pirogronianowej w surowicy pacjentów chorujących na raka niedrobnokomórkowego płuca

Lp.	Płeć	Wiek	Wzrost aktywności w %	Rozpoznanie histopatologiczne	TNM	Stopień zaawansowania
1.	M	55	128	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN0	IB
2.	M	81	134	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN1	IIA
3.	K	70	130	<i>adenocarcinoma</i>	T2bN1	IIB
4.	M	66	113	<i>adenocarcinoma</i>	T1bN1	IIA
5.	K	64	118	<i>ca planoepitheliale</i>	T1aN0	IA
6.	M	72	174	<i>ca planoepitheliale</i>	T2bN2	IIIA

Tabela 1. Wzrost aktywności kinazy pirogronianowej w surowicy pacjentów chorujących na raka niedrobnokomórkowego płuca

Lp.	Płeć	Wiek	Wzrost aktywności w %	Rozpoznanie histopatologiczne	TNM	Stopień zaawansowania
7.	M	78	149	<i>ca planoepitheliale</i>	T3N1	IIIA
8.	K	55	154	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN2	IIIA
9.	M	62	122	<i>ca planoepitheliale</i>	T2bN1	IIB
10.	M	68	176	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN2	IIIA
11.	M	42	104	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN1	IIA
12.	M	78	107	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN0	IB
13.	M	72	156	<i>adenocarcinoma</i>	T1bN2	IIIA
14.	K	71	143	<i>ca planoepitheliale</i>	T4N2	IIIB
15.	M	81	131	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN0	IB
16.	K	48	112	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN2	IIIA
17.	M	52	142	<i>adenocarcinoma</i>	T2bN1	IIB
18.	K	67	157	<i>ca planoepitheliale</i>	T2bN2	IIIA
19.	M	61	138	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN0	IA
20.	M	57	119	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN1	IIA
21.	M	58	137	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN1	IIA
22.	K	78	154	<i>ca planoepitheliale</i>	T3N1	IIIA
23.	M	83	106	<i>ca planoepitheliale</i>	T2bN2	IIIA
24.	M	80	132	<i>adenocarcinoma</i>	T2bN1	IIB
25.	K	78	129	<i>ca planoepitheliale</i>	T2bN1	IIB
26.	M	62	143	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN1	IIA
27.	M	79	168	<i>ca planoepitheliale</i>	T3N2	IIIA
28.	K	56	119	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN1	IIA
29.	K	59	161	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN1	IIA
30.	M	57	164	<i>ca planoepitheliale</i>	T2bN0	IIA
31.	M	66	132	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN0	IB
32.	M	59	115	<i>adenocarcinoma</i>	T1bN1	IIA
33.	K	70	123	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN0	IB
34.	M	58	136	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN1	IIA
35.	K	72	140	<i>ca planoepitheliale</i>	T1bN0	IA
36.	M	81	158	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN2	IIIA
37.	M	56	127	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN1	IIA
38.	K	60	135	<i>adenocarcinoma</i>	T1bN1	IIA
39.	M	68	117	<i>adenocarcinoma</i>	T1bN1	IIA
40.	M	78	122	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN0	IB
41.	K	80	125	<i>ca planoepitheliale</i>	T1bN1	IIA
42.	M	67	123	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN2	IIIA
43.	M	44	106	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN2	IIIA
44.	M	60	127	<i>ca planoepitheliale</i>	T2aN0	IB
45.	M	78	174	<i>adenocarcinoma</i>	T2bN2	IIIA
46.	K	54	106	<i>ca planoepitheliale</i>	T2bN0	IIA
47.	K	67	123	<i>adenocarcinoma</i>	T2aN1	IIA
48.	M	42	130	<i>adenocarcinoma</i>	T1bN2	IIIA
49.	K	56	108	<i>ca planoepitheliale</i>	T1bN1	IIA
50.	M	48	115	<i>adenocarcinoma</i>	T1aN1	IIA

Tabela 2. Wzrost aktywności kinazy pirogronianowej w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej

Lp.	Płeć	Wiek	Wzrost aktywności w %
1.	M	54	111
2.	K	60	130
3.	K	34	132
4.	M	72	124
5.	K	64	118
6.	M	76	131
7.	M	62	120
8.	K	58	108
9.	K	57	129
10.	K	53	127
11.	M	23	110
12.	K	34	103
13.	K	28	123
14.	M	45	104
15.	K	22	104
16.	M	38	105
17.	M	60	136
18.	M	67	104
19.	K	31	93
20.	M	28	108

Tabela 3. Parametry aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej w surowicy przed i po aktywacji fruktozo-1,6-bisfosforanem – zestawienie zbiorcze dla grupy kontrolnej

	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Wiek	20	48,3	53,5	22,0	76,0	32,5	61,0	17,2
$\Delta A/s$ - FBP	20	0,000656	0,000527	0,000238	0,001238	0,000410	0,000926	0,000308
U/ml - FBP	20	0,0339	0,0283	0,01220	0,0637	0,0211	0,0476	0,01579
$\Delta A/s$ + FBP	20	0,000729	0,000629	0,000300	0,001456	0,000475	0,000958	0,000315
U/ml - FBP	20	0,0383	0,0330	0,01580	0,0763	0,0249	0,0503	0,01654
Wzrost aktywności w %	20	116,0	114,5	93,0	136,0	104,5	128,0	12,4
PŁEĆ K/M	20	10/10						

Tabela 4. Parametry aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej w surowicy przed i po aktywacji fruktozo-1,6-bisfosforanem – zestawienie zbiorcze dla grupy pacjentów z adenocarcinoma

	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Wiek	27	60,5	66,0	42,0	83,0	57,0	78,0	11,3
$\Delta A/s$ - FBP	27	0,000489	0,000523	0,000217	0,000734	0,000342	0,000623	0,000154
U/ml - FBP	27	0,0251	0,0269	0,0111	0,0377	0,0176	0,0320	0,00794
$\Delta A/s$ + FBP	27	0,000629	0,000649	0,000266	0,000986	0,000454	0,000783	0,000207
U/ml - FBP	27	0,0330	0,0341	0,0140	0,0526	0,0239	0,0411	0,01093
Wzrost aktywności w %	27	132,1	130,0	104,0	176,0	117,0	142,0	19,1
Płeć K/M	27	7/20						

Tabela 5. Parametry aktywności enzymatycznej kinazy pirogronianowej w surowicy przed i po aktywacji fruktozo-1,6-bisfosfonianem – zestawienie zbiorcze dla grupy pacjentów z *carcinoma planoepitheliale*

	N	X	M	Minimum	Maksimum	25Q	75Q	SD
Wiek	23	70,4	72,0	54,0	83,0	62,0	78,0	9,5
ΔA/s - FBP	23	0,000401	0,000369	0,000223	0,000672	0,000299	0,000477	0,000135
U/ml - FBP	23	0,0203	0,0190	0,0115	0,0346	0,0154	0,0240	0,00663
ΔA/s + FBP	23	0,000525	0,000506	0,000310	0,001034	0,000365	0,000616	0,000190
U/ml - FBP	23	0,0275	0,0265	0,0163	0,0543	0,0192	0,0323	0,01000
Wzrost aktywności w %	23	134,5	129,0	106,0	174,0	122,0	154,0	20,6
Płeć K/M	23	10/13						

Tabela 6. Wzrost aktywności kinazy pirogronianowej u chorych z *adenocarcinoma*

Próg	ADENO N = 27		Kontrola N = 20		p	Czułość [%]	Swoistość [%]	Czułość + swoistość [%]
	PD	FU	FD	PU				
	z n ≥ progu	N	N	N				
			z ≥ progu	z < progu				
117	21	6	10	10	0,0938	77,80	50,00	127,80
118	20	7	10	10	0,164	74,10	50,00	124,10
119	20	7	9	11	0,06	74,10	55,00	129,10
120	18	9	9	11	0,235	66,70	55,00	121,70
121	18	9	8	12	0,128	66,70	60,00	126,70
122	18	9	8	12	0,128	66,70	60,00	126,70
123	18	9	8	12	0,128	66,70	60,00	126,70
124	16	11	7	13	0,177	59,30	65,00	124,30
125	16	11	6	14	0,0907	59,30	70,00	129,30
126	16	11	6	14	0,0907	59,30	70,00	129,30
127	16	11	6	14	0,0907	59,30	70,00	129,30
128	15	12	5	15	0,0724	55,60	75,00	130,60
129	15	12	5	15	0,0724	55,60	75,00	130,60
130	15	12	3	17	0,0116	55,60	85,00	140,60
131	13	14	3	17	0,0394	48,10	85,00	133,10
132	12	15	2	18	0,0257	44,40	90,00	134,40
133	11	16	1	19	0,0147	40,70	95,00	135,70
134	11	16	1	19	0,0147	40,70	95,00	135,70
135	11	16	1	19	0,0147	40,70	95,00	135,70

Tabela 7. Wzrost aktywności kinazy pirogronianowej u chorych z *carcinoma planoepitheliale*

Próg	PLANO N = 23		Kontrola N = 20		p	Czułość [%]	Swoistość [%]	Czułość + swoistość [%]
	PD	FU	FD	PU				
	n ≥ progu	n < progu	z ≥ progu	z < progu				
117	19	4	10	10	0,0512	82,60	50,00	132,60
118	19	4	10	10	0,0512	82,60	50,00	132,60
119	18	5	9	11	0,0531	78,30	55,00	133,30
120	18	5	9	11	0,0531	78,30	55,00	133,30
121	18	5	8	12	0,0245	78,30	60,00	138,30

Tabela 7. Wzrost aktywności kinazy pirogronianowej u chorych z *carcinoma planoepitheliale*

	PLANO N = 23		Kontrola N = 20		p	Czułość [%]	Swoistość [%]	Czułość + swoistość [%]
	PD	FU	FD	PU				
	N	N	N	N				
	n ≥ progu	n < progu	z ≥ progu	z < progu				
122	18	5	8	12	0,0245	78,30	60,00	138,30
123	16	7	8	12	0,101	69,60	60,00	129,60
124	15	8	7	13	0,0946	65,20	65,00	130,20
125	15	8	6	14	0,0457	65,20	70,00	135,20
126	14	9	6	14	0,0858	60,90	70,00	130,90
127	14	9	6	14	0,0858	60,90	70,00	130,90
128	13	10	5	15	0,0751	56,50	75,00	131,50
129	12	11	5	15	0,132	52,20	75,00	127,20
130	11	12	3	17	0,0494	47,80	85,00	132,80
131	11	12	3	17	0,0494	47,80	85,00	132,80
132	11	12	2	18	0,0182	47,80	90,00	137,80
133	10	13	1	19	0,0113	43,50	95,00	138,50
134	10	13	1	19	0,0113	43,50	95,00	138,50
135	9	14	1	19	0,0112	39,10	95,00	134,10

Dyskusja

Pomimo dokonujących się stałych postępów w medycynie, wczesne i trafne rozpoznanie NDRP definiowane jest jako najważniejszy środek w walce z tą chorobą. Wyleczenie w całej populacji chorych na raka płuca uzyskuje się tylko u około 15% chorych, a wśród pacjentów leczonych operacyjnie – już u około 35% chorych [31]. Stanowi to najlepszą rekomendację dla chirurgicznego leczenia NDRP. Aktualnie stosowaną, skuteczną metodą skrininową w raku płuca jest niskodawkowa tomografia komputerowa. Jej stosowanie jest jednak ograniczone przez wysokie koszty [32]. Jednocześnie rozpoczęcie ukierunkowanej diagnostyki następuje na ogół w okresie od 4,5 do 8 miesięcy od momentu pojawienia się pierwszych objawów raka płuca [10], co istotnie zmniejsza szanse na zastosowanie radykalnego zabiegu operacyjnego. Przytoczone dane dowodzą, że kluczowe znaczenie w leczeniu NDRP ma wczesne rozpoznanie choroby, które zwielokrotnia szanse wdrożenia leczenia operacyjnego – metody o najwyższej skuteczności spośród obecnie znanych i dostępnych.

Dla sprawnej diagnostyki raka płuca niezbędne są metody diagnostyczne, które pozwalałyby na prowadzenie efektywnych badań przesiewowych, szczególnie w grupach wysokiego ryzyka [7]. Dominujące w badaniach diagnozujących raka płuca – RTG klatki piersiowej i badanie cytologiczne płwociny – z uwagi na diagnostyczną niedoskonałość, nie są w stanie wychwycić pełnej populacji chorych, a tym bardziej w sposób jednoznaczny ocenić postaci histologicznej raka płuca oraz potencjalnej rozległości jego rozsiewu. Słabością standardowego wciąż instrumentarium diagnostycznego (wywiad lekarski, badania dodatkowe), służącego ujawnialności raka płuca, jest angażowanie w ten proces lekarzy kilku specjalności. Jest to czasochłonne, co przy specyfice NDRP ma zasadnicze znaczenie dla skutecznego procesu leczenia, a ponadto generuje wysokie koszty badań.

Poszukiwania idealnego markera diagnozującego raka płuca było i jest przedmiotem licznych badań klinicznych. Idealny marker powinien odzwierciedlać proces chorobowy lub wynik leczenia, cechować się wysoką wiarygodnością

diagnostyczną (odpowiednia czułość i swoistość oznaczenia), powtarzalnością wyników i możliwością zastosowania w różnych stadiach rozwoju choroby, charakteryzowaną istotną z klinicznego punktu widzenia cechą badanej tkanki (rozrost nowotworowy, stopień zaawansowania guza, wrażliwość lub oporność na leczenie), nie wymagać inwazyjnych procedur pobierania materiału biologicznego oraz wysokich kosztów wykonania oznaczeń [33–36]. W przypadku diagnostyki raka płuca istotna wydaje się także redukcja liczby zabiegów inwazyjnych o charakterze zwiadowczym.

W literaturze fachowej niewiele jest wzmianek o próbach zastosowania Tu M2-PK jako potencjalnego markera raka płuca. W dotychczasowych badaniach (w osoczu) uzyskano parametr czułości Tu M2-PK dla raka płuca w przedziale 50–71%, zaznaczając, iż wyższe parametry dotyczą gruczolakoraka [17, 18]. Jednocześnie w dotychczasowych publikacjach nie znaleziono informacji podnoszących wykorzystanie metody aktywacji kinazy pirogronianowej przez F-1,6-BP do celów diagnostyki nowotworów płuc.

Przeprowadzone w Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu badania nad przydatnością Tu M2-PK w diagnostyce NDRP miały wykazać, czy – i w jakim stopniu – dimerowa forma PK odzwierciedla metaboliczny stan guzów oraz jaka jest czułość i swoistość tego markera w odniesieniu do histologicznych typów NDRP – raka płaskonabłonkowego płuca oraz gruczolakoraka. Zastosowano metodę polegającą na badaniu aktywności enzymatycznej PK w surowicy krwi przed i po aktywacji fruktozo-1,6-bisfosforanem (F-1,6-BP). Wykorzystano w tym przypadku fakt, że izoforma M2-PK jest allosterycznie regulowana przez F-1,6-BP (na drodze pozytywnego sprzężenia zwrotnego *feed-forward*), natomiast M1 nie ulega aktywacji allosterycznej [36]. Ponieważ w surowicy osób chorych na nowotwór płuc dominuje nieaktywna/mało aktywna M2-PK w formie dimeru, to kinetyka reakcji po dodaniu aktywatora allosterycznego przebiega inaczej niż u osób zdrowych (gdzie występuje przewaga tetramery, który jest dodatkowo allosterycznie aktywowany). Aby wykryć obecność Tu M2-PK wykorzystano więc różnicę w pomiarach podstawowej aktywności PK i po aktywacji izoform PK pod wpływem allesteryczne-

go aktywatora – fruktozo-1,6-bisfosfonianu. FBP spowodował wyraźny wzrost aktywności Tu M2-PK, co uwidaczniają odnotowane w tabelach 1–3 wzrosty procentowe. Przyrosty aktywności odnotowano dla każdej próbki. Ustalona granica (poziom przyrostu) pozwoliła na zbiorcze obliczenie wyników prawdziwie dodatnich (PD), prawdziwie ujemnych (PU), fałszywie dodatnich (FD) i fałszywie ujemnych (FU), które stanowiły podstawę do wyliczenia czułości i swoistości dla badanych grup.

Z przedstawionych obliczeń wynika, że w przypadku badania aktywności Tu M2-PK w surowicy pacjentów chorujących na raka niedrobnokomórkowego płuca niemożliwe jest uzyskanie jednocześnie wysokiej czułości i swoistości. Najwyższy jednoczesny poziom czułości i swoistości uzyskano przy wzroście aktywności kinazy pirogronianowej na poziomie 133%, zarówno dla chorych z *adenocarcinoma*, jak i *carcinoma planoepitheliale*. Charakteryzuje się on również wysoką swoistością (95%). Poziom taki przyjęto jako znamienne w przypadku wykorzystania enzymu jako markera.

Ograniczenia badania

Istotną niedoskonałością pracy był dobór osób w obu grupach badanych. W grupie badanej znajdowali się chorzy cierpiący na raka płuca, w grupie kontrolnej – pacjen-

ci z łagodnymi guzami płuca (odpryskowiakami) oraz chorzy na zapalenia układu oddechowego o lekkim przebiegu. Z uwagi na fakt, że statystycznie częściej na nowotwory złośliwe płuc chorują osoby starsze, trudno było dobrać grupę kontrolną z pacjentów bez choroby nowotworowej w podobnym przedziale wiekowym, a nieobciążonych innymi poważnymi schorzeniami.

Wnioski

1. U chorych na NDRP stwierdzono istotny wzrost wartości PK w porównaniu z grupą kontrolną, przy czym najwyższy średni przyrost odnotowano w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego.
2. Jako próg wartości wzrostu aktywności kinazy pirogronianowej, powyżej którego czułość i swoistość badania jest dostatecznie wysoka, wyznaczono poziom 133%.
3. Walorem zastosowanej metody jest relatywnie wysoka skuteczność diagnostyczna oraz bezinwazyjność.
4. Uzyskane wyniki nie wyczerpują wprawdzie wymagań stawianych przed idealnym markerem, niemniej wskazują na jego przydatność jako narzędzia wspomagającego diagnozy raka płuca.

Źródło finansowania: Praca sfinansowana z grantu PBMN 96.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Zahir ST, Mirtalebi M. Survival of patients with lung cancer, Yazd, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(9): 4387–4391.
2. Wojciechowska U, Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2012 roku. *J Oncol* 2013; 63(3): 197–218.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(4): 225–249.
4. Jassem J. *Nowotwory płuca i opłucnej*. W: Szczeklik A, red. *Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na rok 2011*. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2011.
5. Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2011 roku*. Warszawa: Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie; 2013.
6. Pasic A, Postmus PE, Sutedia TG. What is early lung cancer? A review of the literature. *Lung Cancer* 2004; 45(3): 267–277.
7. Chorostowska-Wynimko J, Skroński M, Szepechciński A. Markery molekularne we wczesnej diagnostyce raka płuca – fakty i nadzieje. *Onkol Inфо* 2011; 8(3): 152–159.
8. Milanowski J, Szmygin-Milanowska K. Leczenie zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca – w którym miejscu jesteśmy? *Pneumon Alergol Pol* 2013; 81(1): 55–60.
9. Prystupa B. Spojrzenie pulmonologa na wczesne objawy i diagnostykę raka płuc. *Med Rodz* 2000; 3(3–4): 21–22.
10. Romatowska-Dziób H, Kiss B. Rola lekarzy rodzinnych we wczesnej diagnostyce nowotworów płuc. *Prz Lek* 2005; 8: 70–74.
11. Kowalewski J. Guzek subcentymetrowy płuca – problemy diagnostyczne i lecznicze. *Pol Merkuriusz Lek* 2008; XXV(148): 368–375.
12. Szutowicz A, Bielarczyk H. *Laboratoryjne wskaźniki chorób nowotworowych*. W: Szutowicz A, Raszeja-Specht A, red. *Diagnostyka laboratoryjna*. T. II. Gdańsk: Gdański Uniwersytet Medyczny; 2011.
13. Paduch R, Klatka J. Markery nowotworowe. *Onkol Pol* 2003; 6(2): 77–80.
14. Hardt PD, Ewald N. Tumor M2 Pyruvate Kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8(5): 579–585.
15. Schulze G. The tumor marker tumor M2-PK: an application in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20(6D): 4961–4964.
16. Szachta P, Roszak D, Gałęcka M, i wsp. Nieinwazyjne markery zapalne w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Gastroenterol Pol* 2009; 16(5): 399–401.
17. Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Adv Clin Chem* 2006; 42: 1–41.
18. Sung H-J, Cho J-Y. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB Reports* 2008; 41(9): 615–625.
19. Cichy W, Gałęcka M, Szachta P, i wsp. Kinaza pirogronianowa guza – marker nowotworowy i parametr aktywności nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Gastroenterol Pol* 2009; 16(5): 377–380.
20. Borkowska A, Liberek A, Plata-Nazar K, i wsp. Przydatność diagnostyczna oznaczania w stolcu parametrów stanu zapalnego u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit. *Med Wieku Rozw* 2010; 14(1): 37–41.
21. Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(24): 18145–18152.
22. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, et al. Pyruvate Kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(4): 300–308.
23. Tonus C, Neupert G, Witzel K. Badania przesiewowe na obecność kinazy pirogronianowej M2 w stolcu u chorych z inwazyjnym i przedinwazyjnym rakiem jelita grubego: szacunkowa swoistość metody oraz wyniki uzyskane w grupie 4854 ochotników, przedstawione w funkcji wieku. *Nowotwory* 2009; 59(2): 75–81.

24. Bretes E, Szachta P, Roszak D, i wsp. Kinaza pirogronianowa – nowy marker procesu nowotworzenia. *Pediatr Współcz Gastroenterol Hepatol Żywnie Dziecka* 2010; 12(3): 129–133.
25. Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, et al. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr* 2002; 87(Suppl. 1): S23–S29.
26. Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, et al. *Double role of pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells*. In: Perucho M, eds. *Critical reviews in oncogenesis*. Boca Raton: CRC Press; 1992: 91–115.
27. Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism and tumor therapy. *J Bioenerg Biomembr* 1997; 29(4): 315–330.
28. Ferguson EC, Rathmel JC. New roles for pyruvate kinase M2: working out the Warburg effect. *Trends Biochem Sci* 2008; 33(8): 359–362.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(7): 248–254.
30. Lentner C. Geigy scientific tables, physical chemistry, composition of the blood, hematology. *Somatotropic Data* 1984; 3: 184.
31. Rzyman W. Rak płuc. *Forum Med Rodz* 2008; 11(6): 407–419.
32. Nahorecki A, Chabowski M, Kuźniar T, et al. Low-dose computer tomography as a screening tool for lung cancer in a high risk population. *Adv Exp Med Biol* 2015; 852: 31–37.
33. Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, et al. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J* 2003; 39(Suppl.): 36–44.
34. Soborczyk A, Deptuła A. Markery nowotworowe w praktyce klinicznej. *Chor Serca Naczyń* 2007; 4(4): 184–189.
35. Pietrowska M. Markery nowotworowe badane metodami proteomiki w osoczu i surowicy krwi. *Biotechnologia* 2009; 85(2): 39–53.
36. Batura-Gabryel H. Biomarkery w POChP – czy są nam potrzebne? *Pneumon Alergol Pol* 2011; 79(2): 144–150.
37. Noguchi T, Yamada K, Inoue H, et al. The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J Biol Chem* 1987; 143(2): 431–438.

Adres do korespondencji:

Lek. Aleksandra Kamińska
Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej UM
ul. Grabiszyńska 105
53-439 Wrocław
Tel.: 604 945-864
E-mail: alekia@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 25.03.2015 r.

Po recenzji: 14.06.2015 r.

Zaakceptowano do druku: 02.07.2015 r.