

NOWOCZESNE TECHNIKI W DIAGNOSTYCE I LECZENIU CHORÓB ONKOLOGICZNYCH

REDAKCJA
JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe



Nowoczesne techniki w diagnostyce i leczeniu chorób onkologicznych

Redakcja

Jakub Kufel

Piotr Lewandowski

NOWOCZESNE TECHNIKI W DIAGNOSTYCE I LECZENIU CHORÓB ONKOLOGICZNYCH

REDAKCJA
JAKUB KUFEL
PIOTR LEWANDOWSKI

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

Redakcja

Jakub Kufel, Piotr Lewandowski

Opieka naukowa

dr hab. n. med. Zbigniew Nawrat, prof. IPS

Recenzenci

dr n. med. Krzysztof Nitecki

lek. Michał Adamczyk

lek. Sugarmaa Baasansuren

lek. Dominika Kondoł

lek. Jakub Kufel

mgr Kamila Kuśpiel

Korekta redaktorska

Karol Łukomiak

Diana Łukomiak

Skład i projekt okładki

Karol Łukomiak

© Copyright by Authors & ArchaeGraph

ISBN: 978-83-67527-75-0

Wersja elektroniczna dostępna na stronie internetowej wydawcy:
www.archaeograph.pl

ARCHAEGRAPH
Wydawnictwo Naukowe

Łódź, czerwiec 2023

SPIS TREŚCI

Przedmowa	8
Immunoterapia CAR-T cells – podstawowy mechanizm działania i wykorzystanie w leczeniu nowotworów	10
Jakub Kołodziej, Aleksandra Skowronek, Zofia Graca, Martyna Żurek, Łukasz Czogalik, Karolina Zięba	
Terapia CAR-T – ewolucja, budowa oraz inżynieria komórek	27
Lidia Ziętek, Michał Janik, Robert Kasza	
Mechanizm działania terapii CAR-T oraz jej zastosowanie w leczeniu nowotworów hematologicznych	43
Lidia Ziętek, Robert Kasza, Michał Janik, Jakub Staniszewski, Maciej Kozlik	
Terapia CAR-T w leczeniu guzów litych – zastosowanie i ograniczenia	58
Lidia Ziętek, Robert Kasza, Michał Janik, Jakub Kufel	
Immunoterapia - przyszłość leczenia raka jajnika. Uwzględnienie biopsji płynnej jako innowacyjnego podejścia do diagnostyki	76
Julia Konieczny, Zuzanna Kolanko, Natalia Krauzowicz, Paweł Krupa, Aleksandra Kotapka, Martyna Kulwicka	
Enfortumab vedotin jako nowa opcja terapeutyczna u pacjentów z przerzutowym rakiem urotelialnym	109
Jakub Ciesielka, Zuzanna Witkowska, Karolina Handzel, Antoni Anczyk, Jacek Wysoczański, Radosław Dutczak	

Trastuzumab derukstekan – przełom w leczeniu raka piersi 121

Jacek Wysoczański, Radosław Dutczak, Jakub Ciesielka,
Zuzanna Witkowska, Karolina Handzel, Antoni Anczyk

**Larotrekty nib – innowacyjny lek dla pacjentów
onkologicznych z guzami litymi z fuzją genów NTRK** 132

Aleksander Kubiak, Patryk Kubiak, Izabela Bywalec,
Konrad Kulka, Wiktoria Król, Donata Kowalczyk

**Pluvicto – nowy radioligand
stosowany w leczeniu raka prostaty** 143

Izabela Bywalec, Donata Kowalczyk, Patryk Kubiak,
Wiktoria Król, Konrad Kulka, Aleksander Kubiak

**Wiroterapia onkolityczna wirusem odry –
nowoczesna metoda leczenia nowotworów** 158

Dominika Kaczyńska, Adam Mitreğa, Aleksandra Woćław,
Piotr Dudek, Michał Bielówka, Błażej Pilarski

**Krioablacja – aktualne zastosowanie
i jej przyszłość w leczeniu nowotworów** 175

Aleksandra Skowronek, Jakub Kołodziej, Martyna Źurek,
Zofia Graca, Łukasz Czogalik, Joanna Jureczko

**Ferroptoza w terapii glejaka wielopostaciowego –
wykorzystanie nanocząsteczek tlenku żelaza** 188

Karolina Zięba, Justyna Zientek, Zuzanna Złotnicka,
Jakub Kołodziej, Marlena Grzybek, Joanna Jureczko

**Nowe technologie w badaniach przesiewowych
w kierunku raka piersi** 203

Karolina Grodkowska, Paulina Jaruga, Vanessa Gąsiorowska,
Marcin Jezierzański, Oskar Fogiel, Michał Tutaj

**Rak tarczycy - przegląd aktualnych standardów
oraz rola imprintingu genomowego w diagnostyce** 219

Szymon Mikler, Kamila Meca,
Łukasz Czogalik, Oliwia Pluta, Jakub Słota

**Mikrogravitacja jako możliwość terapii
chorób nowotworowych na przykładzie raka płuca**.....235

Paweł Krupa, Natalia Krauzowicz, Zuzanna Kolanko,
Julia Konieczny, Kinga Krzywonos, Kinga Krasoń

**Potencjalne wykorzystanie bakterii jelitowych
w diagnostyce raka jelita grubego**.....255

Natalia Przytocka

**Sylimaryna w leczeniu i zapobieganiu
raka wątrobowokomórkowego**.....270

Wojciech Dobczyński, Eliza Barczyk, Joanna Bączyk,
Katarzyna Grudnik, Anna Krakowczyk, Dariusz Kucias

Szanowni Czytelnicy

Prezentujemy Państwu drugą z serii monografii z cyklu “Nowoczesne techniki w diagnostyce i leczeniu”. Ta książka poświęcona jest chorobom onkologicznym.

Zwiększająca się długość życia, a także postępująca chemizacja środowiska sprzyjają procesom kancerogenezy. W kolejnych dekadach choroby nowotworowe stanowiąc będą coraz większe wyzwania, dlatego też niezbędne są odkrycia dotyczące z jednej strony możliwości wczesnej diagnostyki oraz z drugiej skutecznego leczenia.

Książkę rozpoczyna seria rozdziałów dotyczącymi przełomu w obecnej onkologii – terapii CAR-T. Przedstawione obszernie omówienie technologii powinno przybliżyć Państwu jej mechanizmy działania oraz potencjalne zastosowania.

W kolejnej części pochylamy się tematyce nowych leków onkologicznych: immunoterapii, leków skoniugowanych czy inhibitorów kinaz tyrozynowych. Nie zabraknie również rozdziałów dotyczących zastosowania radiofarmaceutyków, krioablacji, nanocząstek czy wirusów onkolitycznych.

W dalszej części przyjrzymy się nowym metodom diagnostyki raka piersi oraz raka tarczycy. Należy pamiętać, że to właśnie wczesna diagnostyka, jest kluczowa dla możliwości skutecznego leczenia.

Na koniec omówimy rolę środowiska w onkologii. Przyjrzymy się możliwości zastosowania mikrograwitacji w leczeniu raka płuca, wykorzystania bakterii jelitowych w diagnostyce raka jelita grubego czy zastosowaniu nutraceutyków w modyfikowaniu ryzyka i leczenia raka wątrobowokomórkowego.

Mamy nadzieję, że niniejsza publikacja dostarczy Państwu wartościowych informacji i zachęci do dalszego zgłębiania tematów związanych z medycyną. Życzymy Państwu przyjemnej lektury i odkrywania fascynującego świata nauki medycznej.

Redaktorzy naukowci

Jakub Kufel
Piotr Lewandowski

Immunoterapia CAR-T cells – podstawowy mechanizm działania i wykorzystanie w leczeniu nowotworów

Jakub Kołodziej, Aleksandra Skowronek, Zofia Graca,
Martyna Żurek, Łukasz Czogalik, Karolina Zięba

Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Terapię CAR-T cells (*ang. Chimeric Antigen Receptors T cells Therapy*) nazywamy autogeniczny przeszczep z genetycznie zmodyfikowanych limfocytów T pacjenta. Pierwsze wzmianki dotyczące transgenicznych komórek T sięgają lat 80. XX wieku. Wspólną cechą wszystkich zmodyfikowanych komórek tej metody jest obecność w nich chimerycznego receptora antygenowego (CAR). Na przestrzeni ostatnich lat, aż do dnia dzisiejszego, zmianie ulegała budowa a co za tym idzie i mechanizm działania, a także pełnione funkcje omawianych receptorów CAR. Wykazany wpływ terapeutyczny u pacjentów z nowotworami hematologicznymi stał się podstawą do wzmożenia badań - zarówno dotyczących terapii nowotworów hematologicznych jak i guzów litych. Wyniki przeprowadzonych dotychczas analiz wydają się być obiecujące. Udowodniona skuteczność metody CAR-T doprowadziła do rozprzestrzeniania jej na coraz szerszą skalę, m.in. w Polsce, gdzie od 2019 roku daje nadzieję na uzyskanie całkowitej remisji pacjentom, których poprzednie linie leczenia zawiodły. Dzięki działaniom polskich specjalistów możliwość skorzystania z terapii staje się coraz bardziej powszechna. Celem poniższej pracy jest przybliżenie procesu powstawania komórek CAR (następujących po sobie etapów oraz ich złożoności), zwrócenie uwagi na poczynione dotychczas postępy w leczeniu chorób hematologicznych, a także ukazanie perspektyw dających nadzieję na skuteczność terapii w leczeniu guzów litych.

Słowa kluczowe: CAR-T cells, immunoterapia, nowotwory hematologiczne, guzy lite

Abstract: CAR-T cell therapy refers to an autologous transplant of genetically modified T lymphocytes from the patient. The first mentions of transgenic T cells date back to the 1980s. The common feature of all modified cells in this method is the presence of a chimeric antigen receptor (CAR). Over the years, the structure, mechanism of action, and functions of CAR receptors have undergone changes. The demonstrated therapeutic effect in patients with hematological tumors became the basis for intensified research, both regarding hematological tumor therapy and solid tumors. The results of the conducted analyses seem promising. The proven effectiveness of CAR-T therapy has led to its spreading on an increasingly larger scale, including in

Poland, where it has given hope for achieving complete remission to patients whose previous lines of treatment have failed since 2019. Thanks to the actions of Polish specialists, the possibility of using CAR-T therapy is becoming more and more widespread. The purpose of this study is to elucidate the process of CAR cell development (including successive stages and their complexity), to highlight the advancements made in the treatment of hematologic malignancies, and to present the promising prospects for the efficacy of therapy in treating solid tumors.

Keywords: CAR-T cells, immunotherapy, hematologic neoplasms, solid tumors

1. Wstęp

Terapią CAR-T (*ang. chimeric antigen receptors T cell therapy*) nazywamy procedurę mającą na celu dostarczenie do organizmu chorego (najczęściej na nowotwór hematologiczny) zmienionych za pomocą inżynierii genetycznej, ówczynie od niego pobranych limfocytów T. Celem omawianej terapii jest stworzenie połączenia limfocyту T z przeciwciałem, którego fragmenty zmienne rozpoznają struktury charakterystyczne dla komórek nowotworowych^[1]. Pierwsza generacja genetycznie zmodyfikowanych, chimerycznych limfocytów T została stworzona w latach 1989-1993 przez izraelskich immunologów Z. Eshhar'a i G. Gross'a w Instytucie Naukowym Weizmana w Izraelu. W tamtym czasie nie były one klinicznie skuteczne^[2]. Przez kolejne lata, aż do czasów terażniejszych metoda pozwalająca na powstanie cytotoksycznych limfocytów atakujących komórki zawierające konkretne proteiny na swojej powierzchni była technologicznie i immunologicznie modernizowana. Doprowadziło to w rezultacie do powstania drugiej, trzeciej i czwartej generacji CARs różniących się od siebie poszczególnymi składowymi^[2,3].

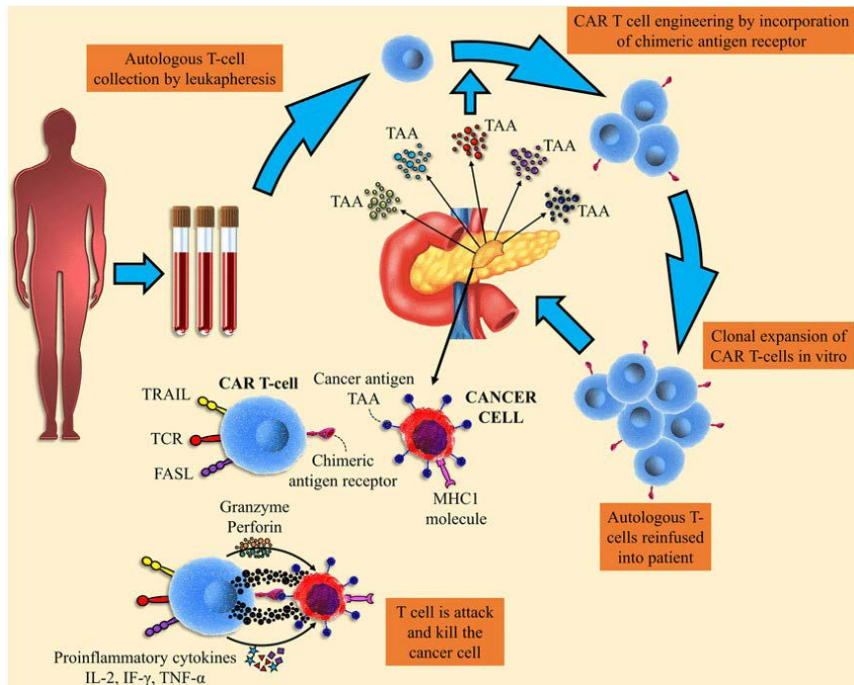
2. Mechanizm działania CAR-T

Podstawowym elementem komórkowym immunoterapii CAR-T są wyizolowane od pacjenta jego własne limfocyty T. Zostają one poddane modyfikacjom genetycznym *ex vivo* w celu zaprogramowania ich do atakowania tylko komórek wywołujących daną chorobę^[4]. W procesach inżynierii genetycznej dochodzi do stworzenia chimery, czyli połączenia dwóch różniących się genetycznie składowych układu odpornościowego, a więc komórki T i przeciwciała, nie występujących naturalnie razem w organizmie człowieka. W ten sposób udoskonalona komórka łączy w sobie dwa rodzaje odpowiedzi swoistej układu immunologicznego - cytotoksycznej i humoralnej^[1]. Cechą tak zrekonstruowanych limfocytów T jest rozpoznawanie i niszczenie

komórek nowotworowych bez wcześniejszego zaprezentowania im antygenów za pośrednictwem białek MHC (*ang. major histocompatibility complex*)-głównego układu zgodności tkankowej [1,3,4,5].

2.1. Powstawanie limfocytów CAR-T

Pierwszy etap prowadzący do powstania limfocytów T z chimerycznym receptorem antygenowym polega na pobraniu krwi obwodowej pacjenta, a następnie na wyizolowanie z niej komórek T mających największe szanse na przeżycie na drodze leukaferazy [1,4]. Limfocyty T, po uprzednim odseparowaniu od nich limfocytów Th17, są namnażane w warunkach *ex vivo* [4]. Pozyskane w ten sposób limfocyty poddawane są modyfikacji genetycznej. Umożliwia ona wprowadzenie do komórki T chimerycznego receptora antygenowego (CAR) za pośrednictwem wirusowego wektora. Do przeprowadzenia transfekcji mogą posłużyć zarówno plazmidy, jak i całe cząsteczki wirusów (przede wszystkim lentiwirusów i retrowirusów). Wymogiem do przeniesienia materiału genetycznego wirusa do wnętrza komórki T jest wcześniejsze pozbawienie go zjadliwości (wirulencji). Tak zrekonstruowana komórka zawiera w swoim genomie informacje genetyczną o wyglądzie przyszłej chimery limfocytu z przeciwciałem. Dodatkowo nabywa zdolności do ekspresji wielu czynnościowo aktywnych CAR na swojej powierzchni, do których przyłączone zostaną części zmienne przeciwciał wiążących „wgrany” antygen, co tym silniej wzmocni siłę wiązania z komórką nowotworową, przeciwko której jest skierowana [1,4]. Przed podaniem przygotowanych w wyżej opisany sposób komórek umieszcza się je w hodowli komórkowej, zanurza w specjalnej mieszance i poddaje krioprezerwacji. Mieszanka ta jest kombinacją związków: DMSO/dekstran 40/HSA/dekstroza/Plasma-Lyte A. Laboratorium przed przekazaniem preparatu do placówki medycznej, w której ma być on podany pacjentowi przeprowadza testy jego sterylności. Po odpowiednim przygotowaniu pacjenta pobrane od niego limfocyty T ponownie podawane są do krwiobiegu w postaci dożyłnej infuzji [4].

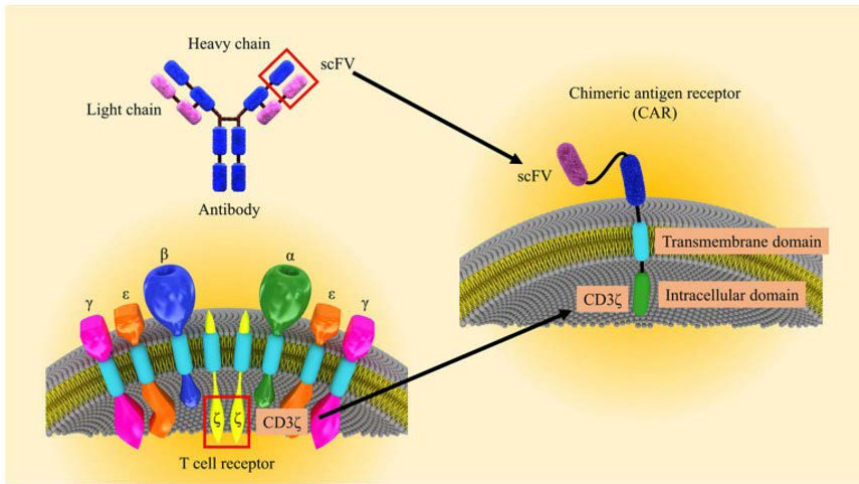


Rycina 1. Na rycinie przedstawiono okres izolacji, namnażania i interakcji komórek CAR-T z komórkami nowotworowymi [6].

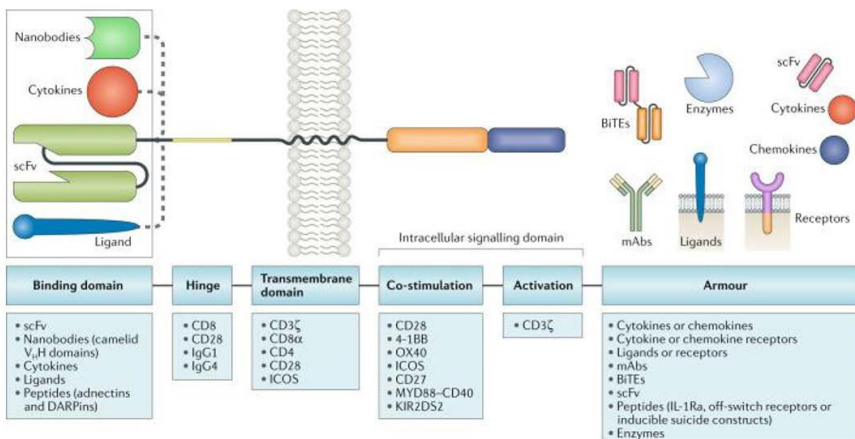
2.2 Budowa poszczególnych generacji CARs

Współczesna wiedza i technologia pozwoliły na stworzenie do tej pory czterech generacji CARs. Struktura każdej kolejnej generacji zawiera wszystkie składowe swojego poprzednika, wzbogacone o nowe elementy ułatwiające np. wiązanie większej liczby antygenów czy łatwiejsze wzbudzenie czynności cytotoksycznej. Pierwsza z nich należy do białek fuzyjnych złożonych z trzech domen [1]. Wewnątrzkomórkowa domena sygnałowa zawiera cząsteczkę CD3 ζ , dzięki której możliwe jest przekazanie sygnału do TCR (*ang. T cell receptor*) limfocyty, a tym samym aktywacja właściwości cytotoksycznych. Brak dodatkowych cząsteczek kostymulujących związanych z CD3 ζ uniemożliwia CAR T pierwszej generacji proliferację in vivo po ponownym wlewie dożylnym, co dowodzi nieprzydatności tych limfocytów do stosowania jako lek. W skład budowy pierwotnego chimerycznego receptora antygenowego wchodzi domena przezbłonowa łącząca domenę wewnątrzkomórkową z domeną zewnątrzkomórkową. Pomiedzy domeną przezbłonową i zewnątrzkomórkową umiejscowione jest białko zwane zawiasem, które może stanowić

np. cząsteczka CD28. Domenę wysuniętą najbardziej na zewnątrz komórki tworzy zazwyczaj jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała (*ang. Single - chain variable fragment, scFv*) wykazujący powinowactwo do wybranej cząsteczki na powierzchni błony komórki nowotworowej. Ze względu na możliwość przyłączania różnych scFv oraz dodatkowych molekuł pomocniczych w wiązaniu z antygenem domenę tą nazywa się również domeną „złączoną” (*ang. binding domein*) [6,7].



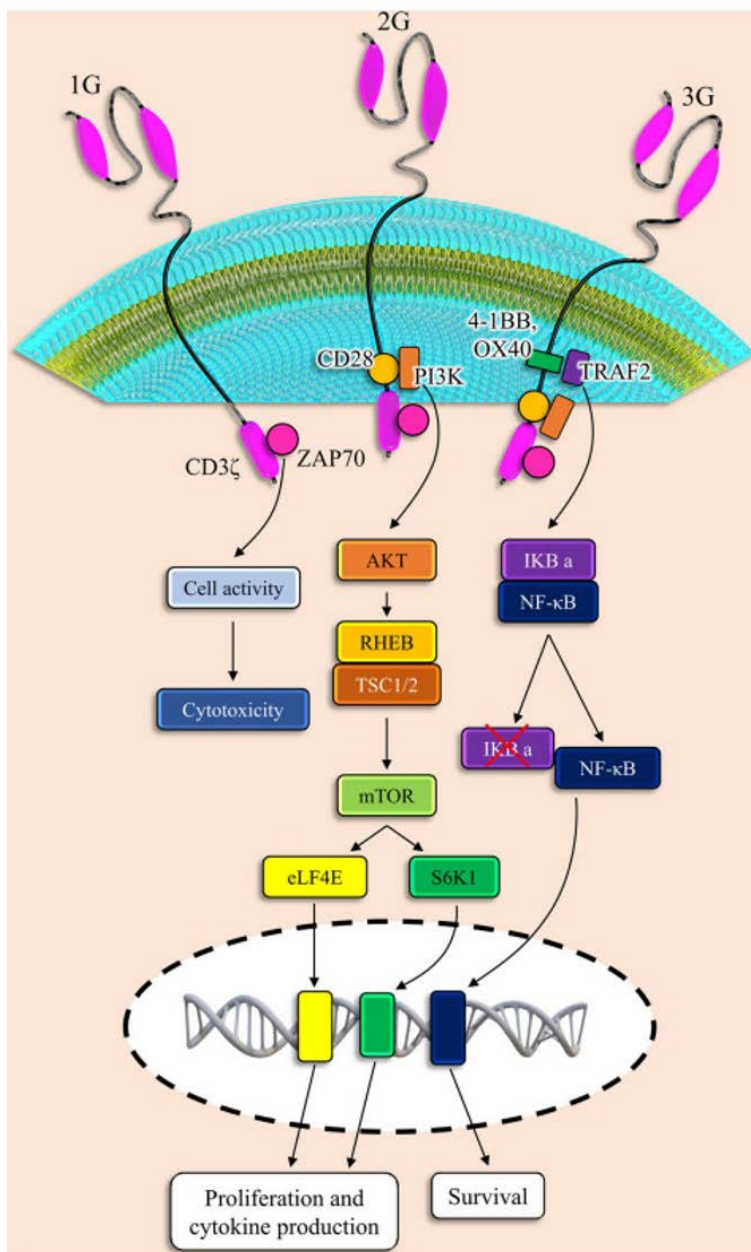
Rycina 2. Budowa CAR. Zwrócono uwagę na możliwość zmiany budowy domeny zewnętrznej komórkowej poprzez przyłączenie do niej fragmentu zmiennego wybranego przeciwciała [6].



Rycina 3. Schemat budowy chimerycznych receptorów antygenowych (CAR) [7].

Modyfikacje w architekturze generacji drugiej i trzeciej związane są z dołączeniem cząsteczki kostymulującej do łańcucha CD3 ζ . CAR drugiej generacji zaopatrzone są w jedną dodatkową domenę kostymulującą, podczas gdy trzecia generacja związana jest z dwiema domenami. W tym wypadku rolę kostymulantów mogą pełnić cząsteczki np. CD28, CD137, CD134, 4-1BB lub OX-40 [6]. Dobranie pojedynczego kostymulanta (w przypadku CAR drugiej generacji), bądź pary takich molekuł (w CAR trzeciej generacji) nie może być przypadkowe. Domeny te wywierają bowiem wpływ na ujawnienie się określonych właściwości limfocytów T, pożądanych w przypisanych do nich typach nowotworów. Jeśli chodzi o chimery drugiej generacji, sygnał pochodzący z cząsteczki CD28 zwiększa przeciwnowotworową cytotoksyczność komórki, zwiększa liczbę wydzielanych przez nią cytokin, przyspiesza proces proliferacji oraz zwiększa długość przeżycia komórki wewnątrz ustroju [3,8]. Natomiast współdziałanie np. CD28 oraz OX40 (trzecia generacja) powoduje ponadto spadek sekrecji interleukiny 10 [3]. Udowodniono również, iż indukowalny kostymulator T-komórkowy (ICOS) zestawiony z CD28 lub 4-1BB (CD137) wydłuża czas przeżycia komórki *in vivo*, zaś kooperacja MYD88 (*ang. myleoid differentiation primary response 88*) z CD40 potęguje wewnątrzustrojową proliferację [3,7]. Badania na myszach dowiodły także lepszą, choć w dalszym ciągu niewystarczającą skuteczność trzeciej generacji w leczeniu guzów litych. Problem stanowiła m.in. zbyt krótka przeżywalność chimerycznych limfocytów T w środowisku guza nowotworowego, co zdecydowało, że CAR trzeciej generacji nie są jeszcze brane pod uwagę w leczeniu guzów litych [9,10]. Przekazywanie sygnałów wewnątrz CAR indukowanych przez dane cząsteczki nie jest do tej pory dokładnie poznane. Niesie to za sobą nadzieję na odkrycie być może nowych cząsteczek lub ujawnienie dotąd nieznanego wpływu starych na właściwości limfocytów CAR T.

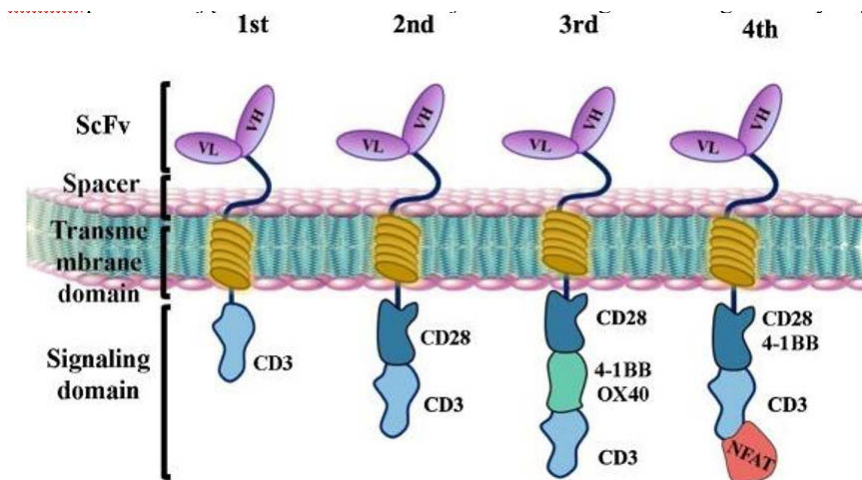
Liczne ograniczenia dotyczące niskiej przeżywalności w mikrośrodowisku guzów litych, nie tylko naturalnych komórek układu odpornościowego, ale także CAR wyżej opisanych generacji doprowadziły do stworzenia TRUCKs (*ang. T cells redirected for universal cytokine-mediated killing*), stanowiących czwartą generację CARs. W swojej budowie przypominają drugą generację, jednak wzbogacone są o jądrowy czynnik aktywowanych limfocytów T (*ang. nuclear factor of activated T cells, NFAT*) [11,12]. Pierwotny model TRUCK wymagał transdukcji dwóch odseparowanych wektorów, z których jeden kodował ekspresję CAR a drugi ekspresję wydzielania cytokin indukowaną przez NFAT. Wiązało się to z wysokim ryzykiem mutagenyzy, co zaniechało wprowadzenie tak skonstruowanej chimery do działań klinicznych.



Rycina 4. Schemat budowy CAR pierwszej, drugiej i trzeciej generacji [6].

Odpowiedzią na problem występowania samoczynnych mutacji okazało się skonstruowanie systemu „all in one”. Stanowiący go zmodyfikowany, pojedynczy wektor zawiera w swoim materiale genetycznym zarówno informacje dotyczące budowy CAR, jak i NFAT. Wydzielanie cytokin w odpowiedzi

na sygnały indukujące pochodzące z NFAT jest możliwe tylko dzięki aktywacji CAR. Wzajemna zależność obu tych białek zapewnia ekspresję cytokin wyłącznie w odpowiedzi na rozpoznanie docelowego antygeny na powierzchni guza litego. Jak dotąd najczęściej używana modyfikacja dotyczy zaprogramowania TRUCKs do rozpoznawania antygeny GD2 oraz uwalniania IL-12 lub IL-18. Ekspresja GD2 jest swoista dla zdrowych tkanek ludzkiego organizmu, ale jest również charakterystyczna dla kilku guzów litych np. glejaka, neuroblastomy oraz mięsaków. Z kolei interleukiny 12 i 18 wydłużają czas przeżycia TRUCKs w toksycznym środowisku guza, wzmagają ich aktywację oraz nasilają migrację monocytów. Wymienione wcześniej cechy budowy oraz mechanizm działania TRUCKs przemawiają za zastosowaniem ich jako celowanego leczenia guzów litych ^[12].



Rycina 5. schematy budowy wszystkich dotąd stworzonych generacji CAR T ^[11].

3. Zastosowanie terapii CAR-T w leczeniu nowotworów

3.1. Leczenie nowotworów hematologicznych

Metody ingerencji genomowej uwzględnione w powyższym rozdziale doprowadziły do powstania limfocytów T zdolnych do rozpoznania komórki zawierającej swoisty antygen dla fragmentu przeciwciała obecnego w domenie zewnątrzkomórkowej CAR. Wysoka specyficzność scFv oraz sposobność do przyłączania fragmentów pochodzących z różnych przeciwciał

ukierunkowała tak zrekombinowane limfocyty do aktywacji tylko w pobliżu komórek z docelowym antygenem na ich powierzchni. Daje to więc możliwość zaprogramowania CAR do wykazywania cytotoksyczności tylko wobec jednej cząsteczki z pominięciem komórek jej nieposiadających ^[13]. Dotychczas największą skuteczność metody wykazano w leczeniu tzw. „ostatniej szansy” nowotworów hematologicznych, gdy poprzednie linie leczenia nie przyniosły oczekiwanych efektów. Wśród nich do najczęściej leczonych należą białaczki i chłoniaki nieziarnicze wywodzące się z limfocytów B. Objawy występujące w przebiegu B - komórkowych białaczek i chłoniaków wywołane są zaburzeniami w liczbie i/lub funkcji limfocytów. W swojej budowie limfocyty B uwzględniają glikoproteinę CD19 obecną na błonie zarówno młodych jak i dojrzałych prekursorów komórek plazmatycznych. Leczenie m.in. ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL), przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL) lub chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL) przebiega z użyciem CAR T skierowanych przeciwko CD19. Decydujący głos w sprawie dopuszczenia terapii CAR T w leczeniu wymienionych chorób nowotworowych miała Amerykańska Agencja Żywności i Leków, która zezwoliła na wykorzystanie preparatu Kymriah w leczeniu zarówno białaczek i chłoniaków, oraz preparat Yescarta do zastosowania przeciwko chłoniakom ^[14-16]. Statystyki oparte na przeprowadzonych do tej pory badaniach dowodzą uzyskanie kompletnej remisji u około 90% pacjentów chorujących na nawrotową, oporną na leczenie ALL. Dla porównania chemioterapia uzyskała w tym przypadku wynik o połowę mniejszy ^[17]. Natomiast częściową lub całkowitą remisję udało się uzyskać u 57% pacjentów borykających się z nawrotową, oporną na leczenie CLL ^[18]. Wykorzystanie terapii CAR T przeciwko nawrotowemu, opornemu na pierwszą i/lub drugą linię leczenia chłoniakowi nieziarniczemu z limfocytów B przyniosło efekty u ponad 50% pacjentów ^[15]. Badania kliniczne dotyczące przeciwnowotworowej terapii z wykorzystaniem CAR T zostały także rozszerzone o chłoniaka Hodgkina (ziarniczego) wywodzącego się z tej samej linii komórkowej. Zastosowane w niej chimeryczne komórki T, w odróżnieniu od tych używanych w terapii białaczek i chłoniaków nieziarnicznych, rozpoznają cząsteczki CD30, charakterystyczne dla tego rodzaju choroby rozrostowej układu chłonnego. Dane pochodzące z I i II fazy badań klinicznych sugerują uzyskanie całkowitej remisji u 59% dotkniętych chorobą oraz przynajmniej roczne przeżycie po zastosowaniu leczenia u aż 94% pacjentów ^[19].

3.2. Nadzieja w leczeniu guzów litych

Strategia walki z komórkami guzów litych wymaga pokonania inicjowanych przez nie dodatkowych przeszkód, które nie dotyczą nowotworów hematologicznych. Jedną z nich wynika z odmiennego pochodzenia komórek guzów litych, podczas gdy wszystkie komórki krwi wywodzą się z macierzystych komórek krwiotworzenia. Ze względu na wspólne pochodzenie oraz późniejszą migrację do tych samych narządów limfopoetycznych (np. szpik, węzły chłonne) komórki blastyczne (prekursory komórek układu odpornościowego, takich jak limfocyty B) wykazują ekspresję charakterystycznych antygenów na swojej powierzchni odróżniających je od innych komórek układu immunologicznego oraz innych komórek organizmu. Skuteczność terapii CAR-T CD19+ opiera się na selektywnym atakowaniu komórek blastycznych z antygenem CD19 na powierzchni, a więc leczenia wyłącznie B - komórkowych nowotworów hematologicznych. Warto zaznaczyć właściwością guzów litych jest ich heterogeniczność. Pojęcie heterogeniczności odnosi się do różnorodności lub zróżnicowania w grupie jednostek. Oznacza to, że każdy guz lity jest unikalny i może różnić się od innych guzów pod względem genetycznym, fenotypowym i biologicznym. Zarówno zmienność genetyczna, jak i fenotypowa wpływają na różny poziom ekspresji antygenów na powierzchni komórek guzów litych w różnych klonach komórkowych. Z tego względu heterogeniczność guzów jest jednym z głównych wyzwań w ich leczeniu, ponieważ sprawia ona, że jedna metoda terapii może nie być skuteczna dla wszystkich pacjentów z tą samą diagnozą. Przeszczepienie limfocytów CAR-T przeciwko tej grupie nowotworów zagrożone jest również wystąpieniem potencjalnej toksyczności przeciwko komórkom zdrowym^[4,13]. Stało się to podstawą do wszczęcia badań mających na celu znalezienie idealnego antygeny tzn. występującego tylko na powierzchni danego guza. W przeprowadzonych dotychczas badaniach poddano analizie wiele pozytywnie rokujących antygenów, w tym m.in. GD2, CEA, MUC1 i HER2^[4]. Wśród nich najkorzystniej wypadł PSMA (*ang. prostate-specific membrane antigen*), czyli swoisty antygen błonowy prostaty. Poczynione obserwacje dowodzą jego obecności na komórkach raka gruczołu krokowego oraz na komórkach śródbłonna naczyń niektórych nowotworów, natomiast nie stwierdza się jego swoistości ze zdrowymi komórkami organizmu^[20]. Czynnikiem ograniczającym efektywność kuracji jest także wspomniane w rozdziale 2 mikrośrodowisko guza, które w znaczny sposób zmniejsza przeżycie limfocytów T w okolicach jego zrębu, a tym samym przeciwdziała ich naciekaniu i aktywacji.

Lista opublikowanych badań klinicznych dotyczących wpływu terapii CAR-T na guzy łebe jest znacznie mniejsza niż w przypadku nowotworów hematologicznych. Powód stanowią m.in. zdecydowanie węższa grupa nowotworów litych, u których uzyskano zadowalającą odpowiedź oraz niewspółmiernie niższy odsetek osób wyleczonych z tej samej choroby. Całkowitą remisję udało się uzyskać wśród niewielkiej części pacjentów cierpiących na czerniaka wywodzącego się z melanocytów (*ang. melanoma*). Chorym z tej grupy przeszczepiono transgeniczne limfocyty T z chimerycznym receptorem rozpoznającym antygen MART1 zlokalizowanym na powierzchni zdrowych i nowotworowo zmienionych melanocytów. U 2 z 17 leczonych osób nastąpiła częściowa regresja choroby, brak istotnej toksyczności terapii oraz ponad roczne przeżycie zmodyfikowanych limfocytów w ustroju tych pacjentów. Przeprowadzone kilka lat później badanie, również dotyczące antygenu MART1, pozwoliło na uzyskanie znacznej regresji metastatycznego melanomu u 4 pacjentów z 31 badanych. Inne badania opisujące przebieg leczenia z zastosowaniem komórek CAR-T skierowanym przeciwko: MART1, MAGE-A3, gp100 oraz NYESO-1 dowodzą skuteczności terapii uzyskując całkowitą i częściową remisję w każdej grupie badanych. Z kolei CAR rozpoznające antygen GD2 umożliwiły wprowadzenie w stan remisji 5 z 19 osobowej grupy badanych dzieci cierpiących na rdzeniaka zarodkowego (*neuroblastoma*) ^[21].

Target antigen	Target disease	T-cell therapy	No. patients	Responses	References
GP100	Melanoma	TCR	16	1 CR and 2 PR	Johnson et al., 2009
MAGEA3	Melanoma, oesophageal and synovial sarcoma	TCR	9	1 CR and 4 PR	Morgan et al., 2013
NYESO-1	Melanoma and sarcoma	TCR	17	2 CR and 7 PR	Robbins et al., 2011
CD19	ALL	CAR	21	18/21 CR (86%) within 28 days. 16 of these patients were also MRD-negative	Maus et al., 2014a
	ALL	CAR	20	14/20 CR (70%) within 28 days. 12 of these patients were also MRD-negative	Lee et al., 2014
	ALL	CAR	30	27/30 CR (90%) at day 28. 22 of these patients were also MRD-negative	Maude et al., 2014
GD2	Neuroblastoma	CAR	19	3 CR within 6 weeks, 2 CRs sustained >21 months	Louis et al., 2011

ALL, acute lymphoblastic leukaemia; CR, complete response; MRD, mixed residual disease; PR, partial response. Please note that only positive responses are shown here.

Rycina 6. Na rycinie przedstawiono przykłady upublicznionych badań klinicznych potwierdzających pozytywny wpływ terapii CAR-T na leczenie chorych z nowotworami hematologicznymi i guzami litymi ^[21].

4. Zastosowanie terapii CAR-T w Polsce

Restrykcyjne metody przygotowania i podania preparatu zawierającego limfocyty CAR wymagają odpowiedniej infrastruktury ośrodka i przeszkolenia kadry specjalistów. Z tego względu wykorzystanie technologii CAR-T może mieć miejsce wyłącznie w certyfikowanych ośrodkach spełniających najwyższe

standardy. Dotychczas w Polsce zgodę na wykonywanie programu uzyskały takie ośrodki jak: Oddział Hematologii i Transplantacji Szpiku Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego UM w Poznaniu; Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej „Przyłodek Nadziei” Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu; Klinika Transplantacji Szpiku i Onkohematologii Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego z oddziałem w Gliwicach [22]; Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych UCK WUM w Warszawie [23,24]. Narodowy Fundusz Zdrowia refunduje stosowanie terapii w przypadku chorych na oporne i nawrotowe ALL i DLBCL [25].

4.1. Początki CAR-T w Polsce

Po raz pierwszy w Polsce realizacja innowacyjnej metody przeciwnowotworowej CAR-T odbyła się w 2019 roku w Klinice Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego w Poznaniu. Otrzymał ją 30-letni pacjent zmagający się z DLBCL [26,27]. Ta sama klinika w 2021 roku, za sprawą firmy Janssen jako głównego inwestora, jako pierwsza w Polsce zastosowała tzw. terapię cilta-cel. Stanowi ona przedmiot kompleksowego programu rozwoju klinicznego w leczeniu pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie szpiczakiem mnogim oraz we wcześniejszych liniach leczenia. Zawarte w niej chimeryczne receptory antygenowe skierowane są przeciwko antygenowi BCMA typowemu dla nowotworów wywodzących się z komórek plazmatycznych, w tym szpiczaka mnogiego. Transfuzję z tak zrekombinowanych CARs przyjął 40-letni pacjent z agresywną postacią szpiczaka plazmocytozy [28]. Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej „Przyłodek Nadziei” Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu stała się polskim prekursorem zastosowania terapii CAR-T u dzieci, przeszczepiając transgeniczne limfocyty T młodemu pacjentowi z oporną ALL 3 marca 2020 roku. Pozwoliło to osiągnąć u chorego ujemną chorobę resztkową po 7 latach od rozpoczęcia leczenia [29].

4.2. Przyszłość CAR-T w Polsce

Do niedawna wytworzenie limfocytów CAR-T w Polsce nie było możliwe. Aktualnie pobrany od pacjenta materiał potrzebny do stworzenia preparatu jest w następnej kolejności wysyłany do amerykańskich laboratoriów m.in. w Santa Monica w Kalifornii [26]. Powoduje to znaczne zwiększenie

kosztów przeprowadzenia terapii, przez co rocznie leczonych w Polsce metodą CAR-T jest zaledwie kilku pacjentów. Zapotrzebowanie społeczeństwa polskiego istotnie przewyższające ilość wykonywanych transfuzji z limfocytami CAR-T, spowodowało przeprowadzenie konkursu zainicjowanego przez Agencję Badań Medycznych (ABM) w 2020r. Głównym założeniem programu jest poszerzenie zakresu badań oraz umożliwienie produkcji komórek CAR-T na terenie naszego państwa. Wzięły w nim udział dwa konsorcja naukowe, których liderami byli Gdański Uniwersytet Medyczny (GUM) oraz Warszawski Uniwersytet Medyczny (WUM). Zagraniczni eksperci wyżej ocenili projekt WUM, na czele którego stał prof. dr hab. Sebastian Giebel, pełniący funkcje kierownika oddziału onkologicznego w Gliwicach. Zwycięskie konsorcjum otrzyma grant w wysokości 100 mln złotych na realizację celów przedstawionych w projekcie. Szacunki prowadzone przez Agencję Oceny Technologii Medycznych uwzględniające 100 milionową dotację od ABM sugerują pokaźny wzrost wykorzystania terapii CAR-T cells w Polsce. Z kolei predykcje samej ABM uwidaczniają nawet 10-krotne zmniejszenie kosztów technologii CAR-T w związku z wytwarzaniem jej w polskich ośrodkach. Według nich środki uzyskane w ramach grantu pozwolą na niezbędne wyposażenie polskich laboratoriów, co uczyni terapię niebagatelnie tańszą i szerzej dostępną. Natomiast zasadniczy spadek kosztów produkcji może przełożyć się na decyzje refundacyjne, co umożliwi zastosowanie leczenia u jeszcze większej liczby pacjentów ^[30,31].

5. Podsumowanie

Mimo ponad 30-letniej przeszłości terapia CAR-T należy niewątpliwie do jednych z najbardziej innowacyjnych, a zarazem skomplikowanych metod leczenia. Jej rozwój stanowi obiecujący wariant terapeutyczny dla chorych z zaawansowaną chorobą nowotworową. Prężne badania na przestrzeni lat pozwoliły odnotować wyraźny sukces terapeutyczny oraz stale modernizować skład komórek T. Jednak dotychczasowy triumf nowoczesnej immunoterapii widoczny jest wyłącznie w leczeniu nowotworów hematologicznych związanych z dysfunkcją limfocytów B. Wymogiem wprowadzenia technologii CAR do leczenia guzów litych jest wynalezienie tak zaprojektowanych limfocytów T, aby możliwe było pokonanie przeszkód związanych z heterogenicznością guzów. W tym celu konieczne jest zwiększenie liczby prowadzonych badań oraz pacjentów w nich uczestniczących. Obecne techniki inżynierii genetycznej umożliwiają zaopatrzenie CARs w dowolną cząsteczkę

kostymulującą lub wybrany scfV. Można więc przypuszczać, że wiele skutecznych hybryd nie zostało dotąd skomponowanych przez co nie poznano pełnego zakresu działania terapii. Daje to nadzieję na wyleczenie w przyszłości pacjentów cierpiących na dotąd nieuleczalne choroby nowotworowe.

Referencje

- [1] Kierasińska A, Ciunowicz D, Węgińska M, Stoczyńska-Fidelus E, Rieske P. CAR-T therapy in oncology and other fields of medicine. *Alergologia Polska - Polish Journal of Allergology*. 2021;8(2):77-91. doi:10.5114/pja.2021.106685.
- [2] Styczyński J. A brief history of CAR-T cells: from laboratory to the bedside | Styczyński | *Acta Haematologica Polonica*. Via Medica Journals. Dostęp 21.02.2023. https://journals.viamedica.pl/acta_haematologica_polonica/article/view/75176.
- [3] Hong M, Clubb J, Chen Y. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell*. Dostęp 21.02.2023. [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(20\)303664?rss=yes&utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(20)303664?rss=yes&utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound).
- [4] Wrona E, Potemski P. A novel immunotherapy — the history of CAR T-cell therapy | Wrona | *Oncology in Clinical Practice*. Via Medica Journals. Dostęp 21.02.2023. https://journals.viamedica.pl/oncology_in_clinical_practice/article/view/61681.
- [5] Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 2021;11(4):69. Published 2021 Apr 6. doi:10.1038/s41408-021-00459-7.
- [6] Marofi F, Motavalli R, Safonov VA, et al. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):81. Published 2021 Jan 25. doi:10.1186/s13287-020-02128-1.
- [7] Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(3):147-167. doi:10.1038/s41571-019-0297-y.
- [8] Sermer D, Brentjens R. CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematol Oncol*. 2019;37 Suppl 1:95-100. doi:10.1002/hon.2591.

- [9] Tammana S, Huang X, Wong M, et al. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum Gene Ther.* 2010;21(1):75-86. doi:10.1089/hum.2009.122.
- [10] Wang J, Jensen M, Lin Y, et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum Gene Ther.* 2007;18(8):712-725. doi:10.1089/hum.2007.028.
- [11] Esmaeilzadeh A, Tahmasebi S, Athari SS. Chimeric antigen receptor-T cell therapy: Applications and challenges in treatment of allergy and asthma. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219353077?via%3Dihub>. Published December 17, 2019. Accessed February 21, 2023.
- [12] Zimmermann K, Kuehle J, Dragon AC, et al. Design and Characterization of an "All-in-One" Lentiviral Vector System Combining Constitutive Anti-G_{D2} CAR Expression and Inducible Cytokines. *Cancers (Basel).* 2020;12(2):375. Published 2020 Feb 6. doi:10.3390/cancers12020375.
- [13] Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(1):5-18. doi:10.2174/1389201019666180418095526.
- [14] O'Leary MC, Lu X, Huang Y, et al. FDA Approval Summary: Tisagenlecleucel for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2019;25(4):1142-1146. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2035.
- [15] Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene marelucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet.* 2020;396(10254):839-852. doi:10.1016/S0140-6736(20)31366-0.
- [16] Papadouli I, Mueller-Berghaus J, Beuneu C, et al. EMA Review of Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta) for the Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist.* 2020;25(10):894-902. doi:10.1634/theoncologist.2019-0646.

- [17] Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):449-459. doi:10.1056/NEJMoa1709919.
- [18] Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med.* 2015;7(303):303ra139. doi:10.1126/scitranslmed.aac5415
- [19] Ramos CA, Grover NS, Beaven AW, et al. Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2020;38(32):3794-3804. doi:10.1200/JCO.20.01342.
- [20] Yong CSM, Dardalhon V, Devaud C, Taylor N, Darcy PK, Kershaw MH. CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(4):356-363. doi:10.1038/icb.2016.128.
- [21] Sharpe M, Mount N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech.* 2015;8(4):337-350. doi:10.1242/dmm.018036.
- [22] Gośliński J. Technologia CAR-T w Polsce: dostęp i perspektywy - Immuno-onkologia.pl. Immuno-onkologia.pl. Dostęp 21.02.2023. <https://immuno-onkologia.pl/car-t-w-polsce-doswiadczenia-perspektywy/>.
- [23] Stelmach M. Nowoczesny oddział w UCK WUM będzie się zajmował m.in. terapią CAR-T. Wydawnictwo Medyczne Termedia – Książki, Konferencje, Artykuły. 23.11.2022. Dostęp 21.02.2023. <https://www.termedia.pl/onkologia/Nowoczesny-oddzial-w-UCK-WUM-bedzie-sie-zajmowal-m-in-terapia-CAR-T,49451.html>.
- [24] Stelmach M. Od września refundowana jest pierwsza terapia komórkowa i genowa CAR-T. Wydawnictwo Medyczne Termedia – Książki, Konferencje, Artykuły. 2.09.2021. Dostęp 21.02.2023. <https://www.termedia.pl/onkologia/Od-wrzesnia-refundowana-jest-pierwsza-terapia-komorkowa-i-genowa-CAR-T,43509.html>.
- [25] Terapia CAR-T dla Polaków. Agencja Badań Medycznych. Dostęp 21.02.2023. <https://abm.gov.pl/pl/aktualnosci/1440,Terapia-CAR-T-dla-Polakow.html>.

- [26] Stelmach M. Po raz pierwszy w Polsce zastosowano innowacyjną terapię CAR-T. Wydawnictwo Medyczne Termedia – Książki, Konferencje, Artykuły. 3.12.2019. Dostęp 21.02.2023. <https://www.termedia.pl/mz/Po-raz-pierwszy-w-Polsce-zastosowano-innowacyjna-terapię-CAR-T,36223.html>.
- [27] Lurka K. CAR-T w Poznaniu. Wydawnictwo Medyczne Termedia – Książki, Konferencje, Artykuły. 20.12.2019. Dostęp 21.02.2023. <https://www.termedia.pl/mz/CAR-T-w-Poznaniu,36420.html>.
- [28] Lang A. Pierwsze podanie CAR-T w Polsce pacjentowi ze szpiczakiem plazmocytowym. Wydawnictwo Medyczne Termedia – Książki, Konferencje, Artykuły. 19.07.2021. Dostęp 21.02.2023. <https://www.termedia.pl/onkologia/Pierwsze-podanie-CAR-T-w-Polsce-pacjentowi-ze-szpiczakiem-plazmocytowym,43099.html>.
- [29] Uniwersytecki Szpital Kliniczny we Wrocławiu - Terapia CAR-T. Uniwersytecki Szpital Kliniczny we Wrocławiu. Dostęp 21.02.2023. http://www.usk.wroc.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=2581Itemid=28.
- [30] Prof. Sebastian Giebel głównym badaczem zwycięskiego konsorcjum, które poprowadzi badania nad polską terapią CAR-T | Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach. Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach. Dostęp 21.02.2023. <https://www.io.gliwice.pl/instytut/prof-sebastian-giebel-glownym-badaczem-zwycieskiego-konsorcjum-ktore-poprowadzi-badania-nad>.
- [31] Stelmach M. Limfocyty CAR-T będą wytwarzane w Polsce. Wydawnictwo Medyczne Termedia – Książki, Konferencje, Artykuły. 6.06.2022. Dostęp 21.02.2023. <https://www.termedia.pl/onkologia/Limfocyty-CAR-T-beda-wytwarzane-w-Polsce,47340.html>.

Terapia CAR-T – ewolucja, budowa oraz inżynieria komórek

Lidia Ziętek, Michał Janik, Robert Kasza

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Onkologia to dziedzina medycyny, której głównym obiektem badań i działań są choroby nowotworowe. Jest to także dziedzina medycyny dotycząca poprawy jakości życia pacjentów onkologicznych, dlatego ciągle ulega ona rozwojowi. Leczenie pacjentów onkologicznych od lat stanowi jedno z wielu wyzwań w medycynie. Wynika to z faktu, iż komórki nowotworowe posiadają zdolność do niekontrolowanego namnażania, a także zdolność do unikania procesu apoptozy. W związku z tym immunoterapia nowotworów złośliwych od lat jest jednym z wiodących obiektów badań klinicznych w leczeniu osób chorych na nowotwory. Dotychczasowe metody leczenia, jak chemioterapia czy leczenie chirurgiczne nie zawsze okazywały się skuteczne w swoim zastosowaniu, co stworzyło potrzebę zastosowania innych form terapii. Dalsze badania nad leczeniem onkologicznym zaowocowały rozwojem terapii komórkowej i stworzeniem terapii CAR-T, opartej na chimerycznym receptorze antygenowym, połączonym z odpowiednio zmodyfikowanym limfocytom T, którego zadaniem jest obrona organizmu podczas reakcji odpornościowej przeciw komórkom nowotworowym. Celem poniższego rozdziału jest przedstawienie historii rozwoju terapii CAR-T, ewolucji i budowy poszczególnych generacji komórek specjalnie zszyntezowanych do tej formy leczenia, a także metody ich otrzymywania i inżynierii.

Słowa kluczowe: terapia CAR-T, inżynieria komórek, nowotwory

Abstract: Oncology is a field of medicine whose main object of research and activities are cancer. It is also a field of medicine related to improving the quality of life of oncological patients, which is why it is constantly developing. Treating oncological patients has been one of the many challenges in medicine for years. This is due to the fact that cancer cells have the ability to multiply uncontrollably, as well as the ability to avoid apoptosis. Therefore, cancer immunotherapy has been one of the leading objects of clinical trials in the treatment of cancer patients for years. Previous methods of treatment, such as chemotherapy or surgical treatment, have not always been effective in their application, which has created the need to use other forms of therapy. Further research on cancer treatment resulted in the development of cell therapy and the creation of CAR-T therapy, based on a chimeric antigen receptor combined with a suitably modified T lymphocyte, whose task is to defend the body during the immune reaction against cancer cells. The purpose of the following chapter is to present the history of

the development of CAR-T therapy, the evolution and construction of individual generations of cells specially synthesized for this form of treatment, as well as the method of obtaining and engineering them.

Keywords: CAR-T therapy, cell engineering, cancer

1. Wprowadzenie

Immunoterapia nowotworów złośliwych od lat ulega ciągłemu rozwojowi i jest jednym z wiodących obiektów badań. Na przestrzeni ostatnich dekad wielki postęp w medycynie poczyniła terapia komórkowa CAR-T w leczeniu pacjentów onkologicznych, nabierając także dużego znaczenia w zastosowaniu klinicznym jako perspektywiczna immunoterapia adoptywna [1]. Jednak nie należy ona do najnowszych odkryć w immuno-onkologii. Pierwsze doniesienia o zdolnościach cytotoksycznych limfocytów T (*ang. cytotoxic T lymphocyte, CTL*) w niszczeniu komórek docelowych pochodzą z lat 70. XX wieku [2, 3]. W latach 80. pojawiły się również informacje na temat badań klinicznych z zastosowaniem limfocytów naciekających nowotwór (*ang. tumor-infiltrating lymphocyte, TIL*) w immunoterapii adoptywnej ludzkich nowotworów [4]. Pierwsze badania i projekty związane z konstrukcją i ekspresją chimericznych genów receptorów limfocytów T (*ang. T-cell receptor, TCR*), biorących udział w odpowiedzi komórkowej, zostały przeprowadzone w Zakładzie Immunologii Chemicznej Instytutu Nauki Weizmanna w Izraelu, a ich wyniki opublikowano w 1989 roku [5]. 4 lata później, w 1993 roku Zelig Eshhar wraz z innymi immunologami ze wspomnianego Instytutu Nauki Weizmanna zaprojektowali i skonstruowali pierwsze geny chimeryczne, które stanowiły podstawę dla struktury receptora CAR [6]. Terapia CAR-T oparta jest na syntezowanym, chimerycznym receptorze antygenowym (*ang. chimeric antigen receptor, CAR*), połączonym z odpowiednio zmodyfikowanym limfocytym T, który bierze udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej układu odpornościowego. Połączone w ten sposób CAR z limfocytami T stanowią zmodyfikowane genetycznie komórki, które będą wykazywać ekspresję przereprogramowanych receptorów powierzchniowych oraz będą wiązać się z odpowiednimi antygenami komórek poprzez układ antygen-przeciwciała, w sposób niezależny od głównego kompleksu zgodności tkankowej (*ang. major histocompatibility complex, MHC*) [7]. W rezultacie pozwoli to na efektywniejsze zwalczanie komórek nowotworowych [7, 8]. Wadą pozostaje jednak fakt, iż komórki CAR-T

nie posiadają systemu regulacji ekspresji genu CAR w wyniku niezależności od MHC, co może powodować utratę kontroli odpowiedzi immunologicznej czy skutki uboczne immunoterapii [9]. Terapia CAR-T zaliczana jest do ATMP, czyli do tzw. produktów leczniczych terapii zaawansowanej (*ang. advanced therapy medicinal products*) [10]. W 2017 roku terapia CAR-T została po raz pierwszy zatwierdzona przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*ang. Food and Drug Administration, FDA*) oraz dopuszczona do wykorzystania w leczeniu chorych do 25. roku życia z ostrą białaczką limfoblastyczną (*ang. acute lymphoblastic leukemia, ALL*) oraz dorosłych z zaawansowaną postacią chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (*ang. diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL*) [11-15]. Na dzień dzisiejszy terapia CAR-T została dopuszczona do użytku klinicznego tylko w leczeniu nowotworów hematologicznych, gdzie wykazuje największą efektywność [16]. Oprócz tego, prowadzone są także wielokierunkowe badania kliniczne nad zastosowaniem terapii CAR-T w leczeniu m.in. guzów litych [17], w tym guzach mózgu [18] czy raka jelita grubego [19]. W tabeli nr 1 zostało przedstawione zestawienie dotychczasowych postępów i etapów rozwoju immunoterapii komórkowej CAR-T.

2. Komórki CAR-T

Na dzień dzisiejszy udało się stworzyć 5 generacji struktur receptorów CAR. Jako pierwsi technologię komórek CART-T stworzyli Gideon Gross, Tova Waks oraz Zelig Eshhar w celu ekspresji receptorów antygenowych [5, 6].

2.1. Budowa

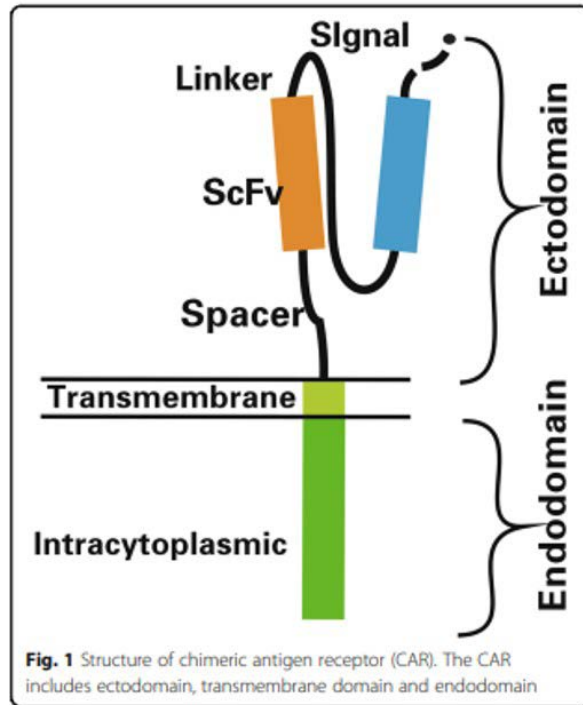
Receptor CAR posiada domenę zewnętrzną, którą stanowi region rozpoznający i wiążący antygen, domenę transbłonową oraz domenę wewnętrzną, którą tworzy region aktywacji, stymulujący rozwój komórek T, a także cytolizę i sekrecję cytokin, które będą brały udział w eliminacji komórek docelowych [11, 21]. Obecny jest także region zawiasowy, służący do łączenia domeny zewnątrzkomórkowej i domeny transbłonowej, który najczęściej tworzony jest przez IgG1, IgG4 oraz CD8 pochodzenia ludzkiego [22-24] (rycina 1.)

Część zewnątrzkomórkową CAR tworzy zwykle jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała (*ang. a single-chain variable fragment, scFv*), składający się ze zmiennych łańcuchów ciężkich (VH) i zmiennych łańcuchów lekkich (VL) [11, 26, 27]. W ektodomenie CAR scFv odgrywa rolę peptydu sygnałowego [28]. Jako domena wiążąca antygen wykorzystywane są również

Tabela 1. Tabela przedstawiająca zestawienie etapów w historii rozwoju i dotychczasowe osiągnięcia immunoterapii CAR-T [20].

Year	Achievement
1989	Generation of effector T cells expressing chimeric T-cell receptor [5, 6]
1993	First-generation CAR-T cells, not clinically effective [7]
2002	First effective CAR-T cells against prostate cancer antigen in the laboratory
2003	Second-generation CARs: CD19-directed CAR-T cells can kill leukemia cells in mouse
2009	CD19 CAR-T cells used in relapsed/refractory leukemia
2011	CD19 CAR-T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia [1]
2013	CD19 CAR-T cells in pediatric acute lymphoblastic leukemia [2]
2013	Science magazine announced cancer immunotherapy as "Breakthrough of the Year"
2014	Third-generation CAR-T cells: inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities [8]
2015	Fourth-generation CARs, the so-called TRUCKs (CAR redirected T cells that deliver a transgenic product to the targeted tumor tissue) or armored CARs, which produce other molecules built and being tested for ovarian cancer [10]
2015	Concept of CAR-NK cells [16]
2017	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) used to optimize CAR placement in T cells [14]
2017	FDA approves CD19-CAR-T cells for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in children and young adults
2017	FDA approves CD19-CAR-T cells for relapsed/refractory DLBCL in adults
2018	EMA approves CD19-CAR-T cells for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in children and young adults and for relapsed/refractory DLBCL in adults
2019	Dual CD19/CD22 CAR-T cells in acute lymphoblastic leukemia in children and adults [17]

CAR – chimeric antigen receptor; CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats; FDA – US Food and Drug Administration Agency; EMA – European Medicines Agency; DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma.



Rycina 1. Rycina przedstawiająca budowę receptora CAR ^[25].

nanociał, zwane również przeciwciałami VHHs (*ang. variable fragments of heavy chain antibodies*), które pochodzą ze zmiennej domeny łańcucha ciężkiego przeciwciał (*ang. heavy chain antibodies, HcAbs*) i mogą stanowić alternatywę dla scFv. Zastosowanie w terapii zawdzięczają swoim niewielkim rozmiarom, stabilności, a także dużemu powinowactwu do antygenów nowotworowych (*ang. tumor associated antigens, TAA*). Ich zaletą w działaniu jest także fakt, że w porównaniu z scFv, mogą rozpoznawać i wiązać antygeny nie tylko o podobnej swoistości, ale także o rozpuszczalności i stabilności ^[7, 29, 30]. scFv bierze udział w rozpoznawaniu i wiązaniu specyficznych antygenów związanych z nowotworem (TAA), natomiast wewnątrzkomórkowy region sygnalizacyjny stymuluje proliferację i różnicowanie się limfocytów T. Taka komplementarność działania umożliwia pominięcie prezentacji antygeny głównemu kompleksowi zgodności tkankowej, a także pozwala antygenom TAA na bezpośrednią aktywację limfocytów T, które będą uczestniczyć w przeciwnowotworowej odpowiedzi komórkowej ^[29]. Domena transbłonowa tworzona jest przez cząsteczki CD28 i CD8, dzięki którym wpływa na

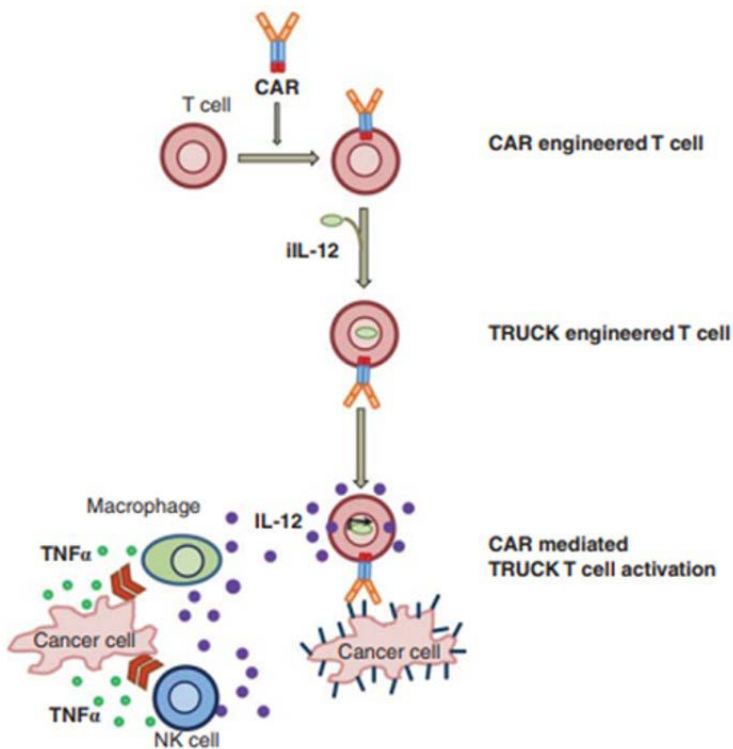
stabilność receptora, a także ma zdolność do oddziaływania na interakcje molekularne zachodzące między receptorami CAR. Interakcja ta możliwa jest dzięki przezbłonowym wiązaniom endogennym oryginalnego białka receptorów, co pozwala nawet na otrzymywanie homodimerów czy trymerów [25, 31, 32]. Region aktywacji wewnątrzkomórkowej, tworzący endodomenę, składa się z 2 typów regionów: kostymulujących i wytwarzających sygnał [29]. Wewnątrzkomórkowe regiony kostymulujące stanowią cząsteczki CD28 i 4-1BB, ale także CD27, OX40 czy ICOS [33-35]. Istnieje zależność między obecnością danej cząsteczki w endodomenie a dynamiką działania komórki CAR-T. Dla przykładu komórki z CD28 wykazują szybszą ekspansję przy mniejszej trwałości, podczas gdy CAR-T z 4-1BB wykazują dłuższą trwałość przy wolniejszej ekspansji [36, 37]. Najbardziej dystalną część wewnątrzkomórkową receptora CAR stanowi cząsteczka CD3- ζ (CD247), która stanowi region sygnałowym z 3 immunoreceptorowymi motywami aktywacji opartymi na tyrozynie (*ang. immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM*) [38]. Fosforylacja ITAM zapoczątkowuje poprzez kinazę białkową ZAP70 szlak sygnałowy, który stymuluje aktywowane limfocyty T m.in. do proliferacji czy wydzielania cytokin [28].

2.2. Ewolucja i generacje struktur receptora CAR

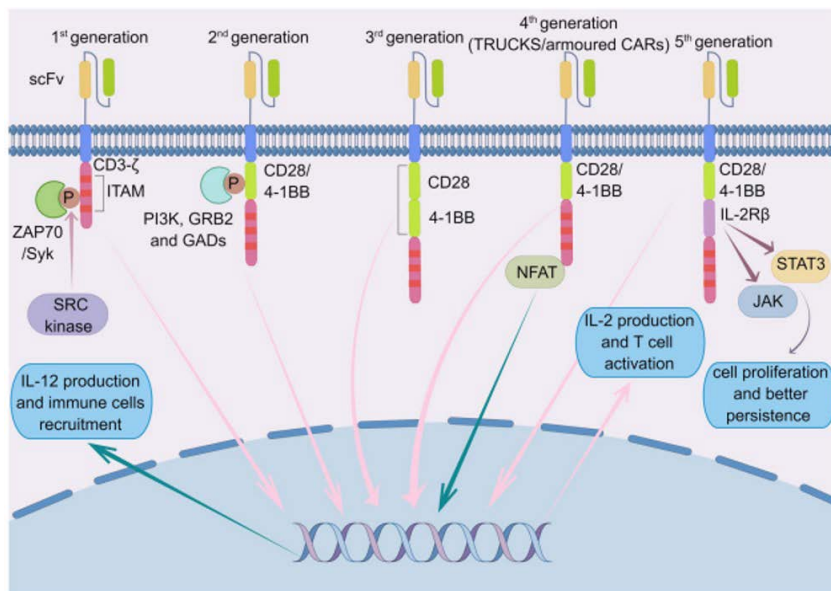
Pierwsza oryginalna generacja receptora CAR posiadała w domenie wewnątrzkomórkowej tylko cząsteczkę sygnałową CD3- ζ lub Fc ϵ RI γ . Struktura ta jest typową cechą pierwszej generacji CAR i stanowi pierwotny przekaznik sygnału z receptora limfocytów T (TCR) [5, 6]. Generacja ta wykazała skuteczność i efektywność w swoistym rozpoznawaniu antygenów komórek nowotworowych, a także w usprawnieniu aktywności limfocytów T w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Mimo to komórki CAR-T tej generacji nie były zdolne do wytwarzania odpowiedniej ilości interleukiny 2 (IL-2), dlatego dla otrzymania pożądanego efektu terapii oraz zniszczenia komórek nowotworowych koniecznym było podawania IL-2 z egzogenego źródła. Oprócz tego brak sygnalizacji kostymulującej, np. przy pomocy cząsteczki CD27, CD28 czy 4-1BB, również wpływał na niską zdolność do proliferacji pierwotnych komórek CAR-T, co skutkowało niewielką efektywnością terapii [39, 40]. W drugiej generacji receptora CAR zastosowano już wewnątrzkomórkowe domeny sygnałowe z różnych receptorów białkowych, aby zapewnić komórkom CAR-T sygnały stymulujące, niezbędne do ich aktywacji. Region kostymulujący domeny wewnątrzkomórkowej (CD28, 4-1BB, CD134) został

połączony z cząsteczką CD3- ζ , co pozwoliło na uzyskanie lepszych wyników w proliferacji i cytotoksyczności komórek CAR-T ^[41]. Kostymulacja przy pomocy cząsteczki CD28 odgrywa kluczową rolę w stymulacji i proliferacji limfocytów, a także ma bardzo duże znaczenie w tworzeniu komórek pamięci. Z kolei cząsteczka CD137 może nie tylko wzmacniać proliferację limfocytów, ale także produkcję IL-2. Natomiast cząsteczka CD137 (4-1BB) wykazuje pozytywną rolę w utrzymywaniu odpowiedzi limfocytów T, co ma duże znaczenie dla ich przeżycia ^[42-45]. W trzeciej generacji receptorów CAR zastosowano połączenia domen kostymulujących, np. CD3 ζ -CD28-OX40 czy CD3 ζ -CD28-41BB. Celem takiej integracji cząsteczek było uzyskanie lepszych efektów terapii poprzez większą zdolność do niszczenia komórek nowotworowych, a także wzmoczonego wydzielania cytokin ^[46]. Czwarta generacja została stworzona do uzyskania przez komórki jeszcze skuteczniejszej zdolności atakowania i niszczenia komórek nowotworowych. W tym celu wytworzono komórki CART-T na bazie połączenia struktury drugiej generacji tych komórek z IL-12, które znane są jako limfocyty T przekierowane do uniwersalnego zabijania za pośrednictwem cytokin (TRUCKs). Komórki te nie tylko zwiększają aktywację limfocytów T oraz komórek odpornościowych, ale także dostarczają produkt transgeniczny do docelowych komórek nowotworowych ^[47, 48]. W związku z tym komórki CAR-T zostały dodatkowo zmodyfikowane przy pomocy czynnika jądrowego aktywowanych limfocytów T (NFAT) w celu indukowania ekspresji transgenicznych cytokin. W tym przypadku IL-12 jest indukowana po rozpoznaniu przez CAR antygeny TAA w celu proliferacji innych komórek układu odpornościowego. Uwalnianie ważnych cytokin, w tym IL-12, umożliwiło czwartej generacji receptora CAR lepszą aktywację komórek T, a także modulację środowiska immunologicznego i mikrośrodowiska guza oraz zaangażowanie do odpowiedzi przeciwnowotworowej komórek układu odpornościowego, które nie są rozpoznawane przez komórki CAR-T ^[9, 47, 49]. Działanie TRUCKs zostało przedstawione na rycinie 3.

Piąta generacja receptorów CAR oparta jest na strukturze drugiej generacji, gdzie obecna jest skrócona domena łańcucha β cytoplazmatycznego receptora interleukiny 2 oraz ugrupowanie wiążące STAT3. Działanie komórek CAR-T tej generacji oparte jest na promowaniu receptora TCR oraz obecności sygnału JAK-STAT, dzięki działaniu odpowiednich cytokin, co umożliwia zwiększenie proliferacji i aktywacji komórek T ^[50]. W celu podsumowania, na rycinie nr 4 zostały zestawione struktury wspomnianych pięciu generacji receptora CAR.



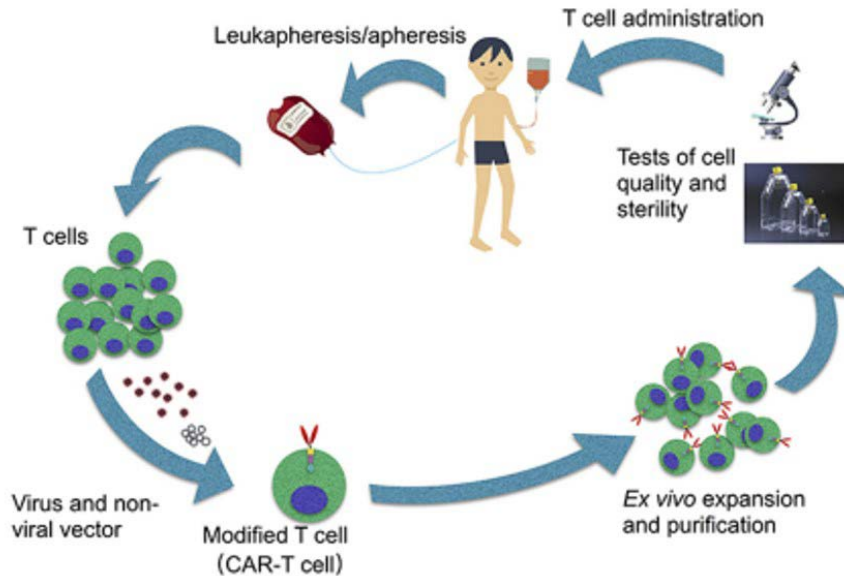
Rycina 2. Działanie komórek CAR-T czwartej generacji (TRUCK) przeciw komórkom nowotworowym [49].



Rycina 3. Rycina przedstawiająca struktury 5 generacji receptora CAR [29].

2.3. Inżynieria i produkcja komórek CAR-T dla immunoterapii nowotworów

Aby wytworzone komórki CAR-T mogły zostać podane chorym w celach terapeutycznych, muszą one przejść wiele procesów badawczych i badań klinicznych pod kontrolą odpowiednich specjalistów [8]. W pierwszym etapie uzyskuje się leukocyty z krwi obwodowej pacjenta lub dawcy drogą flebotomii lub leukaferazy, a następnie w procesie aferezy od pobranych leukocytów zostają oddzielone limfocyty T [51]. W procesie tym nie stosuje się czynnika stymulującego kolonie granulocytów (*ang. granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF*), ze względu na to, iż może wpływać niekorzystnie na procesy proliferacji i aktywacji limfocytów T [52]. Aby wprowadzić obcy gen do ludzkich komórek stosowane są metody z użyciem wektorów wirusowych i niewirusowych, dzięki którym możliwa jest eliminacja ekspresji białek HLA klasy I oraz II w przypadku komórek T pochodzenia allogenicznego i zmniejszenie ryzyka odrzucenia przez układ odpornościowy pacjenta [17, 53]. Odpowiednio wyodrębnione limfocyty T są w ten sposób transfekowane wektorem (najczęściej wirusowym w przypadku komórek CAR-T), który kieruje RNA na drogę odwrotnej transkrypcji, w celu uzyskania DNA koniecznego do trwałej integracji z genomem komórek pacjenta. W badaniach klinicznych nad terapiami genowymi w głównej mierze wykorzystuje się wirusy, ze względu na krótki czas potrzebny do uzyskania niezbędnej ilości hodowanych limfocytów T [25]. Należą do nich m.in. retrowirusy γ i wirusy lentiwirusowe [9, 54, 55]. Kolejnym ważnym krokiem w wytwarzaniu komórek CAR-T jest proliferacja i oczyszczanie limfocytów T *ex vivo*. Otrzymanie odpowiedniej ilości komórek w tym etapie świadczy o skuteczności tej immunoterapii. W następnej kolejności uzyskane komórki są poddawane testom jakości i sterylności [52, 56, 57]. W immunoterapii CAR-T ważne jest, aby u pacjenta wykonać leczenie kondycjonujące, czyli wcześniejsze leczenie chemioterapeutyczne, przygotowujące pacjenta do podania komórek CAR-T, w celu eliminacji regulatorowych limfocytów T (Treg) i komórek supresorowych pochodzenia szpikowego. Ponadto pozwala ono na wydzielanie cytokin homeostatycznych, jak IL-2, IL-7 czy IL-15, a także indukcję cząsteczek kostymulujących i obniżenie stężenia 2,3-dioksygenazy idoloaminy, co pozwala na lepszą proliferację i ekspansję limfocytów T [58]. Na rycinie nr 5 zestawiono wszystkie etapy inżynierii komórek dla terapii CAR-T.



Rycina 4. Schemat całej procedury wytwarzania komórek CAR-T [59].

3. Podsumowanie

Podsumowując powyższy rozdział, nie ulega wątpliwości, że terapia CAR-T jest bardzo innowacyjną metodą, która jest w stanie odmienić obecne formy terapii stosowane w medycynie. Jest to terapia, która łączy wiedzę z zakresu wielu dziedzin, jakimi są m.in. immunologia, onkologia, hematologia czy bioinżynieria medyczna. Swoje działanie i skuteczność opiera na zsyntezowanym, chimerycznym receptorze antygenowym (CAR), połączonym z odpowiednio zmodyfikowanym limfocytom T, którego rolą jest udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej układu odpornościowego. Jednak wytworzone komórki CAR-T wcześniej muszą zostać poddane wielu procesom i badaniom, aby w bezpieczny sposób mogły zostać podane chorym w odpowiednich terapiach. Dzięki wielu badaniom klinicznym terapia ta jest obecnie dopuszczona do leczenia nowotworów hematologicznych, jednak jej szybko postępujący rozwój oraz ogromna liczba prowadzonych dalszych badań daje szansę na zastosowanie jej na o wiele szerszym obszarze medycyny.

Referencje

- [1] Miao, L., et al., A Bibliometric and Knowledge-Map Analysis of CAR-T Cells From 2009 to 2021. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 840956.
- [2] Rothstein, T.L., et al., Cytotoxic T lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography. *J Immunol*, 1978. 121(5): p. 1652-6.
- [3] Martz, E., Multiple target cell killing by the cytolytic T lymphocyte and the mechanism of cytotoxicity. *Transplantation*, 1976. 21(1): p. 5-11.
- [4] Topalian, S.L., et al., Expansion of human tumor infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials. *J Immunol Methods*, 1987. 102(1): p. 127-41.
- [5] Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar, Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(24): p. 10024-8.
- [6] Eshhar, Z., et al., Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(2): p. 720-4.
- [7] Bao, C., et al., The Application of Nanobody in CAR-T Therapy. *Biomolecules*, 2021. 11(2).
- [8] Ewa Wrona, P.P., *Nowoczesna immunoterapia nowotworów — historia terapii komórkami CAR-T*. 2019.
- [9] Han, D., et al., Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Hematological Malignancies. *J Cancer*, 2021. 12(2): p. 326-334.
- [10] Amelia Kierasinińska, D.C., Marta Węgierska, Ewelina Stoczyńska-Fidelus, Piotr Rieske, *Terapia CAR-T w onkologii i w innych dziedzinach medycyny*. 2021.
- [11] June, C.H., et al., CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018. 359(6382): p. 1361-1365.

- [12] Kochenderfer, J.N., et al., Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 2010. 116(20): p. 4099-102.
- [13] Sommermeyer, D., et al., Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy. *Leukemia*, 2017. 31(10): p. 2191-2199.
- [14] Stephen J. Schuster, M.R.B., Constantine S. Tam et al., Primary Analysis of Juliet: A Global, Pivotal, Phase 2 Trial of CTL019 in Adult Patients with Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. 2017.
- [15] Schuster, S.J., et al., Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 2019. 380(1): p. 45-56.
- [16] Yan, W., et al., Application of Chimeric Antigen Receptor T Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *Biomed Res Int*, 2020. 2020: p. 4241864.
- [17] Jogalekar, M.P., et al., CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: new perspectives, challenges, and clinical developments. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 925985.
- [18] Ma, S., et al., Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci*, 2019. 15(12): p. 2548-2560.
- [19] Qin, X., et al., Recent advances in CAR-T cells therapy for colorectal cancer. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 904137.
- [20] Styczyński J., A brief history of CAR-T cells: from laboratory to the bedside, *Acta Haematologica Polonica*, 51(1), March 2020, 2–5, doi: 10.2478/ahp-2020-0002
- [21] Sadelain, M., I. Riviere, and R. Brentjens, Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(1): p. 35-45.
- [22] Almasbak, H., et al., Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model. *Gene Ther*, 2015. 22(5): p. 391-403.

- [23] Hudecek, M., et al., The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res*, 2015. 3(2): p. 125-35.
- [24] Jonnalagadda, M., et al., Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol Ther*, 2015. 23(4): p. 757-68.
- [25] Zhang, C., et al., Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*, 2017. 5: p. 22.
- [26] Lorentzen, C.L. and P.T. Straten, CD19-Chimeric Antigen Receptor T Cells for Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia and Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Scand J Immunol*, 2015. 82(4): p. 307-19.
- [27] Katarzyna Karwicka, J.W., Olga Czabak, Janusz Kocki, Marek Hus, Innowacyjna terapia CAR-T w leczeniu nowotworów hematologicznych — wybrane aspekty genetyczne i immunologiczne. 2020.
- [28] Ramello, M.C., et al., An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome. *Sci Signal*, 2019. 12(568).
- [29] Jiang, J.L.a.G., The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. 2022.
- [30] Muyldermans, S., Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*, 2013. 82: p. 775-97.
- [31] Brudno, J.N., et al., Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nat Med*, 2020. 26(2): p. 270-280.
- [32] Bridgeman, J.S., et al., The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J Immunol*, 2010. 184(12): p. 6938-49.
- [33] Pule, M.A., et al., A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther*, 2005. 12(5): p. 933-41.

- [34] Song, D.G., et al., CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood*, 2012. 119(3): p. 696-706.
- [35] Guedan, S., et al., ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood*, 2014. 124(7): p. 1070-80.
- [36] Neelapu, S.S., et al., Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 2017. 377(26): p. 2531-2544.
- [37] Maude, S.L., et al., Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 2018. 378(5): p. 439-448.
- [38] Feucht, J., et al., Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Nat Med*, 2019. 25(1): p. 82-88.
- [39] Heuser, C., et al., T-cell activation by recombinant immunoreceptors: impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells. *Gene Ther*, 2003. 10(17): p. 1408-19.
- [40] Brocker, T., Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*, 2000. 96(5): p. 1999-2001.
- [41] Bretscher, P.A., A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(1): p. 185-90.
- [42] Acuto, O. and F. Michel, CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(12): p. 939-51.
- [43] Finney, H.M., A.N. Akbar, and A.D. Lawson, Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol*, 2004. 172(1): p. 104-13.
- [44] Croft, M., The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(4): p. 271-85.

- [45] Frigault, M.J., et al., Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol Res*, 2015. 3(4): p. 356-67.
- [46] Marin, V., et al., Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica*, 2010. 95(12): p. 2144-52.
- [47] Chmielewski, M., et al., IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res*, 2011. 71(17): p. 5697-706.
- [48] Zhang, L., et al., Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther*, 2011. 19(4): p. 751-9.
- [49] Chmielewski, M. and H. Abken, TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. 15(8): p. 1145-54.
- [50] Kagoya, Y., et al., A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*, 2018. 24(3): p. 352-359.
- [51] Lee, G. and G.M. Arepally, Anticoagulation techniques in apheresis: from heparin to citrate and beyond. *J Clin Apher*, 2012. 27(3): p. 117-25.
- [52] Maus, M.V. and B.L. Levine, Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist. *Oncologist*, 2016. 21(5): p. 608-17.
- [53] Kagoya, Y., et al., Genetic Ablation of HLA Class I, Class II, and the T-cell Receptor Enables Allogeneic T Cells to Be Used for Adoptive T-cell Therapy. *Cancer Immunol Res*, 2020. 8(7): p. 926-936.
- [54] Sadelain, M., CD19 CAR T Cells. *Cell*, 2017. 171(7): p. 1471.
- [55] Hu, W.S. and V.K. Pathak, Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(4): p. 493-511.

- [56] Tanaka, J., M. Mielcarek, and B. Torok-Storb, Impaired induction of the CD28-responsive complex in granulocyte colony-stimulating factor mobilized CD4 T cells. *Blood*, 1998. 91(1): p. 347-52.
- [57] Shank, B.R., et al., Chimeric Antigen Receptor T Cells in Hematologic Malignancies. *Pharmacotherapy*, 2017. 37(3): p. 334-345.
- [58] Neelapu, S.S., CAR-T efficacy: is conditioning the key? *Blood*, 2019. 133(17): p. 1799-1800.
- [59] Zhao, Z., et al., The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharm Sin B*, 2018. 8(4): p. 539-551.

Mechanizm działania terapii CAR-T oraz jej zastosowanie w leczeniu nowotworów hematologicznych

Lidia Ziętek¹, Robert Kasza¹, Michał Janik¹, Jakub Staniszewski¹, Maciej Koźlik²

1. Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religi
przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Klinika Kardiologii i Chorób Strukturalnych Serca, Śląski Uniwersytet Medyczny

Abstrakt: Nowotwory, a szczególnie te złośliwe wciąż stanowią wyzwanie dla ciągle rozwijającej się terapii onkologicznej. Chemioterapia, radioterapia czy nawet leczenie chirurgiczne nadal nie zawsze jest skuteczne i daje możliwość wyleczenia pacjenta. W wyniku tego zaistniała potrzeba stworzenia nowej formy terapii, co zaowocowało rozwojem terapii komórkowej. W wielu badaniach dały one satysfakcjonujące wyniki, co pozwoliło na ich dalszy rozwój i poszerzenie zakresu ich zastosowania. Terapia CAR-T wykorzystująca specjalnie zmodyfikowane limfocyty T i chimeryczne receptory antygenowe (ang. chimeric antigen receptor, CAR) od wielu lat jest obiektem badań w immuno-onkologii. Wykazała się ona bardzo dużą skutecznością i efektywnością w terapii chorych na nowotwory hematologiczne. Te przełomowe wyniki pozwoliły na wprowadzenia i zatwierdzenia terapii CAR-T jako metody terapeutycznej m.in. w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej. Celem poniższej pracy jest przedstawienie mechanizmu działania komórek CAR-T w opisywanej terapii oraz przedstawienie aktualnych badań i doniesień o jej zastosowaniu w poszczególnych nowotworach hematologicznych. Oprócz wspomnianych zagadnień, prowadzona jest obecnie także ogromna liczba innych badań, których celem jest poszerzenie zakresu działalności i wykorzystania terapii CAR-T.

Słowa kluczowe: terapia CAR-T, nowotwory, onkologia

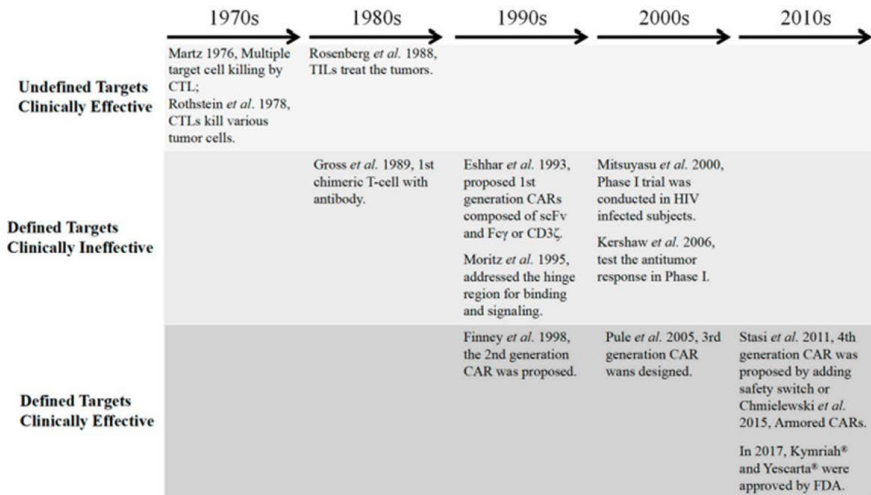
Abstract: Cancers, especially malignant ones, are still a challenge for the ever-developing oncological therapy. Chemotherapy, radiotherapy or even surgical treatment is still not always effective and gives the possibility of curing the patient. As a result, there was a need to create a new form of therapy, which resulted in the development of cell therapy. In many studies, they gave satisfactory results, which allowed for their further development and broadening the scope of their application. CAR-T therapy using specially modified these lymphocytes and chimeric antigen receptors (CAR) has been the subject of research in immuno-oncology for many years. It has proven to be very effective and effective in the treatment of patients with hematological malignancies. These groundbreaking results allowed the introduction and approval of

CAR-T therapy as a therapeutic method, e.g. in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. The aim of this paper is to present the mechanism of action of CAR-T cells in the described therapy and to present current research and reports on its use in individual hematological malignancies. In addition to the issues mentioned, a huge number of other studies are currently being conducted, the aim of which is to expand the scope of activity and use of CAR-T therapy.

Keywords: CAR-T therapy, cancer, oncology

1. Wprowadzenie

Badania kliniczne nad zastosowaniem immunoterapii w leczeniu nowotworów prowadzone są od kilkudziesięciu lat. Pojawienie się terapii CAR-T w świecie medycyny klinicznej oraz jej ogromny postęp w ostatnim czasie dokonał dużego przełomu w leczeniu pacjentów onkologicznych. Immunoterapia ta opiera się na zastosowaniu chimerycznego receptora antygenowego (*ang. chimeric antigen receptor, CAR*), który przyłączony jest do specjalnie zmodyfikowanego limfocyta T, którego jednymi z ważniejszych ról są udział w odpornościowej odpowiedzi przeciwnowotworowej i wywieranie efektu cytotoksycznego^[1,2]. Pierwszy projekt, dotyczący ekspresji i konstrukcji genów chimerycznych, stanowiących podstawę do stworzenia pierwszej generacji komórek CAR-T pojawił się w 1993 roku^[3]. Do tej pory terapia CAR-T uległa dużemu postępowi, m.in. zaprojektowano 5 generacji komórek CAR-T^[4]. Na rycinie 1. zestawiono poszczególne etapy w rozwoju immunoterapii komórkowej CAR-T^[1]. Rok 2017 był rokiem przełomowym dla immunonkologii, ponieważ terapia CAR-T została wtedy po raz pierwszy zatwierdzona przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*ang. Food and Drug Administration, FDA*) i dopuszczona do leczenia chorych do 25. roku życia z ostrą białaczką limfoblastyczną (*ang. acute lymphoblastic leukemia, ALL*) oraz dorosłych z zaawansowaną postacią chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (*ang. diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL*)^[5-9]. Obecnie terapia CAR-T została dopuszczona tylko w leczeniu pacjentów z nowotworami hematologicznymi, gdzie wykazała się największą do tej pory efektywnością^[10]. Jednak immunoterapia ta ulega dalszemu rozwojowi, ponieważ obecnie prowadzone są także wielokierunkowe badania kliniczne nad zastosowaniem terapii CAR-T w leczeniu m.in. guzów litych^[11], w tym guzach mózgu^[12] czy raka jelita grubego^[13].



Rycina 1. Zestawienie poszczególnych etapów w historii rozwoju immunoterapii komórkowej CAR-T [1].

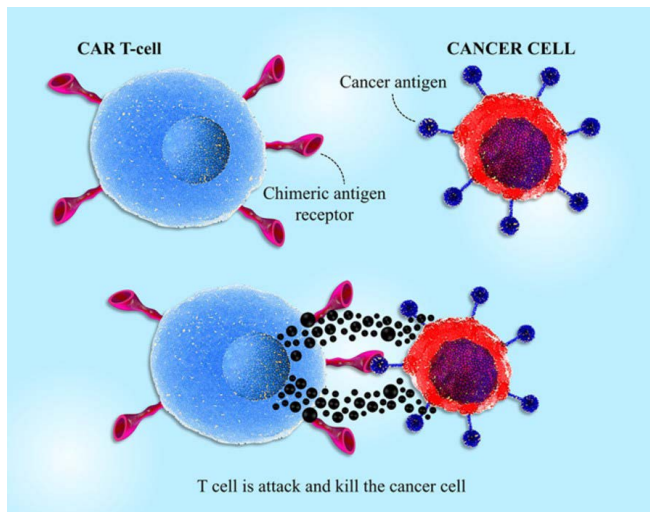
2. Mechanizm działania terapii CAR-T

Immunoterapia nowotworów polega na odpowiednim rozpoznawaniu i eliminowaniu komórek nowotworowych przez układ odpornościowy organizmu, gdzie główną rolę odgrywają limfocyty T i ich zdolność do atakowania i niszczenia patogennych komórek. Aktywność limfocytów T w reakcji jest zależna od struktury TCR i prezentacji MHC w celu identyfikacji swoistych antygenów, które ulegają ekspresji w komórkach nowotworowych, natomiast komórki CAR-T zależą tylko od zmodyfikowanej struktury CAR, ponieważ działają niezależnie od MHC.

Stosowane w immunoterapii komórki CAR-T opierają się na chimericznych, zaprojektowanych receptorach CAR, które charakteryzują się swoistością antygeny i cytotoksycznością limfocytów T [14]. Częsteczki takie jak CD19, CD20, CD22, CD23 czy ROR1 są zwykle częsteczkami docelowymi dla nowotworów hematologicznych, dlatego właśnie stanowią również grupę częsteczek docelowych dla komórek CAR-T w immunoterapii poszczególnych chorób [15-19].

CD19 to najczęstszy cel w większości nowotworów złośliwych limfocytów B, natomiast częsteczka CD33 jest najbardziej pożądanym celem w białaczce, a zwłaszcza w ostrej białaczce szpikowej [15, 20]. Rozpoznanie przez komórki CAR-T specyficznych antygenów związanych z nowotworem powoduje fosforylację motywów ITAM, która inicjuje proliferację limfocytów T i uwalnianie odpowiednich cytokin, w celu wzmocnienia odpowiedzi

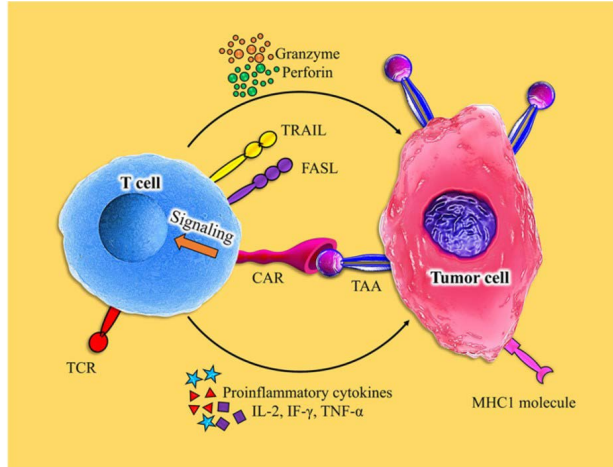
przeciwnowotworowej ^[14, 4]. Na rycinie 2. przedstawiono działanie przeciwnowotworowe limfocytów T poprzez chimeryczne receptory antygeny.



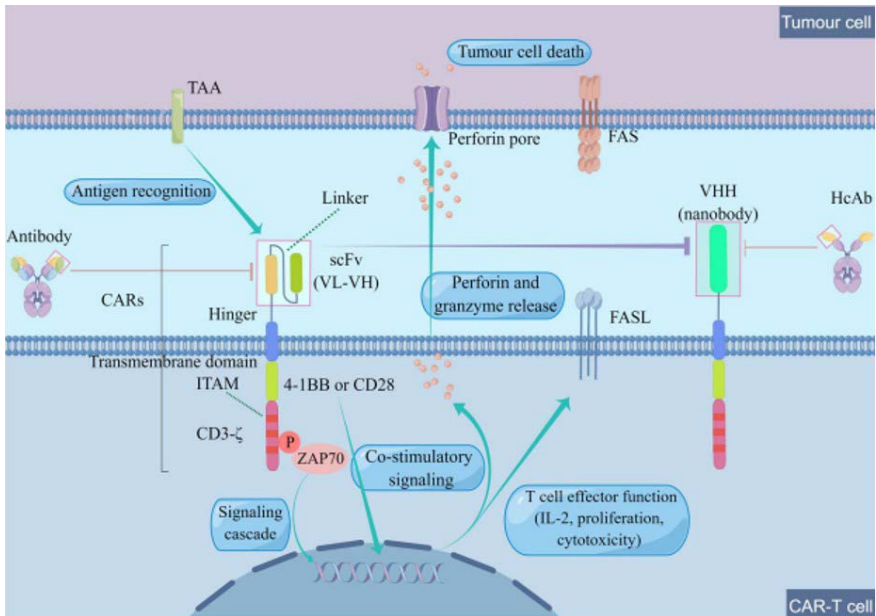
Rycina 2. Przedstawienie działalności komórek CAR-T w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Komórki te wykrywają komórki nowotworowe, wiążąc swoje receptory CAR z antygenami związanymi z nowotworem (*ang. tumor associated antigens, TAA*) niezależnie od interakcji między receptorami TCR a głównym układem zgodności tkankowej ^[21].

Główną rolę w eliminacji komórek nowotworowych odgrywają komórki CAR-T CD8+, natomiast komórki CAR-T CD4+ mogą pełnić funkcję pomocniczą w tej reakcji immunologicznej ^[14]. Działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek docelowych polega na wydzielaniu granzymów i perforyn przez komórki CAR-T, w wyniku działania odpowiednich cytokin ^[22]. Inną drogą, umożliwiającą eliminację komórek nowotworowych, jest indukowanie szlaku sygnałowego apoptozy w komórkach chorobotwórczych, w tym stymulację agonisty śmierci czyli białko proapoptycznego BID oraz białka domeny śmierci związane z FAS (FADD) ^[23,24]. Na rycinie 3. przedstawiono m.in. wspomniane wyżej mechanizmy działania cytotoksycznego komórek CAR-T.

Na rycinie 4. podsumowano wszystkie wyżej wymienione mechanizmy, co pozwala zwizualizować, na czym polega oraz w jaki sposób działa terapia CAR-T.



Rycina 3. Rycina przedstawiająca mechanizmy cytotoksyczne w działaniu przeciwnowotworowym komórek CAR-T^[21].

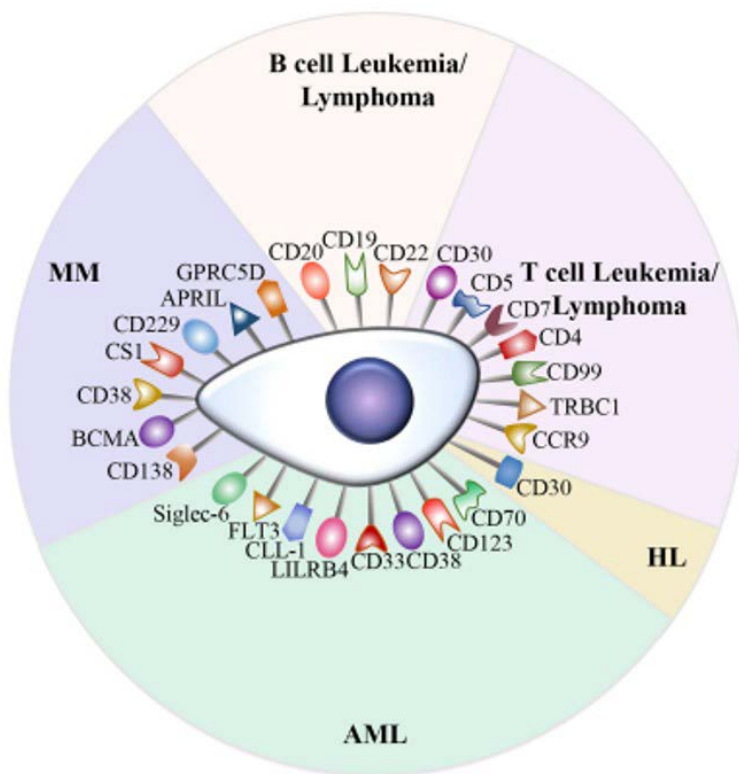


Rycina 4. Schemat mechanizmu działania terapii CAR-T^[4].

3. Terapia CAR-T w nowotworach hematologicznych

Nowotwory hematologiczne to nowotwory atakujące układ krwiotwórczy i powstające w wyniku proliferacji nieprawidłowych, patogennych komórek krwi. W przeciągu ostatnich 15 lat powstało wiele artykułów naukowych, donoszących o tym, że terapie CAR-T w leczeniu nowotworów

hematologicznych dają optymistyczną perspektywę dla chorych [25-27]. Komórki T transdukowane anty-CD19-CAR, zastosowane w jednym z badań, okazały się bardzo obiecujące w poprawie terapii nowotworów złośliwych z komórek B, dzięki swojej dużej zdolności do eliminacji komórek CD19 (+) in vivo” [28]. Oprócz tego coraz częściej celem dla komórek CAR-T w leczeniu nowotworów hematologicznych jest antygen dojrzewania komórek B (*ang. B-cell maturation antigen, BCMA*) [29]. Na rycinie 5. przedstawiono cząsteczki antygenowe, stanowiące potencjalne cele dla komórek CAR-T w immunoterapii nowotworów hematologicznych [29].



Rycina 5. Zestawienie cząsteczek antygenowych obecnych na komórkach w nowotworach hematologicznych, stanowiących potencjalny cel dla terapii CAR-T [29].

3.1. Terapia CAR-T w ostrej białaczce limfoblastycznej

Na dzień dzisiejszy to właśnie terapia komórkami CAR-T wykazuje dużą skuteczność w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej (*ang. acute lymphoblastic leukemia, ALL*) [30]. W leczeniu ALL tą dużą efektywnością wykazały się

komórki anty-CD19 CAR-T. W latach 2013-2015 opublikowano raporty z danymi z badań klinicznych, w których przebadano wśród 67 pacjentów chorujących na ALL, w tym 45 dzieci i osób w młodym wieku, działanie komórek CAR-T skierowane przeciw cząsteczkom CD19, które charakteryzują się wysoką ekspresją w tym nowotworze [31-35]. We wszystkich wynikach tych prób liczba pacjentów z remisją (CR) lub częściową remisją (PR) była wysoka.

W pierwszym badaniu leczono 16 pacjentów autologicznymi komórkami T, które wykazywały ekspresję receptora CAR 19-28z, specyficznego dla antygeny CD19. U chorych dokonano infuzji komórek T CAR 19-28z po chemioterapii ratunkowej. Zastosowany wlew zwiększył w znacznym stopniu ogólny wskaźnik całkowitej odpowiedzi do 88%, na który składali się zarówno z pacjenci z całkowitą remisją (CR), jak i CR z niepełną regeneracją hematologiczną (CRi). Wynik ten okazał się być wyższy, niż jakiego się spodziewano w przypadku samej chemioterapii ratunkowej [31].

W kolejnym badaniu terapią objęto 5 dorosłych pacjentów z nawrotem choroby. Chorzy z uporczywą chorobą morfologiczną lub chorobą MRD (*ang. minimal residual disease, MRD*) zostali poddani infuzji limfocytów T, po której ich wyniki wskazywały na szybką eradykację guza. U pacjentów, na podstawie reakcji łańcuchowej polimerazy z głębokim sekwencjonowaniem, stwierdzono również całkowitą remisję MRD(-), a wyniki te potwierdzają wyraźną skuteczność przeciwnowotworową limfocytów T zmodyfikowanych 19-28z CAR u pacjentów z nawrotową bądź oporną B-ALL [32].

W kolejnym raporcie również uzyskano remisję choroby aż u 90% procent pacjentów [33]. W jednym z badań dowiedziono, że zmodyfikowane komórki CAR-T są zdolne do zabijania nawet agresywnych oraz opornych na leczenie komórek ostrej białaczki *in vivo* [34].

Skuteczność i efektywność terapii CAR-T doprowadziła do tego, że 31. sierpnia 2017 roku Agencja Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła pierwszą terapię komórkami CAR-T anty-CD19 pod nazwą Tisagenlecleucel, który została wskazana do leczenia nawracającej/opornej na leczenie ostrej białaczki limfoblastycznej z prekursorów linii limfocytów B (*ang. precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL*) u chorych poniżej 25. roku życia [36].

3.2. Terapia CAR-T w przewlekłej białaczce limfocytowej

Przewlekła białaczka limfocytowa (*ang. chronic lymphocytic leukemia, CLL*) to najczęściej rozpoznawany typ białaczki u dorosłych, a przebieg

kliniczny u chorych jest bardzo różnorodny. „Według aktualnych wytycznych definiuje się ją jako monoklonalną limfocytosę B-komórkową, trwającą co najmniej 3 miesiące, o wartości powyżej 5×10^9 /L lub bez względu na wysokość limfocytosy w przypadku obecności cytopenii we krwi obwodowej wtórnej do zajęcia szpiku” [37]. Aktualnie w leczeniu chorych na CLL stosuje się allogeniczny przeszczep komórek macierzystych połączony z chemioterapią lub radioterapią [38].

W ciągu ostatnich lat rozpoczęto wiele badań nad zastosowaniem terapii CAR-T u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową [26, 39-41]. Niestety, wskaźniki odpowiedzi na terapię i remisji nowotworu nie są tak obiecujące, jak w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej [42].

W przeprowadzonym w 2015 roku badaniu klinicznym terapii komórkami T skierowanymi przeciwko CD19 pozytywny wynik zaobserwowano u 57% pacjentów, z czego trwale odpowiedzi przeciwnowotworowe występowały tylko u 26 %. Niższa skuteczność tej terapii w CLL, w porównaniu jej zastosowania w ALL, związane jest z patogenezą CLL, która przyczynia się do powstawania wczesnych niedoborów odporności o podłożu komórkowym lub humoralnych u chorych [41, 43].

Obecnie próbuje się ograniczyć negatywny wpływ na komórki CAR-T w tej terapii, a nawet wzmocnić ich zdolność do eliminacji komórek nowotworowych przez zastosowanie ibrutynibu, nieodwracalnego inhibitora kinazy tyrozynowej Brutona, który hamuje proliferację limfocytów B. W raporcie badania klinicznego z 2016 roku wykazano, że wprowadzenie ibrutynibu do terapii komórkami CAR-T może zwiększyć skuteczność tej immunoterapii i wzmocnić funkcję komórek CAR-T w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej [44].

3.3. Terapia CAR-T w chłoniaku Hodgkina

Chłoniak Hodgkina jest jednym z rzadszych nowotworów hematologicznych. Choroba ta cechuje się obecnością komórek nowotworowych Hodgkina i Reeda-Sternberga, które wykazują wysoką ekspresję markera powierzchniowego CD30, który ulega także ekspresji na powierzchni prawidłowych komórek, jednak na znacznie niższym poziomie [45]. Aż u 80% pacjentów chemioterapia i radioterapia są skutecznymi metodami terapeutycznymi, jednak część chorych posiada pierwotną oporność lub może u nich wystąpić nawrót choroby, nawet po zastosowaniu chemioterapii w dużych dawkach czy autologicznym przeszczepie komórek macierzystych [46].

W związku z tym zaistniała potrzeba stworzenia alternatywnej terapii dla chorych. Badania kliniczne nad zastosowaniem terapii CAR-T w chłoniaku Hodgkina były prowadzone już w 1999 roku i wykazały, że skierowanie komórek CAR-T przeciwko CD30 odpowiadało trwałą odpowiedzią przeciwnowotworową, co stwarza dodatkową strategię w leczeniu chłoniaka Hodgkina jako immunoterapia komórkowa ^[47].

W 2017 ukazał się również raport z badania klinicznego, w którym oceniano bezpieczeństwo oraz skuteczność komórek CAR-T u pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie chłoniakiem Hodgkina ^[48]. W badaniu tym 18 pacjentów zostało poddanych chemioterapii, w ramach leczenia kondycjonującego, a następnie infuzji komórek CAR-T skierowanym przeciwko CD30. Wnioski i rezultaty tego badania sugerują, że terapia jest bezpieczna i skuteczna w leczeniu tego nowotworu, a także dają optymistyczną perspektywę na leczenie większej ilości chorych, również tych we wczesnym stadium choroby, co może ograniczyć toksyczność chemioterapii ^[48].

Obecnie istnieje także zatwierdzony przez FDA produkt pod nazwą brentuksymab vedotin, stanowiący połączenie leku i przeciwciała ukierunkowanego na cząsteczkę CD30, które wykazuje skuteczność kliniczną w leczeniu tego nowotworu ^[49].

3.4. Terapia CAR-T w szpiczaku mnogim

Szpiczak mnogi (*ang. myeloma multiplex, MM*) jest trudnym w leczeniu nowotworem hematologicznym, charakteryzujący się proliferacją atypowych plazmacytów w szpiku kostnym, co w konsekwencji przyczynia się do powstawania niedokrwistości, zaburzeń układu immunologicznego czy zmian w kościach. Niestety pomimo postępów w leczeniu, nowotwór ten pozostaje w większości przypadków nieuleczalny.

Wraz z rozwojem terapii CAR-T w leczeniu nowotworów hematologicznych powstała nadzieja, że może również być skuteczna klinicznie w leczeniu szpiczaka. Mimo wszystko terapia komórkami CAR-T skierowana przeciwko cząsteczkom CD19 nie okazała się na tyle skuteczna, jak w przypadku innych nowotworów hematologicznych ^[50-52]. W związku z tym rozpoczęto badania nad celowaniem komórek CAR-T w kierunku innych antygenów powierzchniowych limfocytów B.

Prowadzono badania w stosunku do cząsteczki CD138 obecnej na powierzchni komórek plazmatycznych, która wykazała się odpornością przeciwnowotworową z tolerowaną toksycznością ^[53]. Przeprowadzono także badanie

kliniczne, w którym skierowano komórki CAR-T przeciwko antygenowi BCMA, który stał się obiecującym celem i nową strategią dla leczenia chorych na MM ^[54]. Wyniki te dają nadzieję i są zachęcające dla dalszych badań nad zastosowaniem tej immunoterapii, a także zmniejszenia jej skutków ubocznych w leczeniu szpiczaka mnogiego.

4. Podsumowanie

Terapia CAR-T to innowacyjna i przyszłościowa metoda terapeutyczna. Jej rozwój i duża ilość badania prowadzonych nad jej zastosowaniem niewątpliwie ma ogromny wkład w postępy w leczeniu pacjentów onkologicznych. Zastosowanie chimerycznego receptora CAR oraz odpowiednie nacelowanie zaprojektowanych komórek dało satysfakcjonujące efekty oraz wykazało się skutecznością m.in. w leczeniu pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną, co zaowocowało możliwością zastosowania ją jako immunoterapii w terapiach onkologicznych poszczególnych chorób krwi. Niewątpliwie jest to forma leczenia, która daje także ogromną nadzieję na wykorzystanie jej na większą skalę, nie tylko w nowotworach hematologicznych. Jednak, aby było to możliwe, potrzebny jest dalszy proces badawczy, który potwierdzi jej bezpieczeństwo i skuteczność oraz zapobiegnie występowaniu działań niepożądanych u chorych w czasie leczenia. Tylko odpowiednio przeprowadzone próby kliniczne pozwolą określić strategię, która pozwoli na zastosowanie tej nowatorskiej metody na szerszą skalę.

Referencje

- [1] Bao, C., et al., *The Application of Nanobody in CAR-T Therapy*. *Biomolecules*, 2021. 11(2).
- [2] Ewa Wrona, P.P., *Nowoczesna immunoterapia nowotworów — historia terapii komórkami CAR-T*. 2019.
- [3] Eshhar, Z., et al., *Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(2): p. 720-4.
- [4] Jiang, J.L.a.G., *The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies*. 2022.

- [5] June, C.H., et al., *CAR T cell immunotherapy for human cancer*. Science, 2018. 359(6382): p. 1361-1365.
- [6] Kochenderfer, J.N., et al., *Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19*. Blood, 2010. 116(20): p. 4099-102.
- [7] Sommermeyer, D., et al., *Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy*. Leukemia, 2017. 31(10): p. 2191-2199.
- [8] Stephen J. Schuster, M.R.B., Constantine S. Tam et al., *Primary Analysis of Juliet: A Global, Pivotal, Phase 2 Trial of CTL019 in Adult Patients with Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. 2017.
- [9] Schuster, S.J., et al., *Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. N Engl J Med, 2019. 380(1): p. 45-56.
- [10] Yan, W., et al., *Application of Chimeric Antigen Receptor T Cells in the Treatment of Hematological Malignancies*. Biomed Res Int, 2020. 2020: p. 4241864.
- [11] Jogalekar, M.P., et al., *CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: new perspectives, challenges, and clinical developments*. Front Immunol, 2022. 13: p. 925985.
- [12] Ma, S., et al., *Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors*. Int J Biol Sci, 2019. 15(12): p. 2548-2560.
- [13] Qin, X., et al., *Recent advances in CAR-T cells therapy for colorectal cancer*. Front Immunol, 2022. 13: p. 904137.
- [14] Han, D., et al., *Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Hematological Malignancies*. J Cancer, 2021. 12(2): p. 326-334.
- [15] Hay, K.A. and C.J. Turtle, *Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells: Lessons Learned from Targeting of CD19 in B-Cell Malignancies*. Drugs, 2017. 77(3): p. 237-245.
- [16] Davis, T.A., D.K. Czerwinski, and R. Levy, *Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression*. Clin Cancer Res, 1999. 5(3): p. 611-5.

- [17] Chen, W.C., et al., In vivo targeting of B-cell lymphoma with glycan ligands of CD22. *Blood*, 2010. 115(23): p. 4778-86.
- [18] Olejniczak, S.H., et al., A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol Invest*, 2006. 35(1): p. 93-114.
- [19] Yang, J., et al., Therapeutic potential and challenges of targeting receptor tyrosine kinase ROR1 with monoclonal antibodies in B-cell malignancies. *PLoS One*, 2011. 6(6): p. e21018.
- [20] Walter, R.B., et al., Acute myeloid leukemia stem cells and CD-33-targeted immunotherapy. *Blood*, 2012. 119(26): p. 6198-208.
- [21] Marofi, F., et al., *CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities*. *Stem Cell Res Ther*, 2021. 12(1): p. 81.
- [22] Dufva, O., et al., Integrated drug profiling and CRISPR screening identify essential pathways for CAR T-cell cytotoxicity. *Blood*, 2020. 135(9): p. 597-609.
- [23] Singh, N., et al., Impaired Death Receptor Signaling in Leukemia Causes Antigen-Independent Resistance by Inducing CAR T-cell Dysfunction. *Cancer Discov*, 2020. 10(4): p. 552-567.
- [24] Benmebarek, M.R., et al., Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(6).
- [25] Miao, L., et al., A Bibliometric and Knowledge-Map Analysis of CAR-T Cells From 2009 to 2021. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 840956.
- [26] Brentjens, R.J., et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 2011. 118(18): p. 4817-28.
- [27] Yu, W.L. and Z.C. Hua, Chimeric Antigen Receptor T-cell (CAR T) Therapy for Hematologic and Solid Malignancies: Efficacy and Safety-A Systematic Review with Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(1).

- [28] Kochenderfer, J.N., et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 2012. 119(12): p. 2709-20.
- [29] Zhang, X., et al., CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 927153.
- [30] Davila, M.L. and M. Sadelain, Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. *Int J Hematol*, 2016. 104(1): p. 6-17.
- [31] Davila, M.L., et al., Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2014. 6(224): p. 224ra25.
- [32] Brentjens, R.J., et al., CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2013. 5(177): p. 177ra38.
- [33] Maude, S.L., et al., Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 2014. 371(16): p. 1507-17.
- [34] Grupp, S.A., et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2013. 368(16): p. 1509-1518.
- [35] Lee, D.W., et al., T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015. 385(9967): p. 517-528.
- [36] Maude, S.L., et al., Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, 2018. 378(5): p. 439-448.
- [37] Warzocha, K., *Przewlekła białaczka limfocytowa*. 2009.
- [38] Mewawalla, P. and S. Nathan, Role of allogeneic transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies: a review. *Ther Adv Hematol*, 2014. 5(5): p. 139-52.

- [39] Turtle, C.J., S.R. Riddell, and D.G. Maloney, CD19-Targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy for B-cell malignancies. *Clin Pharmacol Ther*, 2016. 100(3): p. 252-8.
- [40] Kochenderfer, J.N., et al., Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol*, 2015. 33(6): p. 540-9.
- [41] Porter, D.L., et al., Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*, 2015. 7(303): p. 303ra139.
- [42] Singh, N., et al., CAR T Cell Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potential for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*, 2016. 17(6): p. 28.
- [43] Fraietta, J.A., et al., Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*, 2018. 24(5): p. 563-571.
- [44] Fraietta, J.A., et al., Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood*, 2016. 127(9): p. 1117-27.
- [45] Oflazoglu, E., I.S. Grewal, and H. Gerber, Targeting CD30/CD30L in oncology and autoimmune and inflammatory diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2009. 647: p. 174-85.
- [46] Savoldo, B., et al., Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30zeta artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood*, 2007. 110(7): p. 2620-30.
- [47] Hombach, A., et al., Characterization of a chimeric T-cell receptor with specificity for the Hodgkin's lymphoma-associated CD30 antigen. *J Immunother*, 1999. 22(6): p. 473-80.
- [48] Wang, C.M., et al., Autologous T Cells Expressing CD30 Chimeric Antigen Receptors for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Open-Label Phase I Trial. *Clin Cancer Res*, 2017. 23(5): p. 1156-1166.

- [49] Younes, A., et al., Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD-30-positive lymphomas. *N Engl J Med*, 2010. 363(19): p. 1812-21.
- [50] Ramos, C.A., H.E. Heslop, and M.K. Brenner, CAR-T Cell Therapy for Lymphoma. *Annu Rev Med*, 2016. 67: p. 165-83.
- [51] Smith, E.L., et al., BCMA-Targeted CAR T-cell Therapy plus Radiotherapy for the Treatment of Refractory Myeloma Reveals Potential Synergy. *Cancer Immunol Res*, 2019. 7(7): p. 1047-1053.
- [52] Atanackovic, D., et al., Chimeric Antigen Receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2016. 172(5): p. 685-98.
- [53] Bo Guo, M.C., Qingwang Han, Fan Hui, Hanren Dai, Wenying Zhang, Yajing Zhang, Yao Wang, Hongli Zhu, Weidong Han, CD-138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma. 2016.
- [54] Carpenter, R.O., et al., B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(8): p. 2048-60.

Terapia CAR-T w leczeniu guzów litych – zastosowanie i ograniczenia

Lidia Ziętek¹, Robert Kasza¹, Michał Janik¹, Jakub Kufel²

1. Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religi przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki w Zabrze, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Onkologia, jak każda dziedzina medycyny, ulega ciągłemu rozwojowi. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat terapia komórkowa poczyniła ogromne postępy. Mimo to, nadal wiele aspektów jej zastosowania pozostaje wielką niewiadomą, a także wciąż jest głównym obiektem badań klinicznych nad terapiami onkologicznymi. Dotychczasowe doniesienia wskazują na to, iż terapia komórkowa, oparta na wykorzystaniu zsyntezowanego, chimerycznego receptora antygenowego (ang. chimeric antigen receptor, CAR), daje pozytywną perspektywę dla pacjentów onkologicznych. Niestety, mimo wielu potwierdzeń skuteczności i bezpieczeństwa tej terapii, nadal nie daje ona całkowitej pewności wyleczenia bez skutków ubocznych chorych z guzami litymi. W tym celu prowadzi się także próby i badania nad zmniejszeniem ograniczającego wpływu działania mikrośrodowiska guza w organizmie pacjenta. Celem poniższej pracy jest przegląd badań i przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej tego zagadnienia. Prace badawcze zawarte w tym rozdziale skupiają się głównie na skierowaniu terapii CAR-T przeciwko wskazanym antygenom w konkretnych jednostkach chorobowych. Na chwilę obecną prowadzonych jest o wiele więcej badań skupiających się nad zastosowaniem terapii CAR-T, w których badacze dążą do uzyskania całkowitej skuteczności i bezpieczeństwa bez wystąpienia skutków ubocznych w leczeniu pacjentów onkologicznych, co umożliwi wprowadzenie jej w pełni do leczenia klinicznego w onkologii.

Słowa kluczowe: terapia CAR-T, guzy lite

Abstract: Oncology, like every field of medicine, is constantly evolving. Over the last few decades, cell therapy has made great strides. Despite this, many aspects of its use remain a great unknown, and it is still the main object in clinical trials on oncological therapies. Previous reports indicate that cell therapy, based on the use of a synthesized, chimeric antigen receptor (CAR), offers a positive outlook for oncology patients. Unfortunately, despite many confirmations of the effectiveness and safety of this therapy, it still does not give complete certainty of curing patients with solid tumors without side effects. For this purpose, trials and studies are

also conducted to reduce the limiting impact of the tumor microenvironment in the patient's body. The aim of this paper is to review research and present the current knowledge on this issue. Research in this chapter focuses mainly on directing CAR-T therapy against the indicated antigens in specific disease entities. At the moment, many more studies are being conducted focusing on the use of CAR-T therapy, in which researchers strive to achieve complete effectiveness and safety without side effects in the treatment of oncology patients, which will enable its full introduction into clinical treatment in oncology.

Keywords: CAR-T therapy, solid tumors

1. Wprowadzenie

Leczenie pacjentów onkologicznych uległo dużej rewolucji, dzięki pojawieniu się immunoterapii komórkowej. Coraz większy sukces terapii CAR-T w nowotworach hematologicznych dał perspektywę nad zastosowaniem jej w leczeniu wielu innych nowotworów. Obecność pozytywnej korelacji między skalą naciekania przez specyficzne dla antygeny cytotoksyczne komórki T (CTL) a odsetkiem pacjentów, którzy przeżyli, daje pewny pogląd i szansę na wprowadzenie terapii opartych na komórkach T do leczenia pacjentów z guzami litymi ^[1, 2]. Wiąże się z tym także nadzieja, że zastosowanie terapii CAR-T na większą skalę umożliwi osiągnięcie większych możliwości terapeutycznych również w innych nowotworach, gdzie chemioterapia czy radioterapia stają się mało efektywne.

Obecnie prowadzona jest ogromna liczba badań nad zastosowaniem terapii CAR-T w leczeniu guzów litych ^[3]. Niestety do tej pory wyniki badań klinicznych prowadzonych w tym kierunku są mało satysfakcjonujące i zachęcające, ponieważ nadal niewielu pacjentów uzyskuje pełną odpowiedź na leczenie, a także pojawiają się pewne ograniczenia, które uniemożliwiają skuteczne wprowadzenie terapii do leczenia klinicznego na dłuższą metę ^[4]. Wiąże się to z tym, że w przypadku guzów litych mikrośrodowisko immunosupresyjne guza uniemożliwia przemieszczanie się limfocytów T, jak i ich naciekanie przez nie guza. Dodatkowo guzy lite uwalniają wiele cząsteczek, w tym chemokin, aby osłabić odpowiedź ze strony układu odpornościowego człowieka, a także wytworzyć barierę ochronną dla komórek guza przed atakiem limfocytów T ^[5-7]. Warto zaznaczyć, że na dzień dzisiejszy żadna terapia CAR-T w leczeniu guzów litych nie została zarejestrowana i zatwierdzona ^[8].

Przez ostatnie lata prowadzono badania, w których komórki CAR-T kierowano przeciwko wielu antygenom nowotworowym obecnych w guzach litych, w tym antygenowi rakowo-płodowemu (*ang. carcino-embryonic antigen*,

CEA)^[9], receptorowi ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (*ang. human epidermal growth factor receptor 2, HER2*)^[10], receptorowi interleukiny-13 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$)^[11] czy mezotelinie^[12]. Obecnie do jednych z najczęściej stosowanych w badaniach klinicznych antygenów jest swoisty antygen gruczołu krokowego (*ang. prostate specific antigen, PSA*). Do lepiej poznanych antygenów komórek nowotworowych należy również zmutowany receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (*ang. epidermal growth factor receptor variant III, EGFRvIII*), który stanowi jeden z celów dla terapii CAR-T w leczeniu m.in. glejaka wielopostaciowego^[8].

2. Wybrane zagadnienia dotyczące badań klinicznych nad zastosowaniem terapii CAR-T

2.1. Glejak wielopostaciowy

Do tej pory największą skuteczność w leczeniu guzów litych terapia CAR-T uzyskała w przypadku glejaków^[13, 14]. Glejak wielopostaciowy (*ang. glioblastoma multiforme, GBM*) jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych mózgu u dorosłych, a także nadal pozostaje postacią glejaka z największym odsetkiem śmiertelności wśród chorych. Ponad połowę wykrywanych obecnie guzów mózgu u dorosłych stanowi właśnie glejak wielopostaciowy, a jedynie 5% z tych pacjentów dożywa 5 lat po diagnozie^[15-17].

We wspomnianym guzie silnej ekspresji ulega receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*ang. epidermal growth factor receptor, EGFR*). Jest to białko powierzchniowe komórki, którego rolą jest pobudzanie wzrostu. Wykazano, że mutacja EGFRvIII jest najczęstszą mutacją tego białka w pierwotnym glejaku i występuje nawet u około 30% nowo zdiagnozowanych pacjentów^[18-20]. W badaniach wykazano, że EGFRvIII działa stymulująco na rozwój nowotworu, prowadząc do zwiększonego wzrostu guza poprzez działanie onkogennych szlaków sygnałowych, np. RAS^[21], a także poprzez zmniejszenie udziału procesów apoptycznych, co związane jest z zwiększoną ekspresją Bcl-xL^[22].

Na dzień dzisiejszy zostało opracowanych i opisanych wiele komórek CAR-T skierowanych przeciwko EGFRvIII. W 2015 w Uniwersytecie Pensylwanii, we współpracy z firmą farmaceutyczną Novartis, opracowano terapeutyczny klon przeciwciała, wykorzystujący scFv Clone 2173 (C2173), stanowiący humanizowany konstrukt pochodzący z mysiego przeciwciała 3C10^[23]. W badaniu tym stwierdzono, że zaprojektowane komórki C2173 CAR-T po ich infuzji obwodowej efektywnie przemieszczały się do mózgu, co może

świadczyć o tym, że podawanie dożylnie może stanowić drogę do celowania w guzy OUN przy pomocy komórek T. Dodatkowo komórki te wykazywały trwałość i utrzymywały się u pacjentów.

W 2021 roku opublikowano badanie, w którym przedstawiono nowe komórki CAR-T, specyficzne dla EGFRvIII, o skutecznych funkcjach przeciwnowotworowych zarówno *in vitro*, jak i w heteroprzeszczepie modelu ludzkiego glejaka ^[15]. Jest to komórka GCT02 CAR-T ukierunkowana przeciwko EGFRvIII, przy użyciu mysich komórek CAR-T. Badanie to przeprowadzano na modelach mysich i wykazano, że po tygodniu od infuzji obwodowo pojedynczej dawki komórek guzy u myszy leczonych komórkami GCT02 CAR-T lub komórkami C2173 CAR-T uległy widocznemu zmniejszeniu rozmiarów, a dwa tygodnie po infuzji wielkość tych guzów osiągnęła rozmiary poniżej granicy wykrywalności. Autorzy badań dowodzą, że nowe komórki GCT02 CAR-T mogą brać udział w skutecznym usuwaniu wewnątrzczaszkowych guzów z ekspresją białka EGFRvIII, co daje kolejną nadzieję i nową perspektywę na uzyskanie w pełni skutecznego leczenia terapią CAR-T u chorych na glejaka wielopostaciowego.

2.2. Rak jelita grubego

Rak jelita grubego (*ang. colorectal cancer, CRC*) jest to trzeci najczęstszy nowotwór i drugi najbardziej śmiertelny nowotwór złośliwy na świecie. Za rozwój tej choroby może odpowiadać wiele czynników, w tym czynniki genetyczne i środowiskowe. Nowotwór ten określany jest chorobą krajów rozwiniętych o zachodnim stylu życia, w którym dominuje alkohol, tytoń, siedzący tryb życia i w następstwie otyłość. W kontekście leczenia CRC znacznie lepsze rokowanie mają pacjenci, u których zdiagnozowano wczesne objawy lub chorobę wykryto we wczesnym stadium. W rzeczywistości diagnoza jest najczęściej stawiana w późnym stadium, gdzie obecne metody leczenia, w tym radio- lub chemioterapia, a także leczenie chirurgiczne nie są już w stanie całkowicie zahamować rozwój nowotworu i zmniejszyć ryzyko przerzutów ^[24].

Antygen karcinoembrionalny (CEA) to glikoproteinowy antygen, który ulega ekspresji w wielu nowotworach nabłonkowych oraz powstaje w komórkach jelita grubego. Jednak nie zawsze obecność markera CEA świadczy o obecności nowotworu. Jego podwyższone stężenie w ustroju człowieka może być również zauważalne w takich schorzeniach jak zapalenie wątroby, trzustki czy nieswoistym zapaleniu jelit, co świadczy, że marker CEA nie jest swoistym markerem dla raka jelita grubego ^[25].

To samo tyczy się glikoproteiny CA 19.9, która stanowi marker nie tylko w diagnostyce raka jelita grubego, ale także trzustki czy żołądka. Do diagnostyki raka jelita grubego stosowane są także inne markery, w tym tkankowy antygen polipeptydowy (*ang. tissue polypeptide specific antigen, TPS*) oraz glikoproteina-72 związaną z nowotworem (*ang. tumor-associated glycoprotein-72, TAG-72*) [25].

Istnieją badania nad zastosowaniem terapii CAR-T celowanej przeciwko markerowi CEA, które donoszą o skuteczności w działaniu przeciwnowotworowym tych komórek, a także dają nową perspektywę dla wzmacniania terapii CAR-T w leczeniu również innych guzów litych [26, 27].

W nowotworze jelita grubego można również stwierdzić zwiększoną ekspresję cząsteczki MSLN, czyli mezoteliny. Mezotelina jest cząsteczką docelową w terapii CAR-T również innych nowotworów, np. raku jajnika, piersi czy płuc [12, 28]. W 2021 przedstawiono badanie kliniczne, w którym skonstruowano komórki CAR-T 3. generacji, wycelowane na cząsteczkę MSLN [29]. W wynikach autorzy donoszą, że w przeprowadzonym eksperymencie komórki CAR-T niszczyły komórki nowotworowe MSLN-dodatknie in vitro, dlatego zmodyfikowane komórki MSLN-CAR-T mogą stanowić duży przełom, a także optymistyczną metodę w leczeniu guzów litych.

Również jednym z głównych antygenów związanych z rakiem jelita grubego, a także ulegającym w nim zwiększonej ekspresji jest cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych (*ang. epithelial cell adhesion molecule, EpCAM*). Antygen ten może wpływać na proliferację i wzrost komórek nowotworowych w raku okrężnicy, a także promować migrację i tworzenie przerzutów. W związku z tym cząsteczka ta stała się nowym celem dla terapii CAR-T [30]. W jednym z przeprowadzonych badań dowiedziono, że komórki EpCAM-CAR-T w sposób skuteczny zabijały komórki nowotworowe, a także brały udział w promocji uwalniania cytokin in vitro. Ze wspomnianych wyników można przypuszczać, że komórki CAR-T ukierunkowane na EpCAM mogą w przyszłości wykazać się skutecznością w leczeniu raka okrężnicy lub jelita grubego [30].

Do markerów, ulegających zwiększonej ekspresji w przebiegu raka jelita grubego, należy także cząsteczka HER2. W opublikowanym w 2021 roku raporcie badania klinicznego nad zastosowaniem terapii CAR-T celowanej w HER2 w leczeniu przerzutowego raka jelita grubego, autorzy badań donoszą, że skonstruowane komórki HER2 CAR-T wykazywały znaczną cytotoksyczność oraz były zdolne wytwarzania cytokin przeciwko komórkom nowotworowym [31].

Jak widać, ilość markerów dla raka jelita grubego jest duża, a liczba prowadzonych badań nad skierowaniem przeciwko nim komórek CAR-T jest jeszcze większa i nadal rośnie. Mimo, że wiele z tych badań jest na wczesnym etapie badań klinicznych, to ich wyniki wykazują pewną efektywność i skuteczność terapii w zastosowaniu, co daje nadzieję na stworzenie odpowiedniej immunoterapii do celów leczniczych i terapeutycznych dla chorych na CRC. Wcześniej jednak należy ustalić odpowiedni plan i strategię, która pozwoli rozwiązać problemy i zmniejszyć ograniczenia w leczeniu wynikające m.in. z immunosupresyjnego środowiska guza ^[8, 32].

2.3. Rak piersi

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym oraz najbardziej śmiertelnym nowotworem wśród kobiet na świecie. Dodatkowo obserwuje się tendencję wzrostową w obciążeniu tym nowotworem i szacuje się, że liczba osób obciążonych ryzykiem zachorowania na ten nowotwór będzie stale rosła ^[33-36]. Obecnie w leczeniu raka piersi stosuje się radioterapię, chemioterapię, leczenie chirurgiczne, a także leczenie hormonalne ^[33].

W ostatnich latach przebadano aż 19 antygenów kierowanych przez komórki CAR-T w raku piersi, w tym m.in. HER2, EGFR, HGFR, MUC1, CD70, CD133, EpCAM oraz CEA ^[37]. Wszystkie antygeny w badaniach przedklinicznych wykazały skuteczne działanie przeciwnowotworowe, poprzez hamowanie wzrostu guza oraz uwalnianie cytokin prozapalnych. Jednak tylko 12 z nich przeszło do etapu badań klinicznych. Należą do nich HER2, ROR1, mezotelina, MUC1, CD44v6, CD70, CD133, EpCAM, NKG2D, GD2, TO oraz cMET.

Niestety mimo dużej ilości badań prowadzonych nad zastosowaniem terapii, większość z nich nadal jest na etapie badań klinicznych, a część wyników innych badań nie została upubliczniona. Autorzy opublikowanego w 2022 roku przeglądu, przedstawiającego ostatnie postępy terapii CAR-T donoszą, że „terapia komórkowa CAR-T w raku piersi ma do tej pory duże osiągnięcia; jednak ze względu na brak dowodów potwierdzających jest jeszcze długa droga do zastosowania u pacjentów z rakiem piersi. Dlatego, aby jak najszybciej wprowadzić terapię komórkową CAR-T do fazy klinicznej, potrzeba więcej badań klinicznych i bardziej dogłębnych badań w celu poprawy kwestii bezpieczeństwa i przewyciężenia wyzwań związanych z terapią komórkową CAR-T.” ^[37].

2.4. Gruczolakorak przewodowy trzustki

Gruczolakorak przewodowy trzustki (*ang. pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC*) jest głównym nowotworem złośliwym trzustki. Jest 7. nowotworem o największej śmiertelności wśród chorych. Liczba chorych na PDAC stale rośnie, a na dzień dzisiejszy nie istnieje leczenie terapeutyczne, które poprawiałoby rokowanie u pacjentów z tym nowotworem ^[38].

W prowadzonych badaniach nad zastosowaniem terapii CAR-T w leczeniu nowotworów trzustki, komórki T celowane są w takie antygeny jak MSLN, CD133, EGFR oraz HER2 ^[39]. W 2017 roku raport z badania klinicznego, w którym oceniano działanie immunoterapii chimerycznym receptorem antygeny z użyciem komórek T ukierunkowanej na receptor HER2 u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami dróg żółciowych i rakiem trzustki. Wyniki tej próby klinicznej wskazują, że nie udało się uzyskać dłuższej trwałości i działania komórek CART-HER2 na poziomie terapeutycznym *in vivo*, mimo że terapia okazała się być bezpieczna. Według autorów osiągnięcie odpowiednich strategii, pozwalających na uniknięcie barier i innych nieznanymi przeszkód ograniczających działanie terapii, pozwoli na zwiększenie jej skuteczności i efektywności w leczeniu chorych z guzami litymi ^[40].

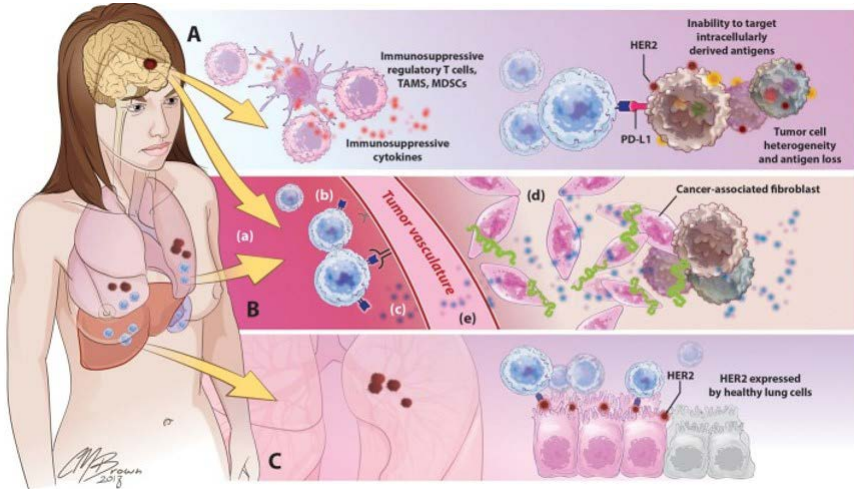
W 2018 roku opublikowano inne badanie, w którym badano z kolei skuteczność terapii CAR-T celowanej w cząsteczkę CD133, w tym u 7 chorych z nowotworem trzustki. Autorzy donoszą, że terapia ta okazuje się być skuteczną formą leczenia, a także jest bezpieczną dla pacjentów z zaawansowanym nawracającym bądź opornym na leczenie i przerzutowym guzem ^[41].

Wyniki badania nad zastosowaniem terapii CAR-T z wykorzystaniem komórek CAR-T-EGFR u chorych na raka trzustki z obecnymi przerzutami opublikowano w 2020 roku. Zaobserwowano obniżenia ekspresji antygeny EGFR na komórkach nowotworowych, a także potwierdzono efektywność i bezpieczeństwo stosowania terapii CAR-T u pacjentów z rakiem trzustki z przerzutami ^[42].

3. Ograniczenia w terapii CART – toksyczność, naciekanie, immunosupresyjny TME

Bardziej złożona budowa i fizjologia guzów litych wpływa na ograniczenie skuteczności działania zastosowanej terapii CAR-T, w porównaniu do nowotworów hematologicznych ^[43]. Zastosowanie terapii CAR-T w leczeniu guzów litych wiąże się z obecnością wielu ograniczeń, w tym wpływem

mikrośrodowiska guza, obecnością barier dla migracji komórek CAR-T czy wtórną toksycznością wobec zdrowych komórek (rycina 1.). Obecnie dokonuje się co raz więcej badań nad uzyskaniem odpowiednich strategii, które umożliwią ograniczenie negatywnego wpływu guza na działalność komórek CAR-T [44].



Rycina 1. Zestawienie barier ograniczających skuteczność działania terapii CAR-T w leczeniu guzów litych [3].

3.1. Immunosupresyjne działanie mikrośrodowiska guza litego

W przypadku guzów litych przemieszczanie się limfocytów T i naciekanie przez nie ognisk nowotworowych jest znacząco bardziej ograniczone przez działanie mikrośrodowiska guza, w przeciwieństwie do terapii nowotworów hematologicznych [5]. Obraz histopatologiczny guza litego charakteryzuje się słabą integralnością między tkankami, obecnością dużej ilości naczyń krwionośnych, szerokimi odstępami między ścianami naczyń oraz rozległym wyciekami naczyniowym [45]. Taka budowa powoduje, że środowisko nowotworu charakteryzuje się niskim pH, i niedotlenieniem, a także zwiększonym stężeniem cytokin pronowotworowych i obecnością komórek supresorowych [46-48]. Cechy te wpływają na immunosupresyjną działalność mikrośrodowiska guza, która związana jest ze zdolnością komórek nowotworowych guza do tłumienia i hamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej, wywoływanej przez gospodarza w odpowiedzi na obecność komórek CAR-T [49-51].

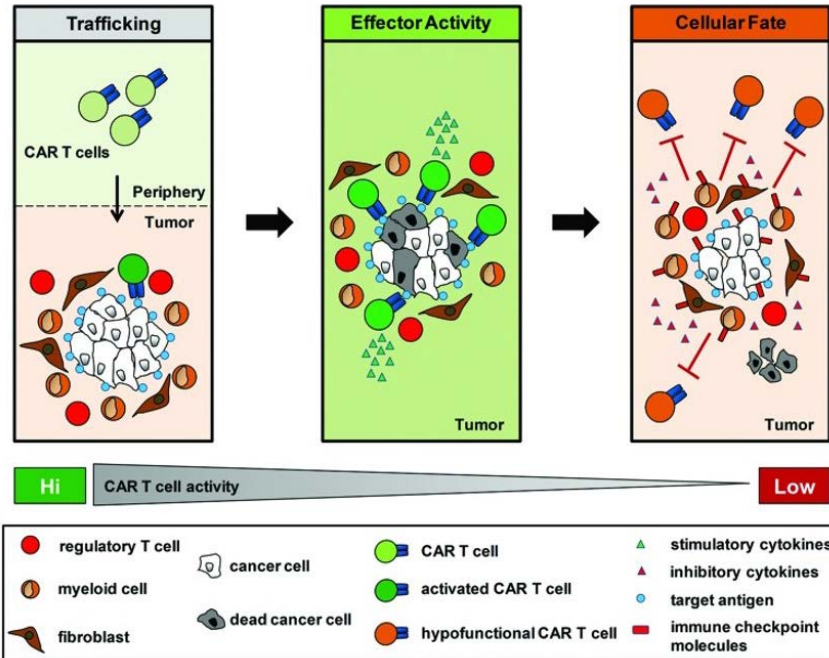
Dodatkowym utrudnieniem dla przemieszczania się i infiltracji przez komórki CAR-T są niektóre chemokiny wydzielane przez guzy lite, jak między

innymi CXCL1, CXCL12 i CXCL5, które zapobiegają prawidłowemu działaniu komórek CAR-T [6, 7, 52]. W mikrośrodowisku guza obecnych jest wiele leukocytów o działaniu immunosupresyjnym, a także cząsteczek o charakterze immunologicznym, tworzących punkty kontrolne oraz cytokin supresyjnych, takich jak transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β) [3]. Ich złożoność i wspólne działanie przyczynia się do tworzenia środowiska dla guza, które będzie go chronić przed wrogim działaniem komórek T i komórek odpornościowych, a w konsekwencji będzie pozytywnie wpływać na dalszy rozwój guza.

Ta immunosupresja przyczynia się także do szybkiej utraty przez komórki CAR-T ich funkcji przeciwnowotworowej przy bezpośrednim kontakcie z mikrośrodowiskiem guza [53]. W związku z tym przeprowadzono badania w których, skonstruowano komórki CAR-T zdolne do wydzielania prozapalnej cytokiny – IL-12, aby osiągnąć lepszą skuteczność działania komórek CAR-T w obszarze nowotworowym [54]. Wykazano bowiem, że IL-12 jest zdolna do wpływania na mikrośrodowisko guza poprzez m.in. hamowanie wydzielania IL-10 przez makrofagi, proliferację i rekrutację komórek NK, aktywację TIL obecnych w stanie anergii oraz zahamowanie supresji efektorowych komórek T, zależnej od limfocytów T regulatorowych [55-57].

Komórki nowotworowe guza mogą także uniknąć nadzoru immunologicznego, stymulując receptory, które będą bezpośrednio hamować działanie napływających limfocytów T, dzięki endogennym szlakom regulacyjnym. Proces ten zachodzi poprzez ekspresję cząsteczek powierzchniowych, takich jak CTLA-4 oraz PD-1, stanowiących punkty kontrolne. Zwiększenie ekspresji tych cząsteczek na limfocytach T, umożliwia komórkom guza wpływanie na działanie komórek odpornościowych organizmu, napływających w kierunku nowotworu, poprzez wprowadzenie ich w stan anergii czy aktywację procesów apoptozy.

Nasuwa się więc idea, iż terapeutyczna blokada punktów kontrolnych układu odpornościowego, m.in. PD-1, CTLA-4, może być potencjalną metodą na zwiększenie i wzmocnienie odporności przeciwnowotworowej [58]. Na rycinie 2. przedstawiono wpływ, jaki wywiera mikrośrodowisko guza litego na działanie komórek stosowanych w terapii CAR-T.



Rycina 2. Schemat obrazujący wpływ mikrośrodowiska guza na działanie limfocytów T zmodyfikowanych receptorem chimerycznego antygenu (CAR) [46].

3.2. Migracja limfocytów

Aby komórki CAR-T mogły się związać z docelowymi antygenami na komórkach guza, muszą najpierw dotrzeć do obszaru objętego nowotworem. W nowotworach hematologicznych komórki CAR-T łatwo docierały i napotykały komórki nowotworowe ze względu na ich rozmieszczenie w organizmie. W przypadku guzów litych napotyka się problemy w procesach migracji komórek do guza i infiltracji. Wspomniane wcześniej chemokiny CXCL1, CXCL5, CXCL12, które są wydzielane przez komórki guza blokują również dostęp i uniemożliwiają komórkom CAR-T przenikanie do wnętrza guza [6, 7, 52]. Dodatkowo na limfocytach T stwierdza się brak odpowiednich receptorów dla chemokin, co także utrudnia im infiltrację do obszaru zajętego przez nowotwór. Rodzi się tu perspektywa dla rozpoczęcia badań, w których należy zmodyfikować komórki T, w taki sposób, aby dochodziło na nich do ekspresji receptorów dla chemokin, odpowiednio dopasowanych do chemokin wydzielanych przez komórki guza [6, 59].

Niektóre badania donoszą, że komórki skierowane przeciwko nowotworowi zaczynają migrować również do innych narządów, jak płuca czy wątroba. Przyczyna osłabionego transportu komórek nie jest do końca jasna, ponieważ może być wynikać z działania zarówno limfocytów, jak i guza, rozwoju barier chroniących komórki nowotworowe, a także może być wieloczynnikowa [60-62].

3.3. Specyficzność antygeny

Charakterystyczną cechą guzów litych jest ich niejednorodność. Przy zastosowaniu terapii CAR-T problemem staje się więc wybór odpowiednich, docelowych antygenów, przeciwko którym będą skierowane komórki CAR-T. Tworzenie się guzów litych jest wynikiem działania jednocześnie wielu mutacji, co nadaje im cechę heterogeniczności. W następstwie czego powstały guz może charakteryzować się unikatowym układem antygenów związanych z guzem (*ang. tumor associated antigens, TAA*), które będą wykazywać zróżnicowaną ekspresję na powierzchni komórek w różnych klonach. „Heterogeniczność nowotworu powoduje, że cel immunoterapii staje się specyficzny tylko dla części komórek nowotworowych, co pogarsza rokowanie pacjenta i zwiększa częstość nawrotów i przerzutów nowotworu” [45].

Dodatkowo wiele antygenów, które mogą ulegać ekspresji na komórkach nowotworowych, mogą również być obecne na zdrowych tkankach, np. marker PRAME charakterystyczny dla czerniaka, obecny jest także na komórkach nadnerczy czy endometrium [63]. W następstwie tego skierowana terapia CAR-T może wywoływać działania niepożądane [64].

Wynika z tego fakt, iż najlepszym sposobem na zapobieganie niezamierzonemu uszkodzeniu zdrowych komórek i tkanek, jest projektowanie komórek CAR-T celowanych w antygeny, stanowiące markery jedynie dla komórek złośliwych guza. Przykładem tego jest swoisty antygen błonowy gruczołu krokowego (*ang. prostate-specific membrane antigen, PSMA*), który uważa się, że obecny jest na komórkach prostaty objętych nowotworem i śródbłonku niektórych naczyń guza, a w dodatku nie stwierdza się go na komórkach w prawidłowym układzie naczyniowym, co czyni go idealnym celem dla immunoterapii CAR-T [65].

4. Podsumowanie

Wszystkie badania prowadzone nad zastosowaniem terapii CAR-T niewątpliwie potwierdzają założenie, że jest to innowacyjna forma terapii, która

może wnieść wiele dobrego do immunoterapii nowotworów. Wyniki przeprowadzonych prób przedklinicznych i klinicznych m.in. glejaka wielopostaciowego czy jelita grubego dają obiecującą perspektywę oraz alternatywę dla obecnego leczenia nowotworów z tej grupy. Jednak, aby możliwe było wprowadzenie tej immunoterapii do praktyki klinicznej, nadal konieczne są dalsze badania, które umożliwią całkowite wyeliminowanie zagrożeń i ograniczeń, w tym zmniejszenie ograniczającego działania mikrośrodowiska guza czy migracji limfocytów. Nadrzędnym celem badań obecnie jest rozpoznanie najbardziej właściwego antygeny dla danej choroby nowotworowej i skierowanie na niego zszyntezowanych komórek CAR-T. Taka strategia pozwoli na uzyskanie o wiele lepszej skuteczności i efektywności działania immunoterapii i być może w przyszłości pozwoli na wprowadzenie jej do leczenia klinicznego.

Referencje

- [1] Kmiecik, J., et al., Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol*, 2013. 264(1-2): p. 71-83.
- [2] Lohr, J., et al., Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF-beta. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(13): p. 4296-308.
- [3] Filley, A.C., M. Henriquez, and M. Dey, CART Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors. *Front Oncol*, 2018. 8: p. 453.
- [4] Wagner, J., et al., CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality? *Mol Ther*, 2020. 28(11): p. 2320-2339.
- [5] Zhang, B.L., et al., Hurdles of CAR-T cell-based cancer immunotherapy directed against solid tumors. *Sci China Life Sci*, 2016. 59(4): p. 340-8.
- [6] Kershaw, M.H., et al., Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Hum Gene Ther*, 2002. 13(16): p. 1971-80.

- [7] Feig, C., et al., Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(50): p. 20212-7.
- [8] Amelia Kierasńska, D.C., Marta Węgierska, Ewelina Stoczyńska-Fidelus, Piotr Rieske, *Terapia CAR-T w onkologii i w innych dziedzinach medycyny*. 2021.
- [9] Katz, S.C., et al., Regional CAR-T cell infusions for peritoneal carcinomatosis are superior to systemic delivery. *Cancer Gene Ther*, 2016. 23(5): p. 142-8.
- [10] Ahmed, N., et al., HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(2): p. 474-85.
- [11] Kahlon, K.S., et al., Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res*, 2004. 64(24): p. 9160-6.
- [12] Morello, A., M. Sadelain, and P.S. Adusumilli, Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors. *Cancer Discov*, 2016. 6(2): p. 133-46.
- [13] Brown, C.E., et al., Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med*, 2016. 375(26): p. 2561-9.
- [14] Miao, H., et al., EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells migrate to and kill tumor deposits infiltrating the brain parenchyma in an invasive xenograft model of glioblastoma. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e94281.
- [15] Abbott, R.C., et al., Novel high-affinity EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells effectively eliminate human glioblastoma. *Clin Transl Immunology*, 2021. 10(5): p. e1283.
- [16] Lim, M., et al., Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. 15(7): p. 422-442.
- [17] Chistiakov, D.A., I.V. Chekhonin, and V.P. Chekhonin, The EGFR variant III mutant as a target for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *Eur J Pharmacol*, 2017. 810: p. 70-82.

- [18] Faulkner, C., et al., EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers. *Br J Neurosurg*, 2015. 29(1): p. 23-29.
- [19] Himmerger, A.B., et al., The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med*, 2005. 3: p. 38.
- [20] Feldkamp, M.M., et al., Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery*, 1999. 45(6): p. 1442-53.
- [21] Prigent, S.A., et al., Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem*, 1996. 271(41): p. 25639-45.
- [22] Nagane, M., et al., A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res*, 1996. 56(21): p. 5079-86.
- [23] Johnson, L.A., et al., Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma. *Sci Transl Med*, 2015. 7(275): p. 275ra22.
- [24] Sawicki, T., et al., A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*, 2021. 13(9).
- [25] Jelski, W. and B. Mroczko, Biochemical Markers of Colorectal Cancer - Present and Future. *Cancer Manag Res*, 2020. 12: p. 4789-4797.
- [26] Fan, J., et al., Development of CAR-T Cell Persistence in Adoptive Immunotherapy of Solid Tumors. *Front Oncol*, 2020. 10: p. 574860.
- [27] Hombach, A.A., G. Rappl, and H. Abken, Blocking CD30 on T Cells by a Dual Specific CAR for CD30 and Colon Cancer Antigens Improves the CAR T Cell Response against CD30(-) Tumors. *Mol Ther*, 2019. 27(10): p. 1825-1835.

- [28] Liang, Z., et al., Tandem CAR-T cells targeting FOLR1 and MSLN enhance the antitumor effects in ovarian cancer. *Int J Biol Sci*, 2021. 17(15): p. 4365-4376.
- [29] Zhang, Q., et al., The antitumor capacity of mesothelin-CAR-T cells in targeting solid tumors in mice. *Mol Ther Oncolytics*, 2021. 20: p. 556-568.
- [30] Zhou, Y., et al., Construction of chimeric antigen receptor-modified T cells targeting EpCAM and assessment of their anti-tumor effect on cancer cells. *Mol Med Rep*, 2019. 20(3): p. 2355-2364.
- [31] Xu, J., et al., HER2-specific chimeric antigen receptor-T cells for targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 2021. 12(12): p. 1109.
- [32] Qin, X., et al., Recent advances in CAR-T cells therapy for colorectal cancer. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 904137.
- [33] Trayes, K.P. and S.E.H. Cokenakes, Breast Cancer Treatment. *Am Fam Physician*, 2021. 104(2): p. 171-178.
- [34] Sung, H., et al., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021. 71(3): p. 209-249.
- [35] Heer, E., et al., Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *Lancet Glob Health*, 2020. 8(8): p. e1027-e1037.
- [36] Arnold, M., et al., Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*, 2022. 66: p. 15-23.
- [37] Yang, Y.H., et al., CAR-T Cell Therapy for Breast Cancer: From Basic Research to Clinical Application. *Int J Biol Sci*, 2022. 18(6): p. 2609-2626.
- [38] Ushio, J., et al., Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Epidemiology and Risk Factors. *Diagnostics (Basel)*, 2021. 11(3).
- [39] Yeo, D., et al., The next wave of cellular immunotherapies in pancreatic cancer. *Mol Ther Oncolytics*, 2022. 24: p. 561-576.
- [40] Feng, K., et al., Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers. *Protein Cell*, 2018. 9(10): p. 838-847.

- [41] Wang, Y., et al., CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: A phase I trial. *Oncoimmunology*, 2018. 7(7): p. e1440169.
- [42] Liu, Y., et al., Anti-EGFR chimeric antigen receptor-modified T cells in metastatic pancreatic carcinoma: A phase I clinical trial. *Cytotherapy*, 2020. 22(10): p. 573-580.
- [43] Hong, M., J.D. Clubb, and Y.Y. Chen, Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 2020. 38(4): p. 473-488.
- [44] Sterner, R.C. and R.M. Sterner, CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*, 2021. 11(4): p. 69.
- [45] Zhang, H., et al., New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells. *Int J Biol Sci*, 2016. 12(6): p. 718-29.
- [46] Beatty, G.L. and E.K. Moon, Chimeric antigen receptor T cells are vulnerable to immunosuppressive mechanisms present within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, 2014. 3(11): p. e970027.
- [47] Mohammed, S., et al., Improving Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cell Function by Reversing the Immunosuppressive Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer. *Mol Ther*, 2017. 25(1): p. 249-258.
- [48] Anderson, K.G., I.M. Stromnes, and P.D. Greenberg, Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies. *Cancer Cell*, 2017. 31(3): p. 311-325.
- [49] Dix, A.R., et al., Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol*, 1999. 100(1-2): p. 216-32.
- [50] Fecci, P.E., et al., Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4⁺ compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res*, 2006. 66(6): p. 3294-302.
- [51] Zou, J.P., et al., Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J Immunol*, 1999. 162(8): p. 4882-92.

- [52] Wang, G., et al., Targeting YAP-Dependent MDSC Infiltration Impairs Tumor Progression. *Cancer Discov*, 2016. 6(1): p. 80-95.
- [53] Moon, E.K., et al., Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(16): p. 4262-73.
- [54] Koneru, M., et al., IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology*, 2015. 4(3): p. e994446.
- [55] Watkins, S.K., et al., IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol*, 2007. 178(3): p. 1357-62.
- [56] Broderick, L., et al., IL-12 reverses anergy to T cell receptor triggering in human lung tumor-associated memory T cells. *Clin Immunol*, 2006. 118(2-3): p. 159-69.
- [57] Kilinc, M.O., et al., Reversing tumor immune suppression with intratumoral IL-12: activation of tumor-associated T effector/memory cells, induction of T suppressor apoptosis, and infiltration of CD8+ T effectors. *J Immunol*, 2006. 177(10): p. 6962-73.
- [58] Intlekofer, A.M. and C.B. Thompson, At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 2013. 94(1): p. 25-39.
- [59] Ma, S., et al., Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci*, 2019. 15(12): p. 2548-2560.
- [60] Harlin, H., et al., Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res*, 2009. 69(7): p. 3077-85.
- [61] Kershaw, M.H., et al., A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(20 Pt 1): p. 6106-15.
- [62] Kakarla, S., X.T. Song, and S. Gottschalk, Cancer-associated fibroblasts as targets for immunotherapy. *Immunotherapy*, 2012. 4(11): p. 1129-38.

- [63] Lezcano, C., et al., PRAME Expression in Melanocytic Tumors. *Am J Surg Pathol*, 2018. 42(11): p. 1456-1465.
- [64] Miliotou, A.N. and L.C. Papadopoulou, CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018. 19(1): p. 5-18.
- [65] Yong, C.S.M., et al., CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol*, 2017. 95(4): p. 356-363.

Immunoterapia - przyszłość leczenia raka jajnika. Uwzględnienie biopsji płynnej jako innowacyjnego podejścia do diagnostyki

Julia Konieczny¹, Zuzanna Kolanko², Natalia Krauzowicz²,
Paweł Krupa², Aleksandra Kotapka², Martyna Kulwicka²

1. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Opisowej i Topograficznej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Rak jajnika stanowi wyzwanie dla współczesnej ginekologii onkologicznej ze względu na późną wykrywalność, skłonność do nawrotów oraz rozwijania chemiooporności. Pomocna w przezwyciężeniu tych problemów może okazać się immunoterapia, która jednak posiada pewne ograniczenia ze względu na wybitnie supresorowe mikrośrodowisko guza nowotworowego jajnika. Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad wykorzystywaniem metod z nią związanych m.in. terapie nacelowane na interleukinę 6 czy stosowanie szczepionek, uczulających układ odpornościowy na antygeny nowotworowe. Inne, np. bewacyzumab, który jest przeciwciałem monoklonalnym wiążącym VEGF, czy inhibitory PARP stosowane u pacjentek z mutacją genów BRCA1/BRCA2, należą już do standardów leczenia. Nie tylko leczenie, ale także nowoczesne i nieinwazyjne metody diagnostyki są rozwijane, takie jak biopsja płynna, która umożliwia wykrywanie, w procesie analizy krwi obwodowej, charakterystycznych składników (ctDNA, cfDNA, CTCs, TEPs, egzosomy) uwalnianych przez komórki nowotworowe. Immunoterapia stanowi przyszłość leczenia wielu nowotworów, w tym również raka jajnika.

Słowa kluczowe: rak jajnika, biopsja płynna, immunoterapia, inhibitory PARP

Abstract: Epithelial ovarian cancer is a challenge for modern oncological gynecology because of late detection, tendency to recurrence and the development of chemoresistance. Immunotherapy may be helpful in overcoming these problems, however it has some limitations due to the extremely suppressor tumor microenvironment. Currently, many studies are being conducted on the use of these methods, e.g. therapies targeting interleukin 6 or the use of vaccines that sensitize the immune system to cancer antigens. Others, e.g. bevacizumab, which is a monoclonal antibody binding VEGF, or PARP inhibitors used in patients with BRCA1/BRCA2 gene mutations, are already a part of the treatment standards. Not only treatment, but also

modern and non-invasive methods of diagnostics are being developed, such as liquid biopsy, which makes it possible to detect, in the process of peripheral blood analysis, characteristic components (ctDNA, cfDNA, CTCs, TEPs, exosomes) released by cancer cells. Immunotherapy represents the future of treatment for many cancers, including epithelial ovarian cancer.

Keywords: epithelial ovarian cancer, liquid biopsy, immunotherapy, PARP inhibitors

1. Wstęp

Rocznie w Polsce na raka jajnika zapada około 3,5 tysięcy kobiet. Był on piątym co do częstości występowania nowotworem wśród Polek w 2018 roku według Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) ^[1]. Jest także najgorzej rokującym nowotworowym schorzeniem ginekologicznym – na 5-letnie przeżycie może liczyć nieco ponad 40% pacjentek, co wynika najczęściej z późnej diagnozy, której przyczyną mogą być niespecyficzne objawy takie jak ból brzucha, powiększenie jego obwodu czy problemy ze strony układu pokarmowego, z którymi kobiety zgłaszają się do lekarza. Również nawroty choroby są bardzo częste, co czyni tę chorobę przewlekłą w przypadku wielu kobiet.

Do czynników zwiększających ryzyko rozwoju tego nowotworu należy m.in.: wczesne rozpoczęcie miesiączkowania, endometrioza, późno występująca menopauza, otyłość czy dziedziczne mutacje w genach BRCA1 i BRCA2 (mutacje dotyczą około 15% chorych) ^[2]. Zauważono korelację między liczbą owulacji w ciągu życia a częstością występowania raka jajnika, jako że długotrwałe karmienie piersią, posiadanie dzieci, późne wystąpienie pierwszej miesiączki czy wczesne wystąpienie menopauzy, a więc czynniki zmniejszające liczbę owulacji w ciągu życia, zmniejszają również ryzyko zachorowania ^[3].

Komórki jajnika, ulegające procesowi nowotworzenia, wywodzą się najczęściej z komórek nabłonkowych pokrywających gonadę - 85-95% przypadków (według Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej (PTGO) jest to ponad 95% diagnozowanych nowotworów). Mogą również pochodzić z komórek zrębu (5-8%) i komórek rozrodczych (3-5%) ^[2, 4].

2. Rak jajnika – diagnostyka i leczenie standardowe

2.1. Diagnostyka

Rak jajnika jest chorobą, która nie daje objawów patognomicznych, dlatego rozpoznanie choroby jest bardzo trudne, o czym świadczy fakt,

że około 70% pacjentek rozpoczyna leczenie będąc już w III lub IV stadium zaawansowania choroby ^[5]. Taki stan wpływa na ogólne złe statystyki tego nowotworu. W diagnostyce standardowo przeprowadza się ginekologiczne badanie palpacyjne: transwaginalne (przezpochwowe) oraz transanalne (przezodbytnicze). Charakteryzują się one niską czułością i swoistością – guz o małych rozmiarach nie jest zwykle wykrywany, dodatkowo wiele wyczuwalnych zmian ma charakter niezłośliwy. Podstawowym działaniem diagnostycznym jest wykonywanie USG przezpochwowego jajników (ryc. 1, ryc. 2) oraz jamy brzusznej oraz dodatkowo wykonanie badania dopplerowskiego.

Kolejną procedurą diagnostyczną jest biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana (BACC), która polega na pobraniu materiału cytologicznego poprzez nakłucie guza cienką igłą przy miejscowym znieczuleniu, pod kontrolą badania obrazowego, najczęściej USG. Oprócz tego wykonuje się oznaczanie markera CA-125 we krwi, który po raz pierwszy został wykorzystany do diagnostyki nabłonkowego nowotworu jajnika w 1983 r.

CA-125 jest glikoproteiną, kodowaną przez gen MUC19, który znajduje się na chromosomie 19. Prawidłowo ulega ekspresji na komórkach nabłonkowych jajnika, jajowodu, otrzewnej, opłucnej, osierdzia, okrężnicy, nerek oraz żołądka ^[6].

Bast i in. przeprowadzili badanie w 1983 r., w którym podwyższone stężenie CA-125 w surowicy (> 35 U/ml) występowało u 82% pacjentek z rakiem jajnika, 28,5% pacjentek z nowotworami nieginekologicznymi, takimi jak nowotwór trzustki, płuc, piersi, jelita grubego i 6% pacjentek z łagodnymi zmianami, takimi jak torbiele jajnika ^[7]. Podwyższone stężenie CA-125 również obserwuje się w przebiegu innych nowotworów ginekologicznych, np. w gruczolakoraku endometrium i w raku szyjki macicy. CA-125 może wzrastać również w warunkach fizjologicznych tj. w czasie menstruacji, w pierwszym trymestrze ciąży a także w okresie poporodowym.

Funkcja CA-125 nadal nie jest do końca jasna. Najnowsze badania jednak wskazują, że glikoproteina ta może odgrywać rolę w odporności komórkowej i hamować odpowiedź cytotoksyczną komórek NK ^[8]. W warunkach fizjologicznych glikoproteina ta nie przedostaje się do krwioobiegu z powodu obecności kompleksów łączących ją z komórką.

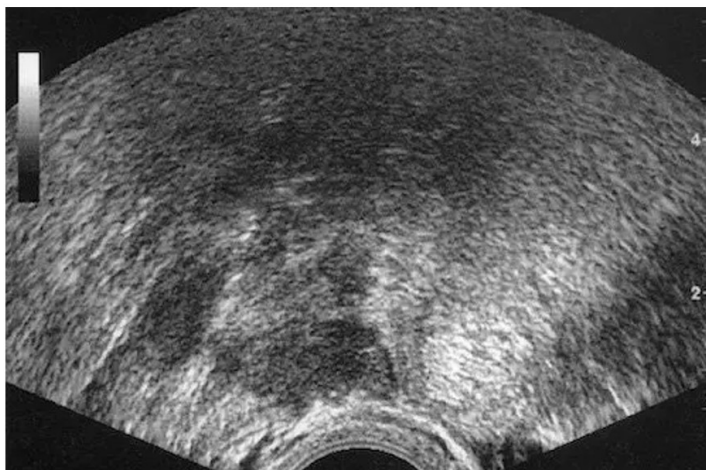
CA-125 wykrywa się za pomocą badań tkankowych lub za pomocą testów serologicznych. Marker ten może być obecny w płynach ustrojowych takich jak płyn opłucnowy, otrzewnowy oraz płyn wypełniający torbiel jajnika. Próbek do badania nie należy pobierać przed lub w trakcie menstruacji, gdyż fizjologiczny wzrost tego markera może dawać wynik fałszywie dodatni.

Również nie powinno się przeprowadzać oznaczania markera do 2 tygodni od operacji, gdyż w związku z uszkodzeniem tkanek, poziom tego antygenu może wzrosnąć, dając wynik fałszywie dodatni.

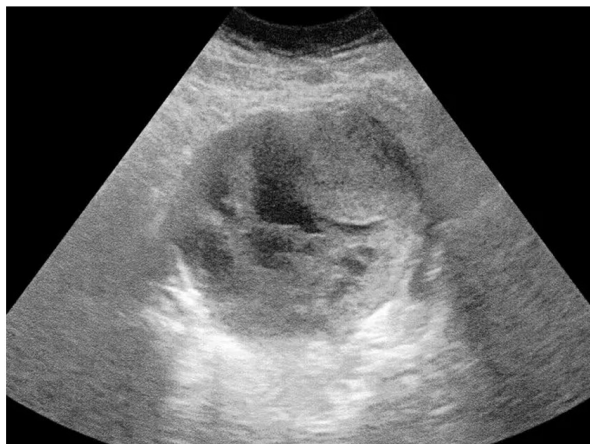
CA-125 wykazuje niską swoistość (zwłaszcza wśród kobiet z endometriozą, mięśniakami macicy lub będących w ciąży) i niską czułość (co spowodowane jest jego podwyższeniem jedynie u połowy pacjentek z wczesnym stadium choroby) [9]. Inne badania, przeprowadzone wśród kobiet w wieku pomenopauzalnym wykazały, że test ma czułość od 69 do 87% i swoistość od 81 do 93%. Natomiast u kobiet przed menopauzą, czułość wynosiła od 50 do 74%, a swoistość od 69 do 78% [10]. Za górną granicę normy przyjmuje się stężenie 35 U/ml.

Przerzuty w raku jajnika objawiają się obecnością płynu w jamie brzusznej oraz płynu w jamie opłucnej. W przypadku podejrzenia przerzutów, zleca się wykonanie badania tomografii komputerowej (TK) miednicy oraz jamy brzusznej a także RTG klatki piersiowej. W przypadku wodobrzusza, wykonuje się punkcję jamy otrzewnej z pobraniem płynu w celu przeprowadzenia badania cytologicznego.

Jednym z zaleceń diagnostycznych jest również obliczenie indeksu ryzyka raka jajnika (ang. risk of malignancy index RMI) przy obliczaniu którego bierze się pod uwagę trzy składniki: wartość stężenia CA-125, indeks USG (U) oraz stan menopauzalny (M). Wskaźnik RMI obliczany jest ze wzoru $RMI = U \times M \times CA-125$. Przy wyniku RMI powyżej 200, zaleca się skierowanie pacjentki do odpowiednich ośrodków zajmujących się leczeniem nowotworów złośliwych jajnika [11].



Rycina 1. Zdjęcie ultrasonograficzne prawidłowego prawego jajnika bez pęcherzyków [12].



Rycina 2. Zdjęcie ultrasonograficzne guza jajnika o średnicy 17 cm ^[12].

2.2. Leczenie standardowe

Podstawowe leczenie raka jajnika obejmuje terapię skojarzoną: operację cytoredukcyjną w celu usunięcia guza bądź zmniejszenia jego masy oraz chemioterapię. W przypadku I i II stadium zaawansowania choroby, standardem jest histerektomia (usunięcie macicy) i obustronne wycięcie przydatków. U niektórych pacjentek w wieku przedmenopauzalnym, z planami rozrodczymi, stosuje się leczenie oszczędzające, polegające na usunięciu jedynie jajnika, na którym występuje zmiana nowotworowa (pod warunkiem, że nie występuje naciek jego torebki), w celu zachowania płodności. W przypadku III i IV stadium zaawansowania nowotworu, dokonuje się całkowitej cytoredukcji, w celu usunięcia wszystkich widocznych, makroskopowych zmian. Stosuje się również operacje tzw. odroczone, które następują po 3 lub 4 cyklach chemii, aby guzy nowotworowe uległy zmniejszeniu i możliwe było ich usunięcie.

Obecny standard leczenia w przypadku chemioterapii opiera się na podawaniu chemii dwulekowej zawierającej cisplatynę z paklitakselem lub karboplatynę z paklitakselem.

Rak jajnika ma dużą tendencję do nawrotów. Dodatkowo, u wielu pacjentek ze wznową, rozwija się platynooporność, co sprawia, że leczenie pierwszego rzutu nie jest już tak skuteczne jak pierwotnie. Rokowania u tych chorych są bardzo złe. PTGO zaleca, aby takie pacjentki były zachęcane do udziału w badaniach klinicznych, w celu rozwinięcia nowych metod leczenia ^[13]. Obecnie na świecie prowadzone są badania nad wykorzystaniem m.in. immunoterapii, która daje obiecujące efekty np. w leczeniu czerniaka ^[14].

3. Innowacje w diagnostyce nowotworu jajnika – biopsja płynna ^[15]

Konwencjonalne metody diagnostyczne, takie jak biopsja tkankowa czy też metody serologiczne, jak wykrywanie biomarkerów m.in. CA-125, mają ograniczone zastosowanie kliniczne. Biopsja płynna jest nową metodą diagnostyczną polegającą na wykrywaniu charakterystycznych składników uwalnianych przez nowotwór do krążenia obwodowego. Do składników tych należą m.in. krążące nowotworowe DNA (ang. circulating tumour DNA ctDNA), krążące komórki nowotworowe (ang. circulating tumor cells CTCs), bezkomórkowe RNA (ang. cell-free mRNA cfRNA), TEPs (ang. tumor educated platelets TEPs) oraz egzosomy. Składniki te mogą być uwalniane z komórek guza w wyniku sekrecji lub rozpadu komórek w procesie apoptozy bądź nekrozy. Dają one pełny obraz schorzenia i mają zastosowanie diagnostyczne oraz prognostyczne. Coraz więcej jest dowodów, wskazujących na to, że biopsja płynna może w znaczący sposób poprawić efekty leczenia klinicznego raka jajnika. Omawiana metoda diagnostyczna pozwala na wczesne rozpoznanie choroby, jeszcze przed wystąpieniem objawów. Zaletą biopsji płynnej jest również wcześniejsze wykrywanie ewentualnych nawrotów choroby oraz dokładniejsze monitorowanie leczenia.

3.1. CTCs

To komórki nowotworowe, oddzielone od ogniska pierwotnego, które znajdują się i krążą we krwi obwodowej. Opracowano wiele metod izolacji CTCs opartych na ich właściwościach fizycznych (tj. na rozmiarze, gęstości, ładunku elektrycznym oraz zdolnościach inwazyjnych), biologicznych (tj. pozytywnych markerach nabłonkowych, negatywnych markerach krwiotwórczych). Możliwość wykrycia CTCs we krwi ma ważne znaczenie prognostyczne, gdyż pozwala na identyfikację potencjalnych mikroprzerzutów, heterogeniczności guza, zmian przednowotworowych oraz na obserwację ewolucji nowotworu w czasie. Wykrycie CTCs z próbek krwi stanowi pewną trudność ze względu na niskie stężenie tych komórek - około 1 CTC na 1 000 000 krążących komórek we krwi. Po odłączeniu z guza, CTCs ulegają przejściu epithelialno-mezenchymalnemu (ang. epithelial-mesenchymal transition EMT), czyli fenotypowej transformacji prowadzącej do zmiany ich polarności, morfologii i markerów komórkowych (np. dochodzi do ekspresji cząsteczki adhezyjnej komórek nabłonkowych; ang. epithelial cell adhesion molecule EpCAM), w celu uzyskania zdolności do migracji i zwiększonej inwazyjności. W wyniku

tego procesu, CTCs są zdolne do pokonania bariery jaką stanowi śródbłonek naczyń krwionośnych. Komórki, które przeszły do krwiobiegu, ulegają w większości apoptozie lub nekrozie z powodu m.in. rozpoznania przez układ immunologiczny. Tylko niektóre unikają śmierci, przez zwiększone wydzielanie czynników wzrostu, zmniejszenie ilości receptorów śmierci czy nadekspresję ligandów antyapoptycznych. Dodatkowo, CTCs zapobiegają aktywacji komórek NK i limfocytów T poprzez zaprogramowaną produkcję ligandu śmierci PD-1. Unikają one również fagocytozy przez makrofagi, poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek CD47 na swej powierzchni.

Obecnie do izolacji CTCs wykorzystywany jest CellSearch - urządzenie pozwalające na izolację komórek nowotworowych, dzięki zastosowaniu powinowactwa immunologicznego. Wykrywa ono CTCs w oparciu o pozytywną ekspresję cząsteczki EpCAM. Niestety, zastosowanie CellSearch w nowotworze jajnika może być ograniczone z powodu niskiej ekspresji EpCAM przez komórki nowotworowe. Dodatkowo, w badaniach z udziałem nowozdiagnozowanych kobiet z nowotworem złośliwym jajnika i pacjentek ze wznową, nie znaleziono zależności między liczebnością CTCs a obrazem klinicznym choroby [16]. W kolejnych badaniach również zanotowano niski poziom ekspresji EpCAM w przypadku nabłonkowego nowotworu jajnika (ang. epithelial ovarian cancer EOC) [17]. Ograniczenia te częściowo ominięto, opracowując alternatywne działanie, oparte o różne biofizyczne właściwości CTCs (m.in. wielkość, potencjał inwazyjny). Zastosowano metodę zwaną wzbogacaniem CanPatrol, w której CTCs były filtrowane przez porowate membrany o średnicy 8 μm i wykrywane za pomocą hybrydyzacji RNA in situ (RNA – ISH). Subpopulacje CTCs zidentyfikowano, wykorzystując epitelialne (EpCAM, CK8/18/19), mezenchymalne (vimentin i Twist) oraz nabłonkowo-mezenchymalne markery hybrydowe [18].

Do nowatorskich metod należy również wykorzystywanie unikalnych właściwości CTCs, które mają zdolność „atakowania” i pobierania cząsteczek adhezyjnych macierzy (ang. cell adhesion molecules CAM), podczas gdy nie nowotworowe komórki lub martwe komórki nowotworowe nie posiadają tej umiejętności [19]. Wykorzystano test inwazji komórek, który wzbogaca i identyfikuje komórki w oparciu o inwazję CAM (CAM+) i ekspresję standardowych markerów nabłonkowych (Epi+) u 71 pacjentek z podejrzeniem nowotworu. Badania te wykazały znacznie wyższą średnią liczbę CTCs u pacjentek w stadium III/IV wynoszącą 43,3 CTC/ml krwi, w porównaniu do 6 CTC/ml u pacjentek w stadium I/II oraz 0 CTC/ml u kobiet ze zmianami łagodnymi. Inwazyjne CTCs można wykryć u większości pacjentek z rakiem jajnika,

ponadto wyższa liczba CTCs może wskazywać na późniejsze stadium choroby.

Inne, nowoczesne techniki są oparte o powinowactwo immunologiczne, skierowane w stronę kilku ligandów jednocześnie (m.in. EpCAM, receptor kwasu foliowego alfa, receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2) oraz nanocząsteczki skoniugowane z przeciwciałem przeciw mucynie 1 (MUC1) [20, 21].

Pomimo wielu nowatorskich metod oznaczania CTCs, ich niskie stężenie w krążeniu obwodowym nadal stanowi pewne wyzwanie. Dlatego konieczne są dalsze badania, które pozwoliłyby zoptymalizować wykrywanie oraz izolację tych komórek w raku jajnika.

3.2. ctDNA

W warunkach fizjologicznych osocze zawiera cfDNA (cell free DNA), czyli bezkomórkowe DNA, pochodzące z komórek, które uległy apoptozie lub nekrozie. Znaczący wzrost cfDNA obserwuje się w wyniku uszkodzenia tkanek, intensywnego wysiłku fizycznego, ogólnoustrojowego zakażenia organizmu, po radioterapii, a także podczas ciąży. DNA pochodzenia nowotworowego obecne w osoczu, oznacza się jako ctDNA. Nowotwory zawierają unikalne zmiany genetyczne, pozwalające na odróżnienie ctDNA od cfDNA. Popularna hipoteza zakładała, że duża część cfDNA jest uwalniana z komórek, które zostały zniszczone w wyniku niedotlenienia, w mikrośrodowisku guza nowotworowego (ang. tumor microenvironment TME). Ostatnie badania potwierdziły, że poziom cfDNA we krwi jest wyższy u pacjentek z rakiem jajnika (180 ng/ml, przy czym u zdrowych kobiet: 30 ng/ml). Oznaczanie cfDNA może służyć jako narzędzie diagnostyczne w przypadku tego schorzenia - analiza genomowa ctDNA może dostarczyć cennych informacji prognostycznych i predykcyjnych. W porównaniu do CTCs, stężenie ctDNA w osoczu jest dużo wyższe, a więc i łatwiejsze do oznaczenia w biopsji płynnej. Analiza ctDNA w osoczu polega na identyfikacji specyficznych dla danego nowotworu mutacji przy wykorzystaniu różnych technologii: cyfrowego PCR (ang. Digital polymerase chain reaction dPCR) oraz sekwencjonowania nowej generacji (ang. Next Generation Sequencing NGS). Analiza ctDNA może być również wykorzystywana do identyfikacji specyficznych wzorców metylacji nowotworu u pacjentów z rakiem jajnika, przy użyciu technik takich jak PCR specyficzny dla metylacji (ang. methylation-specific PCR MSP), test metylacji za pośrednictwem mikromacierzy, sekwencjonowanie wodorosiarczynu o zmniejszonej reprezentacji (ang. reduced representation bisulfite

sequencing RRBS), ukierunkowane sekwencjonowanie wodorosiarczanowe o bardzo wysokim pokryciu (ang. targeted ultra-high coverage bisulfite sequencing TUC-BS), PCR specyficzne dla metylacji w czasie rzeczywistym (ang. real-time methylation specific PCR RT-MSP) i multipleksowe zagnieżdżone metylowane specyficzne PCR (ang. multiplex nested methylated specific PCR MN-PCR). Główną metodą wykrywania metylowanego ctDNA w surowicy pacjentów z rakiem jajnika jest PCR MSP. Granica wykrywalności tego badania wynosi 0,01%, z wysoką czułością (>85%) i swoistością (>90%) dla detekcji różnie metylowanych ctDNA [20].

Pomimo tego, że analiza ctDNA z osocza jest najbardziej preferowaną obecnie metodą, to nadal poszukiwane są alternatywy. Obecnie ocenia się przydatność wymazów z szyjki macicy w diagnostyce raka jajnika i macicy. Przeprowadzono także badania próbek pochodzących z płukania jamy macicy i jak dotąd ich analiza wskazała, że mogą stanowić realną metodę wczesnego diagnozowania raka jajnika. Zaczęto także opracowywać nowe techniki oparte na próbkach moczu czy próbkach z pochwy, które potencjalnie mogą być wykorzystywane do oceny ctDNA. Metody te wciąż wymagają badań w celu wykazania ich przydatności diagnostycznej [15].

3.3. cfRNA

Bezkomórkowe RNA, obecne w surowicy czy innych płynach ciała, stanowią źródło wiedzy na temat danego nowotworu. Ich wartość diagnostyczną oraz prognostyczną wykazano w wielu badaniach. W 2008 roku przeprowadzono badanie, w którym wykazano wyższe stężenie 8 egzosomalnych miRNA w surowicach pacjentek z rakiem jajnika w porównaniu do próby kontrolnej. Natomiast nie określono związku między stężeniem tych cząsteczek a stopniem zaawansowania choroby [22].

Odkrycia te zostały uwierzytelnione kilkoma innymi badaniami, potwierdzającymi, że stężenie miRNA w surowicy pacjentek chorujących na raka jajnika jest wyższe w porównaniu z surowicą kobiet z łagodnymi nowotworami gonady. W kolejnych analizach odkryto, że różne poziomy ekspresji miRNA-200c korelują ze stopniem zaawansowania raka jajnika, przy czym bardziej zaawansowane guzy mają niższe poziomy miRNA-200c i wyższe miRNA-141 [23]. W kolejnych latach przeanalizowano siedem egzosomalnych miRNA (miRNA-21, -93, -141, -145, -200a, -200b oraz -200c) surowicy. Zauważono, że miRNA -145, -200a i -200b występują w zbyt niskim stężeniu w surowicy, aby mogły spełniać rolę serologicznych biomarkerów. W badaniu

tym jednak potwierdzono, że miRNA-200c i miRNA-145 są najbardziej specyficznymi i wrażliwymi markerami dla różnych stadiów raka.

cfRNA posiada ogromny potencjał diagnostyczny oraz prognostyczny. Jednak nadal obecne są pewne ograniczenia, które uniemożliwiają wprowadzenia tej metody diagnostycznej na szerszą skalę. Należą do nich m.in. trudniejsza izolacja w porównaniu z ctDNA, niestabilna cząsteczka RNA, a przez to brak metod, które pozwoliłyby stosować tą metodę w warunkach klinicznych.

3.4. TEPs (ang. tumour educated platelets)

Płytki krwi w TME w znaczny sposób wpływają na jego rozwój. Potwierdzono, że trombocytopenia lub trombocytoza mają znaczący wpływ na złe rokowanie pacjentek z rakiem jajnika. „Edukacja płytek krwi”, oznacza transfer różnych biomolekuł z komórek nowotworowych do wnętrza płytek krwi, co powoduje zmianę profilu RNA trombocytów. Kluczowymi zaletami oznaczania TEPs, jako markerów nowotworowych, jest ich wysoka liczebność, łatwość izolacji oraz wysoka jakość uzyskanego RNA. TEPs posiadają dynamiczny profil mRNA, którego analiza dostarcza wielu użytecznych informacji diagnostycznych w raku jajnika. Poprzez sekwencjonowanie RNA, zbadano potencjał diagnostyczny TEPs u pacjentów onkologicznych i wykazano, że dzięki oznaczaniu tego markeru, możliwe jest odróżnienie osób z nowotworem od populacji zdrowej z dokładnością 96%. Ponadto, dzięki analizie materiału pochodzącego z TEPs można określić pierwotne ognisko nowotworu z dokładnością 71% oraz z precyzyjnością 80% odróżnić wczesne stadium nowotworu od łagodnych patologii ^[24]. Analiza TEP z komplementarną analizą ctDNA lub CTC mogą stanowić podstawę diagnostyczną onkologii w przyszłości.

3.5. Egzosomy

Egzosomy to pęcherzyki zewnątrzkomórkowe o średnicy 30-100 nm, otoczone dwuwarstwą fosfolipidową. Są uwalniane z większości komórek eukariotycznych, a także z komórek nowotworowych. Zawierają różne kategorie białek m.in. białka biorące udział w prezentacji antygenów (MHC klasy I lub II, CD1), białka cytoszkieletu (tubulinę, aktynę, filamenty aktynowe), białka cytoplazmatyczne, białka związane z transdukcją sygnału (kinazy białkowe, białka G), białka szoku cieplnego (HSP 70, HSP 90), jak również niektóre białka pochodzące z komórek guza nowotworowego (ligand Fas - FasL).

Oprócz białek, egzosomy zawierają kwasy nukleinowe tj. DNA, mRNA, miRNA i niekodujące RNA, które poprzez modulowanie ekspresji i translacji innych białek, odgrywają rolę w angiogenezie, egzocytozie oraz nowotworzeniu. Ich składnikiem są także lipidy, które utrzymują strukturę pęcherzyka i mogą odgrywać rolę cząsteczek sygnałowych. Podstawowym zadaniem egzosomów jest transport molekuł, przez co odgrywają ważną rolę w procesie komunikacji międzykomórkowej, mają zdolność do indukowania sygnału, prezentacji antygenów, ale również wpływają na regulację immunologiczną, co jest szczególnie istotne dla komórek nowotworowych. Oprócz tego wspierają inwazję nowotworową, dzięki zawartym w sobie cząsteczkom (miRNA-200 oraz miRNA-222-3p) oraz w znacznym stopniu odpowiadają za oporność na leczenie, dzięki obecności miRNA-21 oraz aneksyny A3, wykrytej także w pęcherzykach wywodzących się z opornych na leczenie nowotworów jajnika [25].

Egzosomy są bardzo obiecującym narzędziem diagnostycznym. Obficie występują w surowicy i innych płynach ciała, a ich pobranie jest mało inwazyjne lub nieinwazyjne. Są także cząsteczkami bardzo stabilnymi i odpornymi na wszelkie oddziaływania zewnętrzne, przez wiele miesięcy czy też lat. Biomolekuły przenoszone przez nie, są specyficzne dla danego guza i korelują z zaawansowaniem choroby i rokowaniem. W porównaniu z egzosomami pochodzącymi z łagodnych zmian w jajnikach, egzosomy z raka jajnika zawierają znacznie podwyższony poziom TGF- β 1 i antygeny związane z czerniakami (MAGE3 i MAGE6), które są potencjalnymi markerami do odróżnienia nowotworów łagodnych od złośliwych. W innych badaniach wykazano zależność między poziomem ekspresji białka (Claudin 4) w pęcherzykach pochodzących z komórek rakowych a stadium zaawansowania choroby. Ponadto, profil miRNA egzosomów dostarcza wiele wartościowych informacji diagnostycznych. Ostatnie badania udowadniają, że w przebiegu raka jajnika obserwuje się podwyższony poziom miRNA-21, miRNA-141, miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-203, miRNA-205 i miRNA -214 w surowicy krwi pacjentek.

Pomimo potencjalnej wartości oznaczania egzosomów w diagnostyce, nadal istnieje wiele problemów m.in. natury technicznej. Największą przeszkodą są ograniczenia metod izolacji czystych egzosomów. Ostatnio zgromadzone dane sugerują, że specyficzny stan mikrośrodowiska nowotworowego wpływa znacząco na ilość i zawartość egzosomów, a na ich wydzielanie wpływa wiele czynników: stres, niedotlenienie, rodzaj nowotworu. Dlatego nadal potrzebne są dalsze badania, które mogłyby umocnić tezę praktycznego zastosowania egzosomów w diagnostyce.

3.6. Podsumowanie biopsji płynnej

Postępy technologiczne w obszarze analityki molekularnej w ostatniej dekadzie, doprowadziły do coraz większego zainteresowania tematem biopsji płynnej w diagnostyce. Jednym z głównych zalet tego rodzaju biopsji, w odróżnieniu do biopsji tradycyjnych, jest dużo wcześniejsza wykrywalność nowotworów, co pozwala na szybsze postawienie diagnozy, wcześniejsze rozpoczęcie leczenia, a w konsekwencji na uzyskanie lepszych rokowań. Również pobranie materiału do badań jest znacznie mniej inwazyjne jako, że w tym celu pobierana jest próbka krwi obwodowej, co istotnie zmniejsza ryzyko powikłań. Wiedza, na temat potencjalnych markerów nowotworowych obecnych we krwi, znacząco się w ostatnich latach poszerzyła, natomiast ich oznaczanie nadal sprawia współczesnej medycynie wiele trudności, które wymagają dalszej pracy i badań.

4. Supresyjne działanie komórek nowotworowych

Nowotwory wykształciły wiele sposobów „ucieczki” spod regulacji układu odpornościowego, co sprawia, że stają się dla niego niezauważalne. Należą do nich m.in.: generacja zaburzeń w prezentowaniu antygenów nowotworowych limfocytom T, wytwarzanie cytokin o działaniu supresyjnym na układ immunologiczny czy hamowanie aktywacji komórek odpornościowych, np. blokowanie czynności limfocytów T CD8⁺ poprzez interakcję znajdującego się na ich powierzchni receptora PD-1 z jego ligandem PD-L1, znajdującym się na komórkach, które uległy procesowi nowotworzenia. Poznawanie mechanizmów interakcji i wpływu komórek nowotworowych na komórki układu odpornościowego, pozwala na opracowywanie coraz to efektywniejszych i bardziej precyzyjnych metod leczenia np. immunoterapii [26]. Natomiast w raku jajnika istnieją pewne ograniczenia w tej metodzie, związane z intensywnie supresorowym działaniem TME [27].

4.1. Limfocyty Treg

Limfocyty regulatorowe Treg należą do komórek układu odpornościowego, które hamują odpowiedź immunologiczną organizmu. Znajdują się w dużym stężeniu w TME i są podstawowym sposobem ucieczki nowotworu spod działania tego układu, „wyciszając” jego funkcjonowanie, poprzez inhibicję proliferacji efektorowych limfocytów T oraz hamowanie produkcji

cytokin. Wytwarzane przez komórki nowotworowe cytokiny, takie jak IL-10 oraz TGF- β , hamują nasilone reakcje zapalne oraz stymulują powstawanie limfocytów Treg [28]. Egzosomy, wydzielane przez komórki guza, zawierają enzym: 2,3 -dioksygenazę indolaminy (IDO) rozkładający tryptofan, który jest aminokwasem niezbędnym do proliferacji i przeżycia limfocytów T. Ponadto, podczas metabolizowania tryptofanu powstaje kwas kinureninowy, który indukuje różnicowanie limfocytów w limfocyty Treg [29].

4.2. Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (MDSC)

Komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego stanowią grupę dojrzałych i niedojrzałych komórek szpikowych. Nie występują one u osób zdrowych, z powodu ich dalszego różnicowania w dojrzałe granulocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne. Natomiast u pacjentów onkologicznych, wskutek obecności różnych cytokin, dochodzi do zahamowania różnicowania MDSC i zwiększenia ich odsetku w surowicy krwi. Występują w mikrośrodowisku raka jajnika i wykazują silne właściwości immunosupresyjne. Wytwarzają m.in. cytokiny takie jak: IL-10, transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β TGF - β), enzym IDO czy też czynnik martwicy nowotworów α (ang. tumour necrosis factor α TNF- α) [29, 30]. W 2017 roku, Horikawa i in. wykazali, prowadząc badania na myszach, że liczba MDSC zwiększa się w raku jajnika pod wpływem czynnika wzrostu śródbłonna naczyńowego (ang. vascular endothelial growth factor VEGF) [31]. Czynnik ten, jest także wytwarzany przez MDSC, co sprzyja angiogenezie i rozprzestrzenieniu nowotworu. Liczba MDSC zwiększa się również pod wpływem cytokin prozapalnych, wytwarzanych przez komórki guza, np. IL-6 [30].

4.3. Makrofagi związane z nowotworem (ang. tumour associated macrophages TAMs)

TAMs to komórki znajdujące się w mikrośrodowisku guza i odgrywające znaczącą rolę w przetrwaniu i rozwoju komórek nowotworowych. Odpowiadają za tworzenie immunosupresyjnego środowiska nowotworu, poprzez wydzielanie mediatorów stanu zapalnego, czynników wzrostu, cytokin, chemokin. Wpływają na angiogenezę oraz promują proces tworzenia się przerzutów. Dodatkowo, odpowiadają za oporność nowotworu na leczenie [32]. TAM dzieli się na dwa typy fenotypowe o przeciwstawnych funkcjach: M1 i M2 (tab. 1). TAM o fenotypie M1 są aktywowane klasycznie - przez interferon

gamma (IFN- γ) oraz TNF- α . Wywierają cytotoksyczne działanie w stosunku do komórek nowotworowych. TAM o fenotypie M2 ulegają aktywacji pod wpływem: TGF- β , IL-4, IL-13 i promują rozwój guza. Makrofagi różnią się również profilem sekrecyjnym - M1 uwalniają reaktywne formy tlenu, półprodukty azotowe oraz cytokiny prozapalne (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 i TNF), które wywierają działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworu. Makrofagi M2 wydzielają głównie czynniki wzrostu: naskórkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor EGF), czynnik wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor FGF), VEGF, które promują wzrost oraz angiogenezę w obrębie nowotworu. Komórki guza wydzielają IL-10, CCL2/3/4/5/7/8, CXCL12, VEGF oraz płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet derived growth factor PDGF), które wpływają na różnicowanie monocytów w makrofagi o fenotypie M2, dlatego one są często obserwowane w tkankach nowotworowych. Przeprowadzono badania, w których zaobserwowano, że podwyższony stosunek M1/M2 TAM wpływa na zwiększenie długości życia o 5 lat ^[33]. W innym badaniu potwierdzono, że TAM odgrywają znaczącą rolę w promowaniu wczesnych przerzutów raka jajnika do jamy otrzewnej poprzez wydzielanie EGF ^[34]. Komórki nowotworowe oraz TAM oddziałują na siebie wzajemnie. Komórki raka jajnika odgrywają kluczową rolę w promowaniu polaryzacji komórek TAM M2, natomiast TAM odpowiadają za oporność komórek rakowych gonady na cisplatinę.

Tabela 1. Porównanie makrofagów M1 i M2 ^[33].

	M1	M2
Główne funkcje	Działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych	Promocja rozwoju guza
Aktywowane przez	IFN- γ , TNF- α	TGF- β , IL-4, IL-13
Profil sekrecyjny	reaktywne formy tlenu, półprodukty azotu oraz IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 i TNF	EGF, FGF, VEGF

4.4. Fibroblasty związane z nowotworem (ang. cancer-associated fibroblasts CAFs)

CAFs to fibroblasty obecne w zrębie guza, odgrywające ważną rolę w jego rozwoju i w oporności na leki. Komórki te wydzielają cytokiny prozapalne tj. COX-2, CXCL1, CCL5, CXCL11, IL-6, które zwiększają proliferację komórek nowotworowych oraz umożliwiają przejście epithelialno-mezenchymalne. W raku jajnika wyróżnia się 4 subpopulacje fibroblastów (CAF-S1-CAF-S4),

które zostały sklasyfikowane na podstawie posiadanych markerów błonowych: FAP, α -SMA, CD29, PDGFR β , FSP1, i kaweoliny 1 (CAV1) [35].

4.5. Adipocyty

Istnieje wiele badań na temat ingerencji otyłości w rozwój i rokowania raka jajnika, w których potwierdzono jej negatywny wpływ na przebieg schorzenia.

Adipocyty wydzielają cytokiny takie jak, IL-6, IL-8, MCP-1, tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 (TIMP-1) oraz adiponektynę, mające znaczący wpływ na wystąpienie przerzutów oraz progresję choroby [36].

Wykazano również, że metabolizm lipidów kształtuje TME, co może wpływać na efektywność immunoterapii. Strategie leczenia oparte o tą wiedzę, mogą potencjalnie zwiększać skuteczność immunoterapii u pacjentek.

5. Nowotwór jajnika – immunoterapia i terapia inhibitorami PARP

Immunoterapia jest obecnie prężnie rozwijającą się dziedziną medycyny, zwiększającą efektywność leczenia w wielu rodzajach nowotworów. Natomiast TME raka jajnika jest środowiskiem silnie immunosupresyjnym, co sprawia, że immunoterapia nie przyniosła do tej pory spektakularnych efektów ani żadnego przełomu w przypadku leczenia tego schorzenia. Większość metod jest w fazie badań klinicznych, natomiast inne np. bewacyzumab (przeciwciało monoklonalne) jest już jednym ze standardów leczenia w krajach zachodnich. Również metody blokujące systemy naprawy DNA komórek nowotworowych, tj. terapia inhibitorami PARP, przyniosły znaczące osiągnięcia w leczeniu pacjentek z mutacją genu BRCA1/2.

5.1. Terapie nacelowane przeciwko IL-6

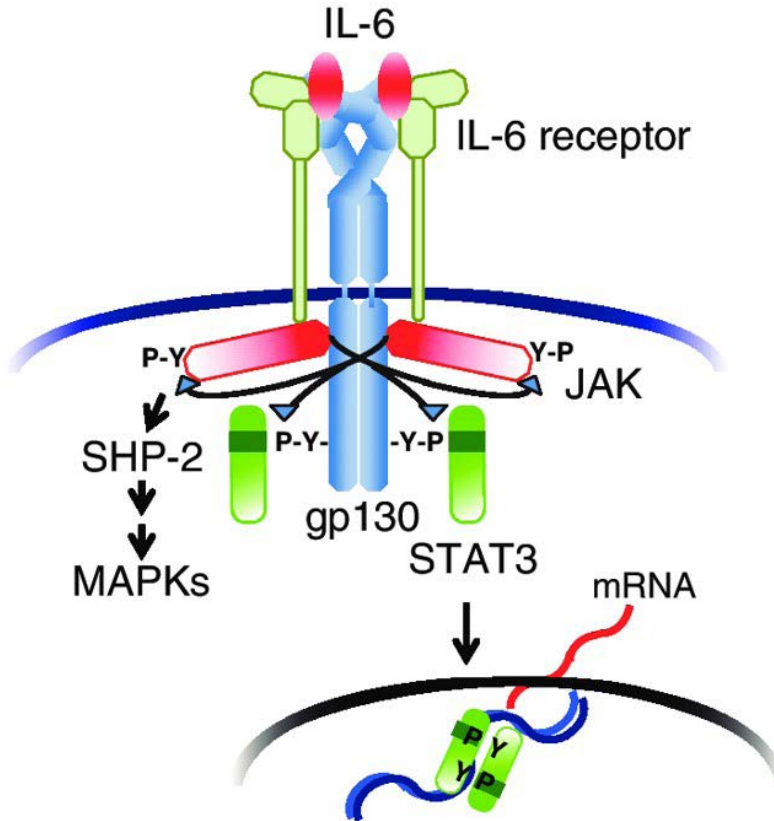
Cytokiny są małymi cząsteczkami białkowymi, do których zaliczamy m.in. chemokiny, interleukiny i interferony, odpowiedzialnymi za różnicowanie, wzrost i proliferację różnych komórek, szczególnie odpornościowych. Ich główna funkcja polega na regulowaniu różnych reakcji układu immunologicznego [37].

W raku jajnika szczególnie zwrócono uwagę na prozapalną IL-6 (obecną w TME), w przypadku której dowiedziono, że promuje proliferację komórek nowotworowych, wpływa na inwazyjność nowotworu (poprzez zwiększanie

wydzielania VEGF, stymulującego angiogenezę, co zwiększa ryzyko przerzutów) oraz jego chemiooporność. Wytwarzana jest przez komórki rakowe - TAMs i fibroblasty pod wpływem IL-1 β lub TNF- α [38]. Isobe i in. odkryli, że IL-6 jest wydzielana głównie przez makrofagi M2 związane z guzem nowotworowym [39].

Receptor IL-6 (IL-6R) składa się z łańcucha α , który jest odpowiedzialny za wiązanie ligandu oraz z łańcucha β (gp130), który przenosi sygnał do wnętrza komórki nowotworowej [37]. Związanie IL-6 przez receptor, aktywuje szlak przekazywania sygnału za pomocą kinaz tyrozynowych JAK i białek STAT3 (ryc. 3). Białka STAT3 ulegają fosforylacji, dimeryzacji i przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie funkcjonują jako czynniki transkrypcyjne, aktywujące ekspresję genów kodujących białka, które są odpowiedzialne za proliferację, różnicowanie, angiogenezę i hamowanie apoptozy (powstają białka antyapoptyczne takie jak: BCL-2, BCL-xL, surwiwina), co znacząco promuje rozwój nowotworu [38]. Zahamowanie szlaku JAK/STAT3, np. przez zastosowanie przeciwciał przeciwko IL-6 lub jej receptorowi, uczyniono celem wielu badań klinicznych. Terapie skierowane przeciwko tej interleukinie dały już obiecujące efekty w leczeniu choroby Castelmanna i reumatoidalnego zapalenia stawów (za pomocą tocilizumabu – humanizowanego przeciwciała monoklonalnego, wiążącego się swoiście z receptorem IL-6). W fazie II badania klinicznego z zastosowaniem siltuksymabu (przeciwciała monoklonalnego łączącego się z wysokim powinowactwem z IL-6) oceniono jego wpływ na płatynooporny rak jajnika. Badanie wykazało, że siltuksymab był dobrze tolerowany przez wszystkie osiemnaście pacjentek, które wzięły udział w badaniu, przy czym stabilizację choroby wykazano u ośmiu kobiet, z czego cztery były wolne od progresji nowotworu przez ponad 6 miesięcy. Natomiast nie wykazano znaczących efektów leczniczych - ani całkowitych, ani częściowych. W innym badaniu, 23 pacjentki z nawrotem raka jajnika wzięły udział w fazie I badania, w którym oceniano efekty podania karboplatyny z dokсорubicyną oraz tocilizumabem. Całkowitą odpowiedź zarejestrowano u trzech pacjentek, częściową – u ośmiu. Stabilizację choroby zaobserwowano u sześciu pacjentek, natomiast progresję - u trzech. W fazie II tego badania, gdzie zastosowano sam siltuksymab, podawany w trzech cyklach 29 pacjentkom z rakiem opornym na chemioterapię, ponownie nie wykazano poprawy u żadnej z nich, co sugeruje, że lek ten nie powinien być stosowany w formie monoterapii [40]. Z kolei, w badaniach in vitro, prowadzonych przez Tanga i in., zbadano cząsteczkę WP1066, która wykazała zdolność do inhibicji fosforylacji białka STAT3 i tym samym do hamowania całego szlaku, co zmniejszyło zdolność komórek

nowotworowych jajnika linii SKOV3 i komórek opornych na cisplatynę do proliferacji, migracji oraz umożliwiło indukowanie w nich apoptozy. Badania te ukazały cząsteczkę WP1066 jako obiecujący kierunek rozwoju nowych terapii, w celu zniesienia efektów wywoływanych przez IL-6 ^[41].



Rycina 3. Budowa i mechanizm działania receptora IL-6 ^[42].

5.2. Szczepionki

Celem szczepionek w terapii nowotworów jest stymulacja komórek układu odpornościowego do proliferacji i różnicowania, poprzez zwiększenie ich ekspozycji na antygeny związane z guzem nowotworowym (ang. tumor-associated antigens, TAAs). Istnieją różnego rodzaju szczepionki: genetyczne, zawierające białka/peptydy oraz zawierające całe komórki ^[14]. Szczepionki mogą indukować odpowiedź układu immunologicznego na antygeny, które typowo charakteryzują komórki rakowe jajnika, np. mezotelinę, NY-ESO-1,

zmutowane białko p53 lub mogą być skierowane przeciwko nowopowstałym (w wyniku mutacji) cząsteczkom [28].

5.2.1. Szczepionki z rekombinowanym NY-ESO-1

Antygen NY-ESO-1 to cząsteczka należąca do antygenów rakowo-jądrowych (ang. cancer/testis antigen CTA), ulegająca fizjologicznej ekspresji głównie w męskich komórkach rozrodczych. W stanach patologii, ulega ekspresji w wielu typach nowotworów, w tym w raku jajnika – podczas jednego z badań stwierdzono jej występowanie u 19% pacjentek z 689 przebadanych [43]. Spostrzeżono również, że u kobiet z dodatnim wynikiem badania obecności NY-ESO-1, efektywność leczenia pierwszego rzutu była mniej skuteczna, a postać nowotworu bardziej agresywna. Ekspresja tego antygeny wzrasta wprost proporcjonalnie do stopnia zaawansowania schorzenia. Zdolność do spontanicznej indukcji humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej oraz duża immunogenność, czynią tę cząsteczkę obiecującym celem immunoterapii. Fakt, że występuje w komórkach zrakowaciałych, a nie w zdrowych, sprawia, że terapia oparta na tym antygenie jest znacznie mniej toksyczna dla nienowotworowych tkanek niż standardowa chemioterapia [44]. Odunsi i in. prowadzili badania kliniczne z użyciem rekombinowanych szczepionek rV-NY-ESO-1 i rF-NY-ESO-1 u 22 pacjentek z rakiem jajnika, u których wykazano ekspresję tego antygeny (tab. 2). U trzech pacjentek, jeszcze przed podaniem szczepionki, stwierdzono obecność przeciwciał anti-NY-ESO-1, których miano dodatkowo wzrosło po szczepieniu. Natomiast, u pozostałych 19 kobiet, w ośmiu przypadkach odnotowano pojawienie się przeciwciał w krótkim czasie po pierwszej dawce szczepionki rV-NY-ESO-1. Ponadto, w wyniku podania szczepionki, znacząco wzrosło miano limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺. U dziesięciu pacjentek z 22 (46% badanych) odnotowano widoczną odpowiedź limfocytów cytotoksycznych, a u 68% kobiet poddanych terapii, wykryto spontaniczną reakcję limfocytów pomocniczych, pełniących rolę wspomagającą względem komórek CD8⁺. Wzrost odpowiedzi limfocytów CD4⁺ lub jej indukcję de novo stwierdzono u 21 z 22 pacjentek poddanych badaniu klinicznemu, czyli 91% badanych.

Oprócz szczepionek rekombinowanych, badaniom klinicznym są również poddawane, m.in. szczepionki peptydowe/białkowe zawierające NY-ESO-1. Dostarczone, w ten sposób do organizmu, antygeny są następnie prezentowane przez komórki dendrytyczne (które należą do profesjonalnych komórek prezentujących antygen, tzw. APC) limfocytom, co pobudza ich

aktywację i proliferację, czego skutkiem jest wzrost ich populacji, co zaobserwowano właśnie w badaniu Odunsiego ^[45].

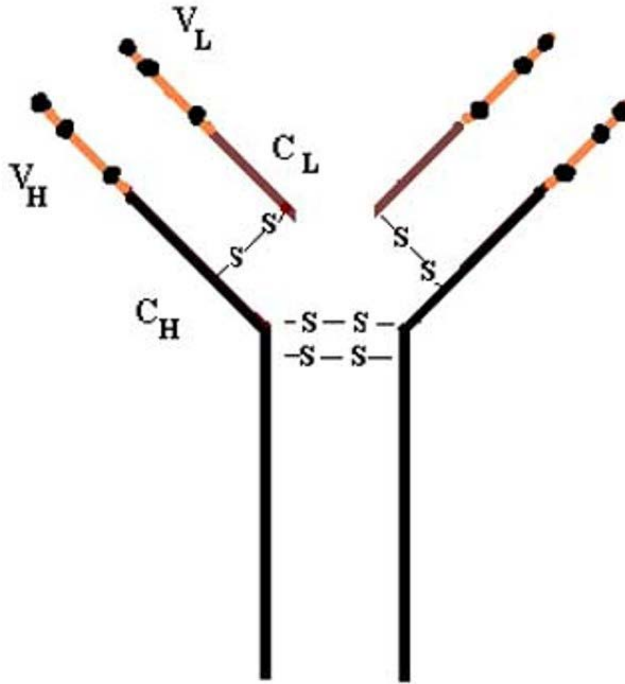
Tabela 2. Przedstawienie wyników badania klinicznego z użyciem rekombinowanych szczepionek rV-NY-ESO-1 i rF-NY-ESO-1 u pacjentek z rakiem jajnika; n = liczba pacjentek ^[45].

	Rak jajnika: n = 22
Obecność przeciwciał:	
Początkowo dodatnia	3
Początkowo ujemna	19
Serokonwersja	8/19 (42%)
Liczba osób, u których wykryto przeciwciała po szczepieniu	11/22 (50%)
Występowanie odpowiedzi limfocytów CD4⁺:	
Przed szczepieniem	15/22 (68%)
Po szczepieniu	20/22 (91%)
Występowanie odpowiedzi limfocytów CD8⁺:	
Przed szczepieniem	3/22 (14%)
Po szczepieniu	10/22 (45%)

5.3. Leczenie antyangiogenne; inhibicja VEGF za pomocą bewacyzumabu

VEGF jest podstawową substancją stymulującą angiogenezę w obrębie guza nowotworowego, co szczególnie sprzyja jego rozwojowi i tworzeniu przerzutów. Jest wydzielany m.in. przez komórki MDSC i makrofagi M2 w TME ^[30, 46]. Połączenie chemioterapii z bewacyzumabem, który łączy się z VEGF, znacząco poprawia rokowania pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika ^[47]. Dodatkowo, mogą być stosowane również leki łączące się z receptorem VEGF, uniemożliwiające funkcjonowanie tego czynnika. Do leków tych należy m.in. nintedanib ^[48]. Wspomniany bewacyzumab jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym produkowanym w komórkach jajnika chomika chińskiego (ryc. 4) ^[49]. W 2018 roku, amerykańska Agencja ds. Leków i Żywności zatwierdziła jego stosowanie w połączeniu z chemioterapią w przypadku stadium III i IV raka jajnika. Decyzję oparto na wynikach badania klinicznego, w którym włączono stosowanie tego przeciwciała do chemioterapii opartej na karboplatynie i palitakselu. Rezultatem było wydłużenie czasu bez progresji choroby z 13 do 18 miesięcy ^[50, 51]. Także w Unii Europejskiej, bewacyzumab w połączeniu ze standardową chemioterapią jest już obecnie

stosowany jako leczenie pierwszego rzutu, szczególnie u pacjentek z pierwszym nawrotem choroby [52]. Bewacyzumab, oprócz działania antyangiogenego, prowadzi również do normalizacji naczyń krwionośnych - zmniejszenia ich rozmiaru oraz do spadku ciśnienia płynu międzykomórkowego w guzach - zwiększając tym samym możliwość penetracji nowotworu przez leki cytotoksyczne [53].



Rycina 4. Struktura bewacyzumabu. Składa się z 6 specyficznych mysich sekwencji (czarne punkty), osadzonych na łańcuchach ciężkich i lekkich przeciwciała, połączonych ze sobą mostkami disiarczkowymi [54].

5.4. Inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) [55]

Obecnie w leczeniu nowotworów stosuje się związki, które mają zdolność uszkodzenia DNA. Jednak leki te, stosowane w trakcie chemioterapii, są nieswoiste - niszczą zarówno komórki nowotworowe jak i prawidłowe komórki organizmu, z czego wynika ich duża toksyczność.

Stale poszukuje się innych leków, które wykazywałyby mniejszą szkodliwość, i których zakres działania byłby ograniczony jedynie do tkanek nowotworowych z oszczędzeniem komórek prawidłowych organizmu. Obecnie,

jedną z najbardziej obiecujących terapii stosowanych w leczeniu raka jajnika jest leczenie przy pomocy inhibitorów PARP.

Inhibitory PARP wykazują toksyczne działanie jedynie względem komórek z mutacjami genów BRCA1 i BRCA2, które warunkują rozwój raka jajnika i piersi, a więc charakteryzują się dużą specyficznością, pozwalającą na oszczędzenie prawidłowych komórek.

5.4.1. Rola PARP w komórce

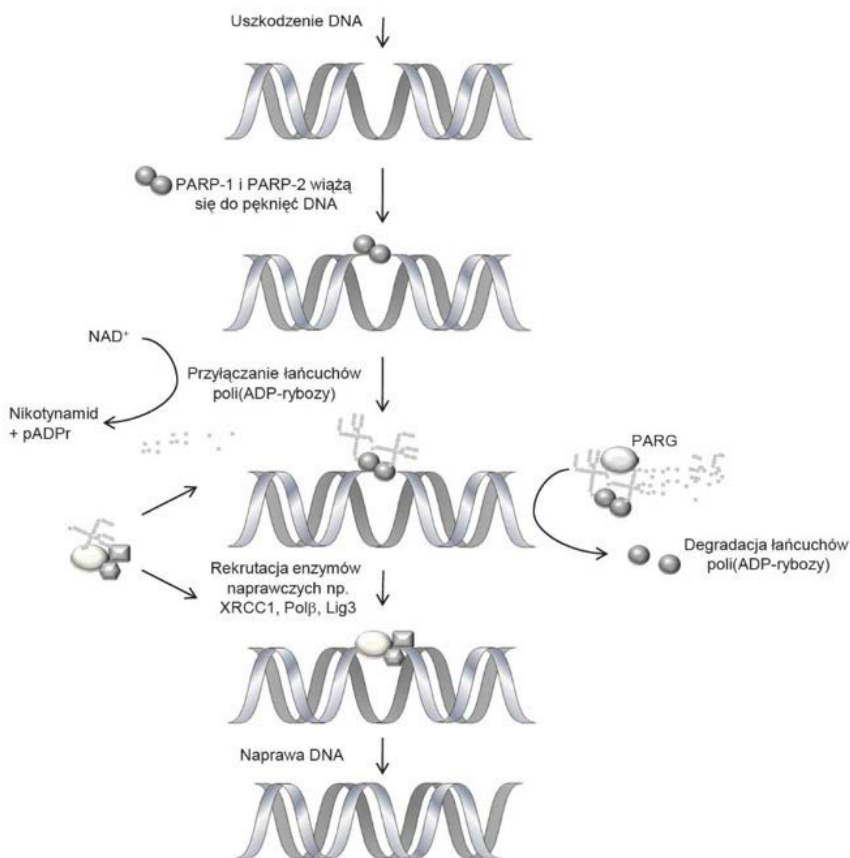
Obecnie znanych jest 18 polimeraz PARP, jednak dotychczas wykazano aktywność jedynie 6 z nich w odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórce. Cechą wspólną tych enzymów jest obecność domeny katalitycznej, przeprowadzającej reakcję poli(ADP-rybozy)lacji, która jest procesem przeprowadzanym w następstwie defektu DNA w komórce.

Aktualnie uważa się, że największy udział w naprawie uszkodzonego DNA mają polimerazy PARP-1 i PARP-2. W badaniach, przeprowadzonych na myszach, u których znokautowano gen dla PARP-1, zaobserwowano, że naprawa pęknięć, mimo że zaburzona, stale utrzymywała się na poziomie 10%, co oznacza, że główny udział w naprawie DNA odgrywa PARP-1.

5.4.2. Udział PARP-1 w naprawie

Główną rolą tego enzymu jest detekcja oraz sygnalizacja obecności pęknięć w helisie DNA (pojedynczych lub podwójnych). PARP-1, w postaci dimeru, przyłącza się do pękniętego DNA, co prowadzi do aktywacji jego domeny katalitycznej znajdującej się na C-końcu (ryc. 5).

Domena ta rozkłada NAD^+ do nikotynoamidu i ADP-rybozy, a w dalszej kolejności przyłącza powstałe cząsteczki ADP-rybozy do białek akceptorowych, tworząc polimery ADP-rybozy (PAR). PARP-1 za pośrednictwem PAR, informuje białka efektorowe o uszkodzeniu. Kolejną ważną rolą PARP-1 jest jej wpływ na strukturę chromatyny pękniętego DNA, co jest niezbędne do przeprowadzenia procesów naprawczych. Enzym ten przeprowadza poli(ADP-rybozy)lację histonów oraz innych białek chromatyny (na białka te oddziałują także wolne PAR), co w konsekwencji prowadzi do rozluźnienia chromatyny w miejscu uszkodzenia i pozwala na przyłączenie się odpowiednich białek naprawczych.



Rycina 5. Mechanizm działania polimeraz PARP-1 i PARP-2 [55].

5.4.3. Proces rekombinacji homologicznej (ang. homologous recombination HR) - białka BRCA 1 i BRCA2

Białka kodowane przez geny BRCA-1 i BRCA-2 pełnią ważną funkcję w komórce - odpowiadają m.in. za naprawę podwójnych pęknięć w DNA (DSBs) w procesie HR. Mutacje w tych genach mają swoje poważne konsekwencje – brak funkcjonalnego białka uniemożliwia naprawę podwójnych uszkodzeń DNA, co prowadzi do zaburzenia stabilności genomu, zapoczątkowującego proces nowotworzenia.

5.4.4. Działanie inhibitorów PARP w terapii przeciwnowotworowej

Inhibitory PARP zaburzają naprawę pojedynczych pęknięć w obrębie DNA. W konsekwencji, podczas replikacji może dojść do powstania DSBs z wolnym końcem, gdy polimeraza replikacyjna natrafi na pojedyncze pęknięcie. W prawidłowych komórkach doszłoby do naprawy DSBs, jednak w komórkach z uszkodzonymi genami rekombinacji homologicznej, proces ten nie może zajść. Taki stan powoduje fragmentację DNA oraz apoptozę komórki. Dlatego inhibicja PARP jest bardzo obiecującą metodą w przypadku leczenia nowotworów z mutacjami genów BRCA1 i BRCA2. Ponadto, zaletą terapii jest fakt, że stosowane inhibitory PARP nie będą wpływały na komórki, w których proces rekombinacji homologicznej zachodzi prawidłowo, dzięki czemu jest to metoda o niskiej toksyczności względem zdrowych tkanek.

5.5. Terapia z zastosowaniem limfocytów T z chimerowym receptorem antygenowym (ang. Chimeric Antigen Receptor T cell CAR-T)

Terapia komórkowa CAR-T to kolejna strategia leczenia przeciwnowotworowego. W terapii tej wykorzystywane są komórki odpornościowe pobierane od pacjenta, które są następnie modyfikowane w warunkach laboratoryjnych, aby wykazywały działanie przeciwnowotworowe. Do tej pory stosowano limfocyty T, ale trwają badania nad wykorzystaniem również innych komórek, np. komórek NK.

Chimeryczny receptor antygenowy (ang. chimeric antigen receptor CAR) to białko receptorowe, które składa się z wewnątrzkomórkowej domeny sygnałowej, domeny przezbłonowej, domeny rozdzielającej oraz fragmentu zewnątrzkomórkowego, który wiąże docelowy antygen, obecny na komórkach nowotworowych.

Obecnie terapia ta znalazła zastosowanie w leczeniu nowotworów hematologicznych, szczególnie ostrych białaczek limfoblastycznych i limfocytowych oraz chłoniaków złośliwych B-komórkowych. Dzięki uzyskanym efektom, zaczęto prowadzić badania w celu wykorzystania tej metody również w terapii innych nowotworów.

W 2020 roku A. Rodriguez-Garcia i in. wykazali, że limfocyty T, które posiadały cząsteczkę CAR specyficzną względem receptora Müllera hamującego substancję 2 (ang. Müllerian inhibiting substance type 2 receptor MISIR), wykazywały znaczną reaktywność i eliminowały nadekspresję MISIR w guzach *in vivo*. Grupa badaczy przeprowadziła eksperymentalne badania

in vitro i potwierdziła skuteczność MISIIR CAR-T w rozpoznawaniu różnych typów ludzkich linii komórkowych raka jajnika, które wykazują zazwyczaj dużą ekspresję tej cząsteczki [56].

W kolejnych badaniach, pogłębiono temat ekspresji MISIIR w guzach jajnika i zauważono, że procent ekspresji tych cząsteczek u różnych pacjentów znacznie się wahał od 20 do 95% [57].

W kolejnym badaniu, stwierdzono również zmienne poziomy ekspresji MISIIR w różnych warstwach guza od tego samego pacjenta, przy czym niektóre z nich wykazywały negatywny wynik dla barwienia MISIIR [58]. Mogłoby to wpływać na zmniejszoną skuteczność leczenia u takich pacjentów. W celu wykluczenia tego problemu, konieczne byłoby zastosowanie terapii celowanej w różne kombinacje antygenów obecnych na komórkach nowotworowych w tym samym czasie. Podobną alternatywę stosuje się w przypadku nowotworów krwi, gdzie wykorzystuje się limfocyty CAR-T skierowane przeciw cząsteczkom CD19, ale ze względu na to, że nie na wszystkich komórkach nowotworowych ulegają one ekspresji, zaczęto również stosować CAR-T celowane w inne antygeny takie jak np. CD22, aby zwiększyć efektywność terapii [59].

Obecnie metoda ta jest wykorzystywana u osób z nowotworami hematologicznymi i osiąga znakomite rezultaty. Powyższe badania wskazują, że podobne wyniki można osiągnąć również w przypadku raka jajnika, jednak wymagane są dalsze badania, aby efektywność tego leczenia była jak najwyższa.

3. Rokowania

Rokowania nie są zbyt pomyślne w przypadku raka jajnika. Ponad 70% nowotworów złośliwych tego narządu wykrywanych jest w III i IV stadium, m.in. z powodu niecharakterystycznych objawów. Dodatkowo, wiele kobiet (w 2019 roku było to ponad 3 miliony) uczęszcza na wizyty do ginekologa rzadziej niż raz w roku lub wcale. Są to osoby, które nie mają regularnie przeprowadzanych badań kontrolnych/profilaktycznych np. USG przezpochwowego, które pozwoliłoby wykryć groźne dla życia zmiany już na wczesnym etapie [60]. W tym zakresie wciąż są potrzebne kampanie edukacyjne, uświadamiające konieczność regularnego uczęszczania na ginekologiczne wizyty kontrolne.

Jednakże, wiele czynników i cząsteczek, ulegających ekspresji w komórkach rakowych jajnika, dodatkowo może pogorszyć rokowania wpływając na zwiększoną inwazyjność i agresywność nowotworu.

Do takich czynników należą opisane w podrozdziale 3.1.5. egzosomy, wydzielane przez komórki nowotworowe, które zawierają różne molekuly mogące sprzyjać m.in. tworzeniu przerzutów. Mogą zawierać cząsteczkę adhezyjną CD44, która reguluje proces tworzenia się przerzutów w sposób specyficzny dla danego narządu. Za pośrednictwem pęcherzyków, CD44 może trafić do komórek otrzewnej, gdzie zapoczątkuje tworzenie się nowych skupisk komórek nowotworowych, wywodzących się pierwotnie z jajnika. Ponadto, cząsteczki zawarte w pęcherzykach, mogą indukować chemiooporność - miR-214 bierze udział w indukcji oporności na platynę ^[61]. Sharma Shayna i in. udowodniła istnienie 12 białek w egzosomach linii komórkowej SKOV3, związanych z proliferacją, inwazyjnością i przerzutami nowotworu ^[62]. Wraz z postępem wiedzy o egzosomach, będzie można określić rokowania pacjentek na podstawie ekspresji ich zawartości. Można stwierdzić, że kobiety, u których dochodzi do powstawania dużych ilości pęcherzyków, mają gorsze rokowania niż pozostałe pacjentki, u których ich stężenie w płynach ciała jest mniejsze ^[51].

Innym czynnikiem, obecnym w gorzej rokujących rakach jajnika, jest czynnik transkrypcyjny Snail, odpowiedzialny za indukcję EMT, co powoduje, że komórki nowotworowe tracą cechy nabłonkowe w zamian za uzyskiwane cechy mezenchymalne, co prowadzi do zwiększenia ich inwazyjności. Jest to zjawisko wysoce niekorzystne. Dodatkowo, czynnik ten indukuje ekspresję chemokin: CXCL1 i CXCL2, które są ligandami receptora CXCR2 występującego na MDSC, co powoduje przyciąganie tych komórek do guza. Ich negatywne efekty zostały opisane już w podrozdziale 4.2 ^[63].

Obecność większej liczby receptorów dla IL-6 na komórkach nowotworowych wiąże się z gorszymi rokowaniami dla pacjentek. Większa liczba receptorów powoduje, że więcej cząsteczek interleukiny może się przyłączyć i przez to wywrzeć znaczniejszy wpływ na komórkę. Efekty działania IL-6 są zdecydowanie negatywne i wiążą się z zasadniczo gorszymi rokowaniami ^[40].

4. Wnioski

Tradycyjne metody leczenia dalej stanowią standardowy sposób leczenia pacjentek z rakiem jajnika. Obecnie rozwijana immunoterapia wraz z inhibitorami PARP może stanowić przyszłość leczenia, zwłaszcza, że u kobiet z nawrotem choroby, często rozwija się platynooporność, wobec której stosowana chemioterapia wykazuje zmniejszoną skuteczność. Silnie supresorowe TME nowotworu jajnika wciąż stanowi trudną do pokonania barierę, dlatego metody immunoterapii nie dają tak spektakularnych efektów jak w leczeniu innych

chorób. Mimo to, zastosowanie bewacyzumabu, pozwoliło wydłużyć czas bez progresji nowotworu chorym w badaniach klinicznych, przez co został on zaprobowany przez amerykańską FDA do standardowego leczenia. Inne metody takie jak CAR-T czy terapie nacelowane na IL-6 wymagają dalszych badań i konsultacji.

Również innowacyjne metody diagnostyczne mogą, w niedalekiej przyszłości, stać głównym sposobem diagnozowania, szczególnie, że jednym z głównych zalet biopsji płynnej, w odróżnieniu do biopsji tradycyjnej, jest dużo wcześniejsza wykrywalność nowotworu, często w niższym stadium, dzięki czemu rokowania pacjentek są znacznie lepsze. Jest ona również mniej inwazyjna, więc ryzyko powikłań jest zdecydowanie mniejsze.

Poznanie mechanizmów „ucieczki” nowotworu spod regulacji układu immunologicznego, umożliwiło tworzenie bardziej precyzyjnych metod leczenia, z uwzględnieniem poszczególnych procesów, zachodzących w obrębie guza. Mimo, że niektóre z nich wymagają udoskonaleń, stanowią obiecujący początek do wypracowania nowych, skutecznych sposobów terapii raka jajnika.

Referencje

- [1] Krajowy Rejestr Nowotworów; <https://onkologia.org.pl/pl/nowotwor-jajnika-czym-jest>.
- [2] Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*. 2009;80(6):609-616.
- [3] Diagnostyka raka jajnika; <https://diag.pl/pacjent/artykuly/diagnostyka-raka-jajnika>; Pobrane: 27.12.2022 r.
- [4] Polskie Towarzystwo Ginekologii Onkologicznej - Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka jajnika <https://ptgo.pl/rekomendacje/zalecenia-polskiego-towarzystwa-ginekologii-onkologicznej-dotycza%CC%A8ce-diagnostyki-i-leczenia-raka-jajnika>; Pobrane: 27.12.2022 r.
- [5] Zwrotnik raka Portal Onkologiczny, Rak jajnika - objawy, diagnostyka i rokowania <https://www.zwrotnikraka.pl/objawy-raka-jajnika-symptomy/>.
- [6] Gandhi T, Zubair M, Bhatt H. Cancer Antigen 125. [Updated 2023 Jan 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls

- Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562245/>.
- [7] Bast RC, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1983 Oct 13;309(15):883-7.
- [8] Kui Wong N, Easton RL, Panico M, Sutton-Smith M, Morrison JC, Lattanzio FA, Morris HR, Clark GF, Dell A, Patankar MS. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *J Biol Chem*. 2003 Aug 01;278(31):28619-34.
- [9] American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Gynecology. Practice Bulletin No. 174: Evaluation and Management of Adnexal Masses. *Obstet Gynecol*. 2016 Nov;128(5):e210-e226.
- [10] Myers ER, Bastian LA, Havrilesky LJ, Kulasingam SL, Terplan MS, Cline KE, Gray RN, McCrory DC. Management of adnexal mass. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2006 Feb;(130):1-145.
- [11] Antoni Basta, Mariusz Bidziński, Andrzej Bieńkiewicz, Paweł Blecharz, Lubomir Bodnar, Robert Jach, Paweł Knapp, Zbigniew Kojs, Jan Kotarski, Janina Markowska, Marcin Misiek, Jacek Sznurkowski, Łukasz Wicherek, Włodzimierz Sawicki, Agnieszka Timorek, Jan Bahyrycz, Radosław Mądry The Board of the Polish Society of Oncological Gynaecology and Working Group on Ovarian Cancer.
- [12] myOvarainCancerteam <https://www.myovariancancerteam.com/resources/ultrasound-pictures-of-ovarian-cancer?fbclid=IwAR0DSyIit5HbAguUhc32V2EeVF0uYb4vk4pceF5PTwDBX-lznuqc-0iixuqI#:~:text=When%20diagnosing%20potential%20cases%20of%20ovarian%20cancer%2C%20doctors,can%20capture%20pictures%20of%20the%20ovaries%20and%20uterus.>

- [13] Polskie Towarzystwo Ginekologii Onkologicznej - Leczenie chirurgiczne raka jajnika – Rekomendacje ESGO; <https://ptgo.pl/rekomendacje/leczenie-chirurgiczne-raka-jajnika-rekomendacje-esgo>; Pobrane: 27.12.2022r.
- [14] García-Martínez E, Pérez-Fidalgo JA. Immunotherapies in ovarian cancer. *EJC Suppl.* 2020;15:87-95. Published 2020 Aug 22. doi:10.1016/j.ejcsup.2020.02.002.
- [15] Zhu JW, Charkhchi P, Akbari MR. Potential clinical utility of liquid biopsies in ovarian cancer. *Mol Cancer.* 2022;21(1):114. Published 2022 May 11. doi:10.1186/s12943-022-01588-8.
- [16] Liu JF, Kindelberger D, Doyle C, Lowe A, Barry WT, Matulonis UA. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2013;131(2):352-356. doi:10.1016/j.ygyno.2013.08.006.
- [17] Obermayr E, Castillo-Tong DC, Pils D, et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in patients with ovarian cancer improves their prognostic significance -- a study of the OVCAD consortium. *Gynecol Oncol.* 2013;128(1):15-21. doi:10.1016/j.ygyno.2012.09.021.
- [18] Yang J, Ma J, Jin Y, et al. Development and validation for prognostic nomogram of epithelial ovarian cancer recurrence based on circulating tumor cells and epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep.* 2021;11(1):6540. Published 2021 Mar 22. doi:10.1038/s41598-021-86122-4.
- [19] Fan T, Zhao Q, Chen JJ, Chen WT, Pearl ML. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;112(1):185-191. doi:10.1016/j.ygyno.2008.09.021.
- [20] Asante DB, Calapre L, Ziman M, Meniawy TM, Gray ES. Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time?. *Cancer Lett.* 2020;468:59-71. doi:10.1016/j.canlet.2019.10.014.

- [21] Kim JH, Chung HH, Jeong MS, Song MR, Kang KW, Kim JS. One-step detection of circulating tumor cells in ovarian cancer using enhanced fluorescent silica nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2247-2257. doi:10.2147/IJN.S45059.
- [22] Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer [published correction appears in *Gynecol Oncol*. 2010 Jan;116(1):153]. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):13-21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
- [23] Gao YC, Wu J. MicroRNA-200c and microRNA-141 as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(6):4843-4850. doi:10.1007/s13277-015-3138-3.
- [24] Piek J, In 't Veld S, Best M, et al. EP457 Assessment of ovarian tumors with tumor educated platelets (TEPs). *Int J Gynecol Cancer*. 2019;29(Suppl 4):A291. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2019-ESGO.516>.
- [25] Shen J, Zhu X, Fei J, Shi P, Yu S, Zhou J. Advances of exosome in the development of ovarian cancer and its diagnostic and therapeutic prospect. *Onco Targets Ther*. 2018;11:2831-2841. Published 2018 May 15. doi:10.2147/OTT.S159829.
- [26] Marek Jakóbsiak, Witold Lasek; *Immunologia nowotworów*; Jakub Gołąb, Marek Jakóbsiak, Witold Lasek, *Immunologia*; wydanie VII; Warszawa 2020; PWN.
- [27] Bund V, Azais H, Bibi-Triki S, et al. Basics of immunotherapy for epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2022;51(2):102283. doi:10.1016/j.jogoh.2021.102283.
- [28] Yang C, Xia BR, Zhang ZC, Zhang YJ, Lou G, Jin WL. Immunotherapy for Ovarian Cancer: Adjuvant, Combination, and Neoadjuvant. *Front Immunol*. 2020;11:577869. Published 2020 Oct 6. doi:10.3389/fimmu.2020.577869.
- [29] Jakub Gołąb, *Immunologia ciąży*, Jakub Gołąb, Marek Jakóbsiak, Witold Lasek; *Immunologia*; wydanie VII; Warszawa 2020; PWN.
- [30] Katarzyna Skórka, Marlena Kot, Joanna Knap, Zaburzenia układu immunologicznego u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową; Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny

- w Lublinie; Postepy Hig Med Dosw (online), 2019; 73: 117-132 e-ISSN 1732-2693.
- [31] Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer Inhibits Tumor Immunity through the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Clin Cancer Res.* 2017;23(2):587-599. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0387.
- [32] Zhang M, He Y, Sun X, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res.* 2014;7:19. Published 2014 Feb 8. doi:10.1186/1757-2215-7-19.
- [33] Yuan X, Zhang J, Li D, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2017;147(1):181-187. doi:10.1016/j.ygyno.2017.07.007.
- [34] Yin M, Li X, Tan S, et al. Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(11):4157-4173. doi:10.1172/JCI87252.
- [35] Givel AM, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, et al. miR200-regulated CXCL12 β promotes fibroblast heterogeneity and immunosuppression in ovarian cancers. *Nat Commun.* 2018;9(1):1056. Published 2018 Mar 13. doi:10.1038/s41467-018-03348-z.
- [36] Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011;17(11):1498-1503. Published 2011 Oct 30. doi:10.1038/nm.2492.
- [37] J. Gołąb, M. Jakóbiśiak, M. Firczuk; *Cytokiny*; Jakub Gołąb, Marek Jakóbiśiak, Witold Lasek, *Immunologia*; wydanie VII; Warszawa 2020; PWN.
- [38] Browning L, Patel MR, Horvath EB, Tawara K, Jorczyk CL. IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res.* 2018;10:6685-6693. Published 2018 Dec 5. doi:10.2147/CMAR.S179189.

- [39] Isobe A, Sawada K, Kinose Y, et al. Interleukin 6 receptor is an independent prognostic factor and a potential therapeutic target of ovarian cancer. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118080. Published 2015 Feb 6. doi:10.1371/journal.pone.0118080.
- [40] Browning L, Patel MR, Horvath EB, Tawara K, Jorcyk CL. IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res*. 2018;10:6685-6693. Published 2018 Dec 5. doi:10.2147/CMAR.S179189.
- [41] Y.J. Tang, Z.L. Sun, W.G. Wu; Inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) suppresses ovarian cancer growth, migration and invasion and enhances the effect of cisplatin in vitro; *Genet. Mol. Res*. 14 (1): 2450-2460 (2015); DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.March.30.3>.
- [42] T. Tanaka, A. Ogata, M. Narazaki; Tocilizumab: An Updated Review of Its Use in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Its Application for Other Immune-Mediated Diseases; February 2013, *Clinical Medicine Insights: Therapeutics* 5(5):33-52; DOI:10.4137/CMT.S9282.
- [43] Szender JB, Papanicolau-Sengos A, Eng KH, et al. NY-ESO-1 expression predicts an aggressive phenotype of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2017;145(3):420-425. doi:10.1016/j.ygyno.2017.03.509.
- [44] Raza, A., Merhi, M., Inchakalody, V.P. *et al.* Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy. *J Transl Med* 18, 140 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02306-y>.
- [45] Odunsi K, Matsuzaki J, Karbach J, et al. Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(15):5797-5802. doi:10.1073/pnas.1117208109.
- [46] Zhang M, He Y, Sun X, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res*. 2014;7:19. Published 2014 Feb 8. doi:10.1186/1757-2215-7-19.

- [47] Markowska A, Sajdak S, Markowska J, Huczyński A. Angiogenesis and cancer stem cells: New perspectives on therapy of ovarian cancer. *Eur J Med Chem.* 2017;142:87-94. doi:10.1016/j.ejmech.2017.06.030.
- [48] Khaliq S, Banerjee S. Nintedanib in ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26(9):1073-1081. doi:10.1080/13543784.2017.1353599.
- [49] Medycyna praktyczna dla pacjentów; Bewacyzumab (opis profesjonalny); dostępne: <https://www.mp.pl/pacjent/leki>.
- [50] "FDA approves bevacizumab in combination with chemotherapy for ovarian cancer". U.S. Food and Drug Administration (FDA). czerwiec 2018. Pobrane: 12.01.2023.
- [51] "FDA approves olaparib plus bevacizumab as maintenance treatment for ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancers". U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Press release). 8.05.2020. Pobrane: 12.01.2023.
- [52] Blecharz P, Mądry R, Jasiówka M. Treatment of advanced ovarian cancer with bevacizumab in Poland — a chance to improve survival still missed. *Oncol Clin Pract* 2016; 12: 167–178. DOI: 10.5603/OCP.2016.0009.
- [53] Arjaans M, Oude Munnink TH, Oosting SF, et al. Bevacizumab-induced normalization of blood vessels in tumors hampers antibody uptake. *Cancer Res.* 2013;73(11):3347-3355. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3518.
- [54] G. Ranieri, D. Ribatti; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Target of Bevacizumab in Cancer: From the Biology to the Clinic; *Current Medicinal Chemistry*, February 2006; DOI: 10.2174/092986706777585059.
- [55] Inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) w terapii nowotworów z mutacjami BRCA1/2 Katarzyna Kluzek, Aneta Białkowska, Aleksandra Koczorowska, Małgorzata Zdzienicka, Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy DOI: 10.5604/17322693.1000548.

- [56] Rodriguez-Garcia A, Sharma P, Poussin M, et al. CAR T Cells Targeting MISIIR for the Treatment of Ovarian Cancer and Other Gynecologic Malignancies. *Mol Ther*. 2020;28(2):548-560. doi:10.1016/j.ymthe.2019.11.028.
- [57] Kersual N, Garambois V, Chardès T, et al. The human Müllerian inhibiting substance type II receptor as immunotherapy target for ovarian cancer. Validation using the mAb 12G4. *MAbs*. 2014;6(5):1314-1326. doi:10.4161/mabs.29316.
- [58] Pépin D, Sosulski A, Zhang L, et al. AAV9 delivering a modified human Mullerian inhibiting substance as a gene therapy in patient-derived xenografts of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(32):E4418-E4427. doi:10.1073/pnas.1510604112.
- [59] Zhao J, Song Y, Liu D. Clinical trials of dual-target CAR T cells, donor-derived CAR T cells, and universal CAR T cells for acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):17. Published 2019 Feb 14. doi:10.1186/s13045-019-0705-x.
- [60] Wprost zdrowie; Dostępne: <https://zdrowie.wprost.pl/medycyna/choroby/10219119/polki-sie-nie-badaja-3-mln-kobiet-chodzi-do-ginekologa-raz-w-roku>; Pobrane: 03.01.2023.
- [61] Wanxia Tian, Ningjing Lei, Junying Zhou; Extracellular vesicles in ovarian cancer chemoresistance, metastasis, and immune evasion; *Cell Death Dis*. 2022 styczeń 18;13(1):64. doi: 10.1038/s41419-022-04510-8.
- [62] Sharma S, Alharbi M, Kobayashi M, et al. Proteomic analysis of exosomes reveals an association between cell invasiveness and exosomal bioactivity on endothelial and mesenchymal cell migration *in vitro*. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132(18):2029-2044. Published 2018 Sep 18. doi:10.1042/CS20180425.
- [63] Taki M, Abiko K, Baba T, et al. Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun*. 2018;9(1):1685. Published 2018 Apr 27. doi:10.1038/s41467-018-03966-7.

Enfortumab vedotin jako nowa opcja terapeutyczna u pacjentów z przerzutowym rakiem urotelialnym

Jakub Ciesielka¹, Zuzanna Witkowska², Karolina Handzel³,
Antoni Anczyk⁴, Jacek Wysoczański⁴, Radosław Dutczak^{2,5}

1. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Dermatologii, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
3. Studenckie Koło Naukowe Seksuologii przy Katedrze i Klinice Ginekologii i Położnictwa, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
4. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
5. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Okulistyki, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

Abstrakt: Rak urotelialny jest złośliwym nowotworem wywodzącym się z nabłonka przejściowego wyściełającego drogi moczowe. Zajmuje on 9 miejsce wśród zachorowań na nowotwory złośliwe i jest 12 przyczyną zgonów u pacjentów leczonych onkologicznie. W stadium przerzutowym, pomimo wdrożonego leczenia mediana przeżyć całkowitych (mOS) nie przekracza 17 miesięcy. Leczeniem z wyboru rozsiańego raka urotelialnego pozostaje paliatywna chemioterapia oparta na pochodnych platyny z następczą immunoterapią wykorzystującą inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych PD-1 lub PD-L1. Identyfikacja wysokiego stopnia ekspresji nektyny-4 w komórkach raka urotelialnego i opracowanie enfortumabu vedotinu (EV), koniugatu przeciwciała skierowanego przeciwko nektynie-4 i aurystatyny E (MMAE), znacząco zwiększyła możliwości terapii chorych na przerzutowego raka urotelialnego. Obiecujące wyniki badań przedklinicznych oceniające bezpieczeństwo i skuteczność EV na modelach zwierzęcych doprowadziły do rejestracji badań klinicznych, w których stosowano EV w paliatywnym leczeniu raka urotelialnego. W przeprowadzonych badaniach klinicznych zareportowano wyraźny wzrost odsetka odpowiedzi obiektywnych (ORR), znaczącą poprawę mediany przeżyć całkowitych (mOS) i mediany czasu wolnego od progresji (mPFS) w stosunku do standardowej chemioterapii. Rejestrowana poprawa tych wskaźników raportowana była przy zachowaniu umiarkowanej toksyczności leczenia. Pomimo, iż EV doczekał się rejestracji w Stanach Zjednoczonych i Europie, wciąż istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych opcji terapeutycznych zapewniających dostatecznie wysokie regresje i wydłużających wskaźniki przeżywalności.

W ostatnim czasie zauważalnie rośnie liczba nowych zarejestrowanych terapii łączących z EV z innymi lekami nakierowanymi na cele molekularne w leczeniu przerzutowego raka urotelialnego. Publikacja wyników tych badań w przyszłości może dostarczyć przełomowych wniosków, pozwalających na modyfikację leczenia i intensyfikujących skuteczność prowadzonych terapii.

Słowa kluczowe: enfortumab vedotin, leczenie systemowe, rak urotelialny

Abstract: Urothelial carcinoma is a malignant neoplasm originating from the transitional epithelium lining the urinary tract. It ranks 9th among malignant neoplasms and is the 12th cause of death in oncology-treated patients. In the metastatic stage, despite the implemented treatment, the median overall survival (mOS) does not exceed 17 months. The treatment of choice for disseminated urothelial carcinoma remains palliative chemotherapy based on platinum derivatives with subsequent immunotherapy using PD-1 or PD-L1 immune checkpoint inhibitors. The identification of high levels of nectin-4 expression in urothelial cancer cells and the development of enfortumab vedotin (EV), a conjugate of an antibody directed against nectin-4 and auristatin E (MMAE), has significantly increased the treatment options for patients with metastatic urothelial cancer. Promising results from preclinical studies evaluating the safety and efficacy of EV in animal models led to the registration of clinical trials using EV in the palliative treatment of urothelial cancer. The clinical trials reported marked increases in objective response rates (ORR), significant improvements in median overall survival (mOS) and median progression-free time (mPFS), compared to standard chemotherapy. Recorded improvements in these indicators were reported while maintaining moderate treatment toxicity. Although EV has achieved registration in the United States and Europe, there is still an urgent need to find new therapeutic options that provide sufficiently high regressions and prolong survival rates. Recently, there has been a noticeable increase in the number of new registered therapies combining EV with other drugs targeting molecular targets for the treatment of metastatic urothelial cancer. The publication of the results of these studies in the future may provide breakthrough conclusions, allowing modification of treatment and intensifying the effectiveness of ongoing therapies.

Key words: enfortumab vedotin, systemic treatment, urothelial carcinoma

1. Wstęp

Rak urotelialny, inaczej zwany rakiem z nabłonków przejściowych to nowotwór złośliwy wywodzący się z nabłonka przejściowego wyściełającego światło miedniczek nerkowych, moczowodów, pęcherza moczowego i cewki moczowej [1]. Jednostka ta zajmuje 9 miejsce wśród zachorowań na nowotwory złośliwe, jednocześnie stanowiąc 12 w kolejności przyczynę zgonów u pacjentów chorych onkologicznie [2]. Pomimo wysokiej chemiowrażliwości tego nowotworu, ogólny odsetek 5-letnich przeżyć we wszystkich stadiach tego schorzenia wynosi 43,9% niezależnie od płci, a u chorych w stadium przerzutowym leczonych systemowo chemioterapią mediana przeżyć całkowitych nie przekracza 17 miesięcy [1,3]. Stwarza to potrzebę identyfikacji nowych celów molekularnych komórek nowotworowych i opracowywania skutecznych

terapii, których zastosowanie mogłoby przyczynić się do poprawy rokowania tej grupy chorych [3].

2. Obecne standardy postępowania terapeutycznego

U pacjentów chorujących na raka urotelialnego w stadium przerzutowym cechujących się dobrym stanem ogólnym, leczeniem I linii pozostaje chemioterapia z wykorzystaniem pochodnych cisplatyny lub karboplatyny, według schematów takich jak: MVAC (metotreksat, winblastyna, doksorubicyna, cisplatyna), GC (gemcytabina, cisplatyna), czy opcji leczniczych z wykorzystaniem gemcytabiny i karboplatyny [4]. U chorych niekwalifikujących się do leczenia pochodnymi platynowców, lub kiedy podczas tego leczenia doszło do progresji choroby, należy rozważyć terapię inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych skierowanych przeciwko PD-1 lub PD-L1: avelumabem, pembrolizumabem lub niwolumabem [5]. U chorych, u których stwierdza się mutację w genie kodującym czynnik wzrostu fibroblastów (FGFR) zastosowanie znajduje erdafitynib [6]. U pacjentów u których doszło do progresji po leczeniu II linii wybór kolejnej opcji terapeutycznej był sporym wyzwaniem. Do niedawna jedynym leczeniem była terapia docetakselem lub paclitaxelem, których zastosowanie wiązało się jednak z niskim odsetkiem obiektywnych odpowiedzi [5]. Pojawienie się nowej opcji terapeutycznej: enfortumabu vedotinu, znacząco zwiększyło możliwość leczenia pacjentów z zaawansowanym rakiem urotelialny po wyczerpaniu wcześniejszych linii leczenia [7].

3. Enfortumab vedotin, jako celny koniugat leku i przeciwciała, nakierowany na nektynę-4

Enfortumab vedotin jest koniugatem w pełni ludzkiego, humanizowanego przeciwciała i monometylowanej aurystatyny E (MMAE) [8]. Idea zastosowania koniugatów przeciwciał i cytostatyków jest ostatnio szeroko badana w onkologii [9]. Związki te pozwalają na dokładną depozycję leku wewnątrz komórki nowotworowej, ograniczając przy tym ogólnoustrojową cytotoksyczność podawanej substancji [10]. Celem molekularnym dla enfortumabu vedotinu jest nektyna 4, zewnątrzkomórkowe białko, wykazujące wysoką ekspresję na powierzchni komórek różnych nowotworów, w tym raka urotelialnego [11]. Nektyna-4 stymuluje aktywację szlaku sygnałowego WNT/ β -kateniny, a także mediuje działanie receptorów ERBB2, promujących aktywację ścieżki

sygnalizacyjnej PI3K-AKT^[12]. Aktywacja tych szlaków sygnałowych stymuluje proliferację i nasila zdolność do metastazy komórek nowotworowych^[13]. Drugim komponentem koniugatu enfortumabu vedotinu jest monometylowana aurystatyna E (MMAE). Substancja ta działa jako antymitotyk, który przyłącza się do mikrotubul i powoduje ich depolimeryzację, uniemożliwiając tym samym wytworzenie wrzeciona podziałowego i podział komórek nowotworowych¹⁴. Po dożylniej podaży i związaniu się z nektyną-4 kompleks leku i przeciwciała ulega endocytozie, gdzie następnie w pęcherzykach endocytarnych pod wpływem cięcia proteolitycznego dochodzi do odłączenia MMAE od kompleksu z przeciwciałem i indukowania działania terapeutycznego^[15].

4. Badania przedkliniczne wykorzystania enfortumabu w raku urotelialnego

Przełomowym dla opracowania terapii przeciwnowotworowej w raku urotelialnym było opublikowane w 2016 roku doniesienie o skuteczności enfortumabu vedotinu w badaniach przedklinicznych. Pia M. et al., jako pierwsi zaraportowali o potencjalnym znaczeniu nektyny-4 jako celu molekularnego dla nowych terapii chorób nowotworowych. Badacze oznaczyli immunohistochemicznie ekspresję nektyny-4 w 2394 preparatach ludzkich raków: pęcherza moczowego, piersi, trzustki, płuc, jajnika, raków zakresu głowy i szyi oraz raka przełyku. Ekspresja nektyny-4 obserwowana była łącznie w 69% przypadków wszystkich badanych nowotworów. Komórki raka urotelialnego wykazały ekspresję dla nektyny-4 w stopniu silnym w 31%, podczas gdy komórki raka drobnokomórkowego płuc lub jajnika wykazywały silną ekspresję nektyny-4 na poziomie 0%. Dla komórek raka urotelialnego przeprowadzone badanie immunohistochemiczne ujawniło ekspresję nektyny-4 w stopniu umiarkowanym lub silnym w 60% badanych preparatów, a immunohistochemiczny wskaźnik H-score przewyższył wartość 100. Równolegle ze zidentyfikowanym celem molekularnym badacze z zespołu Pia M. et al., zaprojektowali koniugat humanizowanego ludzkiego przeciwciała i monometylowanej aurystatyny-E nakierowany na nektynę-4. Do przeprowadzenia badania bezpieczeństwa i skuteczności enfortumabu vedotinu w modelach zwierzęcych zastosowano ksenoprzeszczep linii komórek ludzkiego raka pęcherza moczowego AG-B1, które pasażowano u myszy ICR-SCID. Po podaniu koniugatu lekowego w dawce 8mg/kg m.c. osiągnięto znaczące zahamowanie wzrostu guza, w porównaniu do próby, gdzie podano samo przeciwciało. Raportowano także o regresjach całkowitych raków urotelialnych u myszy. Podczas prowadzenia

eksperymentu nie doniesiono o jakichkolwiek działaniach niepożądanych w próbie badanej i kontrolnej ^[16].

5. Badania kliniczne wykorzystania enfortumabu vedotinu w leczeniu raka urotelialnego

Obiecujące wyniki badań przedklinicznych doprowadziły do rejestracji kilku badań klinicznych, oceniających skuteczność enfortumabu vedotinu u pacjentów leczonych na miejscowo zaawansowanego lub rozsianego raka urotelialnego.

W badaniu klinicznym I fazy o kryptonimie EV-101 zastosowano monoterapię enfortumabem vedotinem u 155 chorych na raka urotelialnego w stadium przerzutowym choroby, u których doszło do progresji po leczeniu pochodnymi platyny lub terapią anty PD-(L)1. Celem badania była ocena bezpieczeństwa, tolerancji oraz wyznaczenia dawki leku. Określona w badaniu dawka o najwyższym profilu bezpieczeństwa wyniosła 1,25 mg/kg m.c, i podawana była w 1, 8 i 15 dniu, 28-dniowego cyklu. Objawy nieporządane podczas stosowania terapii wystąpiły u 30% pacjentów, wykazywały stopień nasilenia od lekkiego po umiarkowany i obejmowały: wysypki skórne, łysienie, zmęczenie, obniżenie apetytu i obwodowe neuropatie. Odsetek obiektywnych odpowiedzi u chorych wyniósł 43%, a średni czas trwania odpowiedzi 7,3 miesiąca. Mediana przeżyć całkowitych (mOS) u pacjentów wyniosła 12,3 miesiąca, a wskaźnik całkowitych przeżyć po 1 roku wyniósł 51,8%. W momencie zakończenia badania, po 16,4 miesięcznym czasie obserwacji, 36% chorych nadal żyło. Badania EV-101 potwierdziło zakres bezpiecznych dawkowań enfortumabu vedotinu, jego bezpieczeństwo i skuteczność u chorych na przerzutowego raka urotelialnego ^[17].

Pozytywnie zakończone badanie kliniczne I fazy doprowadziło do rejestracji wielośrodkowego badania klinicznego fazy II o kryptonimie EV-201. Do badania włączono 91 pacjentów z 40 ośrodków na całym świecie chorujących na miejscowo zaawansowanego lub rozsianego raka urotelialnego, u których doszło do progresji po leczeniu pochodnymi platyny, lub terapią anty-PD-(L)1. Enfortumab vedotin został podany pacjentom w ustalonej w badaniu I fazy dawkę 1,25 mg/kg m.c, w dniach 1, 8 i 15, 28-dniowego cyklu. Pierwszorzędownym punktem końcowym badania był odsetek odpowiedzi na leczenie, który wyniósł 52%. U 31% chorych zaraportowano częściową odpowiedź na leczenie, a 20% pacjentów uzyskało całkowitą regresję guza. Podobnie jak w badaniu klinicznym I fazy zgłoszono objawy nieporządane,

z których najczęstsze obejmowały neutropenię, wysypkę plamisto- grudkową i zmęczenie. Powyższe objawy po podjęciu odpowiednich interwencji terapeutycznych były dobrze kontrolowane. Stwierdzono najwyższy odsetek odpowiedzi na leczenie enfortumabem vedotinem w tej grupie populacji [18].

W 2022 roku, podczas corocznego spotkania American Society of Clinical Oncology (ASCO), zaprezentowano długoterminowe wyniki badania III fazy o kryptonimie EV-301. W badaniu tym porównywano leczenie enfortumabem vedotinem w populacji pacjentów z przerzutowym rakiem urotelialnym do leczenia z wykorzystaniem chemioterapii opartej na docetaxelu, paclitaxelu i vinflunidynie. Kryteriami włączenia do badania EV-301 obejmowały: histopatologiczne potwierdzenie raka urotelialnego; progresja podczas leczenia lub po zakończeniu leczenia przeciwciałami anty-PD-1/ anty PD-L1; wcześniejsze stosowanie schematów chemioterapii opartej na platynowcach oraz dobry stan kliniczny chorego oceniany w skali ECOG na 0 lub 1 punktów. W ramieniu kontrolnym, 307 chorych otrzymywało chemioterapię w oparciu o docetaxel, paclitaxel lub vinflunidynę w dawkach odpowiednio: 75 mg/m², 175 mg/m², 320 mg/m² podawanych w 1 dniu 21-dniowego cyklu. W ramieniu badawczym 301 chorym podano enfortumab vedotin w dawce 1,25 mg/kg m.c. w dniu 1, 8 i 15 28- dniowego cyklu. Pierwszorzędowy punkt końcowy obejmował medianę przeżyć całkowitych (mOS) chorych, natomiast do punktów drugorzędowych zaliczono: medianę czasu wolnego od progresji (mPFS), wskaźnik odpowiedzi na leczenie (ORR) oraz bezpieczeństwo. Mediana przeżyć całkowitych w ramieniu pacjentów u których zastosowano enfortumabem vedotinem wyniosła 12,91 miesiąca w porównaniu do ramienia kontrolnego, gdzie mediana przeżyć całkowitych wyniosła 8,94 miesiąca. Mediana czasu wolnego od progresji (mPFS) przy zastosowaniu enfortumabu vedotinu wyniosła 5,55 miesiąca, w porównaniu z chemioterapią, gdzie mPFS osiągnęła wartość 3,71 miesiąca. Częstość działań nieporządkanych była porównywalna pomiędzy chorymi otrzymującymi enfortumab vedotin, a chorymi otrzymującymi chemioterapię. Badanie EV-301 jasno pokazuje istotną przewagę zastosowania enfortumabu-vedotinu u chorych na zaawansowanego raka urotelialnego, u których zostały wyczerpane inne opcje terapeutyczne w postaci chemioterapii czy immunoterapii. Wniosek ten znajduje potwierdzenie w fakcie, że nowe leczenie enfortumabem vedotinem wykazuje podobny profil toksyczności w stosunku do chemioterapii [19].

6. Wprowadzenie enfortumabu vedotinu jako środka leczniczego

W grudniu 2019 Food And Drug Administration (FDA) z uwagi na pozytywne wyniki fazy I i II, zatwierdziła enfortumabu vedotinu jako środek terapeutyczny u pacjentów z lokalnie zaawansowanym lub przerzutowym rakiem urotelialnym ^[20]. W kwietniu 2022, European Medicines Agency (EMA), zatwierdziła enfortumab vedotin jako lek stosowany w leczeniu przerzutowego raka urotelialnego na terytorium Unii Europejskiej. Jak dotąd, w Polsce enfortumab vedotin nie jest objęty programem lekowym, a pacjenci podejmujący leczenie muszą sfinansować koszty terapii.

7. Koniugaty leków i przeciwciał jako nowa i szeroko badana opcja lekowa w rozsianym raku urotelialnym

Koniugaty leków i przeciwciał w rozsianym raku urotelialnym stały się często badaną opcją lekową. Na szczególną uwagę zasługuje badany równoległe do enfortumabu vedotinu lek, sacituzumab govitecan. Jest to związek będący koniugatem przeciwciała skierowanego przeciwko białku Trop-2 i pochodnej irynotekanu- SN 38 ^[21]. W ostatnim czasie stale zwiększa się liczba badań klinicznych oceniających bezpieczeństwo i skuteczność tego rozwiązania terapeutycznego w różnych jednostkach onkologicznych ^[21]. W badaniu 2 fazy o kryptonimie TROPHY-U-01 badano skuteczność i bezpieczeństwo sacituzumabu govitecanu na kohorcie pacjentów, u których doszło do progresji po zastosowaniu pochodnych platyny lub inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych. Uzyskano ORR na poziomie 27%, a mPFS i mOS wynosiły odpowiednio: 5,4 i 10,9 miesiąca ^[22]. Obecnie trwa III fazy badania klinicznego oceniającego skuteczność i bezpieczeństwo tej terapii lekowej.

8. Nowe kombinacje enfortumabu vedotinu z innymi lekami, jako szeroko badane rozwiązanie terapeutyczne w leczeniu rozsianego raka urotelialnego

W ostatnim czasie podejmowane są liczne próby łączenia enfortumabu vedotinu z inhibitorami PD-1/PD-L1. Na uwagę zasługuje badanie kliniczne I fazy traktujące o połączeniu enfortumabu vedotinu z pembrolizumabem w leczeniu lokalnie zaawansowanego lub rozsianego raka urotelialnego. W badaniu tym połączenie enfortumabu vedotinu z pembrolizumabem skutkowało osiągnięciem odsetka obiektywnych odpowiedzi (ORR) na poziomie

64,5%, w porównaniu do monoterapii enfortumabem-vedotinem, gdzie ORR wyniósł 45,2% [23].

Na szczególną uwagę zasługuje badanie Ib/II fazy o krytonimie MORPHEUS mUC, do którego włączono 305 pacjentów chorych na lokalnie zaawansowanego lub rozsiańego raka urotelialnego. W pierwszej fazie badania MORPHEUS mUC pacjentom w ramieniu kontrolnym podano atezolizumab, podczas gdy w 6 ramionach badawczych u pacjentów zastosowano połączenie atezolizumabu z jednym z wybranych leków: enfortumabem vedotinem, niraparibem, magrolimabem, isatuximabem, linagliptyną i tocilizumabem. Jako pierwszorzędowy punkt końcowy został obrany odsetek obiektywnych odpowiedzi (ORR). W drugiej fazie badania MORPHEUS mUC pacjenci będą otrzymywali kombinację atezolizumabu i enfortumabu vedotinu lub linagliptyny, z wyłączeniem przypadków, kiedy w fazie pierwszej połączenia te nie wykazywały aktywności leczniczej. Opublikowanie wyników badania MORPHEUS mUC może wskazać kierunki rozwoju terapii chorych na zaawansowanego raka urotelialnego. Potrzebne są jednak dalsze próby kliniczne ewaluujące skuteczność tego rodzaju terapii na większych kohortach chorych [24].

Rejestracji doczekały się także inne badania kliniczne oceniające zastosowanie połączeń enfortumabu vedotinu z innymi lekami stosowanymi w terapii rozsiańego raka urotelialnego. Ich wyniki mogą istotnie zmodyfikować podejście terapeutyczne w leczeniu tej jednostki chorobowej, pozwalając na osiągnięcie długich przeżyć u chorych w tym rodzaju nowotworu [25, 26, 27, 28].

Tabela 1. Wybrane badania kliniczne I fazy oceniające skuteczność połączeń enfortumabu vedotinu z innymi lekami w leczeniu raka urotelialnego [opracowanie własne na podstawie: clinicaltrials.gov]

Identyfikator badania	Jednostka chorobowa	Zastosowane leczenie	Status badania	Ref.
NCT04963153	Przerzutowy rak urotelialny	Edraftynib + Enfortumab vedotin	Rekrutacja	[25]
NCT05524545	Przerzutowy rak urotelialny	Evorpcept + Enfortumab vedotin	Rekrutacja	[26]
NCT04724018	Przerzutowy rak urotelialny	Sacituzumab govitekan + Enfortumab vedotin	Rekrutacja	[27]
NCT04960709	Rak urotelialny naciekający na błonę mięśniową	Durvalumab + tremelimumab + enfortumab vedotin	Rekrutacja	[28]

9. Podsumowanie

Pomimo istotnych postępów w onkologii leczenie raka urotelialnego w stadium zaawansowanym pozostaje wciąż poważnym problemem terapeutycznym. Jeszcze do niedawna jedyną opcją leczenia chorych na rozsiały raka urotelialnego była paliatywna chemioterapia oparta na pochodnych platyny, która wiązała się z niskim ORR, mPFS i mOS. Wprowadzenie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych anty-PD-1 i anty-PD-L1 poprawiło wskaźniki przeżywalności tej grupy pacjentów, które jednak wciąż pozostawały niezadawalające. Zarejestrowanie enfortumabu vedotinu, jako koniugatu przeciwciała i aurystatyny E, istotnie wydłużyło medianę przeżyć całkowitych u chorych, którzy doświadczyli progresji po zastosowaniu chemioterapii i immunoterapii. Istnieje konieczność dalszych badań połączeń enfortumabu vedotinu z innymi lekami, a także identyfikacji nowych, potencjalnych celów molekularnych, celem wypracowania odpowiednich rozwiązań terapeutycznych, które mogłyby przyczynić się do istotnej poprawy rokowań u pacjentów z rozsiałym rakiem urotelialnym.

Referencje

- [1] Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol.* 2017;71(1):96-108. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.010.
- [2] Matsumoto R, Abe T, Ishizaki J, et al. Outcome and prognostic factors in metastatic urothelial carcinoma patients receiving second-line chemotherapy: an analysis of real-world clinical practice data in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 2018;48(8):771-776. doi:10.1093/jjco/hyy094.
- [3] Cancer Research UK, <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bladder-cancer/survival#ref->, pozyskano 16 lutego 2023.
- [4] Hanna KS. Updates and novel treatments in urothelial carcinoma. *J Oncol Pharm Pract.* 2019;25(3):648-656. doi:10.1177/1078155218805141.

- [5] Rhea LP, Mendez-Marti S, Kim D, Aragon-Ching JB. Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treat Res Commun.* 2021;26:100296. doi:10.1016/j.ctarc.2020.100296.
- [6] Montazeri K, Bellmunt J. Erdafitinib for the treatment of metastatic bladder cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2020;13(1):1-6. doi:10.1080/17512433.2020.1702025.
- [7] Powles T, Rosenberg JE, Sonpavde GP, et al. Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(12):1125-1135. doi:10.1056/NEJMoa2035807.
- [8] Alt M, Stecca C, Tobin S, Jiang DM, Sridhar SS. Enfortumab Vedotin in urothelial cancer. *Ther Adv Urol.* 2020;12:1756287220980192. Published 2020 Dec 27. doi:10.1177/1756287220980192.
- [9] Hafeez U, Parakh S, Gan HK, Scott AM. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules.* 2020;25(20):4764. Published 2020 Oct 16. doi:10.3390/molecules25204764.
- [10] Hingorani, D.V., Allevato, M.M., Camargo, M.F. et al. Monomethyl auristatin antibody and peptide drug conjugates for trimodal cancer chemo-radio-immunotherapy. *Nat Commun* 13, 3869 (2022).
- [11] Hoffman-Censits JH, Lombardo KA, Parimi V, et al. Expression of Nectin-4 in Bladder Urothelial Carcinoma, in Morphologic Variants, and Nonurothelial Histotypes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021;29(8):619-625. doi:10.1097/PAI.0000000000000938.
- [12] Wong JL, Rosenberg JE. Targeting nectin-4 by antibody-drug conjugates for the treatment of urothelial carcinoma. *Expert Opin Biol Ther.* 2021;21(7):863-873. doi:10.1080/14712598.2021.1929168.
- [13] Rascio F, Spadaccino F, Rocchetti MT, et al. The Pathogenic Role of PI3K/AKT Pathway in Cancer Onset and Drug Resistance: An Updated Review. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):3949. Published 2021 Aug 5. doi:10.3390/cancers13163949.
- [14] Cho H, Shim MK, Moon Y, et al. Tumor-Specific Monomethyl Auristatin E (MMAE) Prodrug Nanoparticles for Safe and Effective Chemotherapy. *Pharmaceutics.* 2022;14(10):2131. Published 2022 Oct 7. doi:10.3390/pharmaceutics14102131.

- [15] Heath EI, Rosenberg JE. The biology and rationale of targeting nectin-4 in urothelial carcinoma. *Nat Rev Urol.* 2021;18(2):93-103. doi:10.1038/s41585-020-00394-5.
- [16] Challita-Eid PM, Satpayev D, Yang P, et al. Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. *Cancer Res.* 2016;76(10):3003-3013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1313.
- [17] Rosenberg J, Sridhar SS, Zhang J, et al. EV-101: A Phase I Study of Single-Agent Enfortumab Vedotin in Patients With Nectin-4-Positive Solid Tumors, Including Metastatic Urothelial Carcinoma [published correction appears in *J Clin Oncol.* 2022 May 20;40(15):1711]. *J Clin Oncol.* 2020;38(10):1041-1049. doi:10.1200/JCO.19.02044.
- [18] Yu EY, Petrylak DP, O'Donnell PH, et al. Enfortumab vedotin after PD-1 or PD-L1 inhibitors in cisplatin-ineligible patients with advanced urothelial carcinoma (EV201): a multicentre, single-arm, phase 2 trial [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2021 Jun;22(6):e239]. *Lancet Oncol.* 2021;22(6):872-882. doi:10.1016/S1470-2045(21)00094-2.
- [19] Powles T, Rosenberg JE, Sonpavde GP, et al. Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(12):1125-1135. doi:10.1056/NEJMoa2035807.
- [20] Chang E, Weinstock C, Zhang L, et al. FDA Approval Summary: Enfortumab Vedotin for Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2021;27(4):922-927. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2275.
- [21] Rugo HS, Tolaney SM, Loirat D, et al. Safety analyses from the phase 3 ASCENT trial of sacituzumab govitecan in metastatic triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2022;8(1):98. Published 2022 Aug 29. doi:10.1038/s41523-022-00467-1.
- [22] Tagawa ST, Balar AV, Petrylak DP, et al. TROPHY-U-01: A Phase II Open-Label Study of Sacituzumab Govitecan in Patients With Metastatic Urothelial Carcinoma Progressing After Platinum-Based Chemotherapy and Checkpoint Inhibitors. *J Clin Oncol.* 2021;39(22):2474-2485. doi:10.1200/JCO.20.03489.

- [23] Hoimes CJ, Flaig TW, Milowsky MI, et al. Enfortumab Vedotin Plus Pembrolizumab in Previously Untreated Advanced Urothelial Cancer. *J Clin Oncol.* 2023;41(1):22-31. doi:10.1200/JCO.22.01643.
- [24] Drakaki A. Phase Ib/II umbrella trial to evaluate the safety and efficacy of multiple 2L cancer immunotherapy (CIT) combinations in advanced/metastatic urothelial carcinoma (mUC): MORPHEUS-mUC. *ClinicalTrials.gov* identifier: NCT03869190. Updated March 28, 2023. Accessed April 1, 2023.
- [25] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04963153>, pozyskano 14 kwietnia 2023.
- [26] <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05524545>, pozyskano 14 kwietnia 2023.
- [27] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04724018>, pozyskano 14 kwietnia 2023.
- [28] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04960709>, pozyskano 14 kwietnia 2023.

Trastuzumab derukstekan - przełom w leczeniu raka piersi

Jacek Wysoczański¹, Radosław Dutczak^{2,3}, Jakub Ciesielka⁴,
Zuzanna Witkowska², Karolina Handzel⁵, Antoni Anczyk¹

1. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
3. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Okulistyki, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
4. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Klinice Dermatologii, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
5. Studenckie Koło Naukowe Seksuologii przy Katedrze i Klinice Ginekologii i Położnictwa, Wydział Nauk Medycznych w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym na świecie i stanowi przyczynę 7% zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie. W obliczu tego wysiłek naukowców ukierunkowany jest na poszukiwanie nowych, skuteczniejszych leków znajdujących zastosowanie w terapii raka piersi. Wśród chorych na raka piersi szczególną grupę stanowią pacjentki z przerzutowym rakiem piersi o statusie receptorów HER2-low (niska ekspresja receptora HER2). Dotychczas chore te były traktowane tak samo jak pacjentki o statusie HER2 ujemnym i nie otrzymywały terapii celowanej anty-HER2. Wprowadzenie trastuzumabu derukstekanu do terapii w tej grupie pacjentek drastycznie odmieniło rokowanie i dało nadzieję na wydłużenie mediany czasu wolnego od progresji choroby (ang. median progression-free survival mPFS) oraz mediany całkowitego przeżycia (ang. prolonged median overall survival mOS).

Słowa kluczowe: Trastuzumab derukstekan, rak piersi HER2-low

Abstract: Breast cancer is the most common malignancy in the world and accounts for 7% of cancer deaths worldwide. In the face of this, researchers' efforts are directed toward the search for new, more effective drugs applicable to breast cancer therapy. Among breast cancer patients, patients with metastatic breast cancer with HER2-low (low HER2 receptor expression) status are a special group. Until now, these patients have been treated the same as patients with HER2 negative status and have not received anti-HER2 targeted therapy. The introduction of trastuzumab deruxtecan into therapy in this group of patients has

completely transformed the prognosis and offered hope for an increase in median progression-free survival (mPFS) and prolonged median overall survival (mOS).

Keywords: Trastuzumab deruxtecan, HER2-low breast cancer

1. Wstęp

Choroby nowotworowe stanowią drugą co do częstości przyczynę zgonów na świecie i są istotnym problemem z punktu widzenia polityki zdrowotnej wielu państw świata ^[1]. Wśród nowotworów złośliwych szczególnie ważne miejsce zajmuje rak piersi, będący najczęstszym nowotworem złośliwym na świecie. Co roku diagnoza ta dotyka ponad 2 miliony osób w światowej populacji. Rak ten odpowiada za prawie 12% wszystkich nowotworów złośliwych i wyprzedza pod tym względem nowotwory takie jak rak płuca (11,4%) czy rak jelita grubego (10%). Stanowi on przyczynę niemal 7% zgonów rocznie z powodu chorób nowotworowych ^[2]. Niniejszy rozdział w sposób kompleksowy charakteryzuje przełomowy lek jakim jest trastuzumab-derukstekan - mechanizm jego działania oraz miejsce w nowoczesnej terapii raka piersi.

2. Czynniki ryzyka

Do czynników ryzyka rozwoju raka piersi należą:

- Płeć żeńska - Rak piersi w 99% przypadków dotyczy populacji kobiet, przypadki zachorowania na raka piersi przez mężczyzn zdarzają się sporadycznie i stanowią zaledwie 1% wszystkich diagnozowanych raków piersi ^[3].
- Wiek - Poza płcią żeńską stanowi jeden z czynników najmocniej skorelowanych z pojawieniem się raka piersi. Ryzyko rozwoju raka piersi rośnie wraz z wiekiem pacjentki ^[4]. Większość przypadków dotyczy kobiet między 50 a 70 rokiem życia, a przypadki zachorowania kobiet przed 35 rokiem życia należą do rzadkości i stanowią zaledwie 2,4% przypadków ^[5]. Pomimo rzadszego występowania, młodsze pacjentki (<40 lat) mają większą tendencję do rozwoju bardziej agresywnych biologicznie form raka piersi i rokują przeważnie gorzej ^[6].
- Predyspozycje genetyczne - Uważa się, że około 7-10% przypadków raków piersi może mieć podłoże dziedziczne. Do genów biorących

udział w patogenezie raka piersi należą między innymi BRCA1 i BRCA2, a także ATM oraz TP53 [7]. Mutacje w genach BRCA1 i BRCA2 odgrywają szczególną rolę w rozwoju raka piersi – są one odpowiedzialne za odpowiednio 52% i 32% wszystkich przypadków dziedzicznego raka piersi [8]. Z kolei mutacje w genie supresorowym ATM, których obecność stwierdza się u 1-2% populacji wiążą się z 2-3 razy większą szansą rozwoju raka piersi niż w populacji ogólnej [9]. Utrata funkcji białka supresorowego p53 predysponuje natomiast do rozwoju wielu chorób nowotworowych i rak piersi nie jest tu wyjątkiem [10]. Zmianę taką stwierdza się w około 30% przypadków raka piersi [11].

- Ekspozycja na estrogeny - Przedłużona ekspozycja na estrogeny stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju raka piersi [12]. Źródła zwiększonej ekspozycji na hormony estrogenowe mogą być endogenne jak i również egzogenne. Przyjmuje się, że istotna jest zarówno dawka jak i czas przez jaki tkanka gruczołu piersiowego jest stymulowana przez estrogeny [13]. Wczesna pierwsza miesiączka, późna menopauza, brak porodów oraz pierwszy poród po 30 roku życia stanowią przyczynę przedłużonego czasu narażenia na estrogeny i zwiększają ryzyko raka piersi [14]. Do egzogennych źródeł narażenia na estrogeny należy z kolei stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych (OCD) oraz hormonalna terapia zastępcza (HRT). OCD mogą nieznacznie zwiększać ryzyko rozwoju raka piersi u pewnych grup kobiet [15]. HRT zwiększa ryzyko wystąpienia raka piersi, natomiast korzyści ze stosowania HRT w uzasadnionych przypadkach przewyższają ten potencjalnie negatywny wpływ [16].
- Styl życia - Otyłość, niska aktywność fizyczna oraz nadużywanie alkoholu predysponują do rozwoju różnorodnych chorób nowotworowych w tym raka piersi [17]. Badania pokazują, że już spożycie alkoholu na poziomie 10 gramów dziennie zwiększa ryzyko raka piersi o 5% w grupie kobiet przed menopauzą i o 9% po menopauzie [18]. Ponadto, każde dodatkowe 10 gramów alkoholu spożywanego dziennie zwiększa to ryzyko o kolejne 4% [19]. Ruch i ćwiczenia fizyczne wpływają natomiast ochronnie na ryzyko rozwoju raka piersi. Na podstawie danych z badań epidemiologicznych wiadomo, że kobiety regularnie wykazujące aktywność fizyczną mają o 10-25% mniejsze ryzyko rozwoju raka piersi w porównaniu z kobietami nie wykazującymi żadnej aktywności fizycznej [20]. Otyłość jako stan

charakteryzujący się licznymi zaburzeniami wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zarówno chorób sercowo-naczyniowych jak i nowotworowych [21].

Do mechanizmów łączących otyłość i zwiększone ryzyko raka piersi należą między innymi: insulinooporność i powiązana z nią hiperinsulinemia, zwiększone stężenie peptydów anabolicznych takich jak IGF-1 czy też wiążącą się z otyłością skłonność do przewlekłych stanów zapalnych tkanek [22].

3. Terapia raka piersi

W terapii raka piersi zastosowanie znajduje: leczenie chirurgiczne, chemo- i radioterapia, terapia hormonalna oraz brachyterapia [23]. Decyzja o zastosowaniu danej formy leczenia uzależniona jest od czynników takich jak: typ histologiczny nowotworu, stopień zaawansowania histopatologicznego i klinicznego nowotworu, profil ekspresji receptorów estrogenowych (ER), receptorów progesteronowych (PR), status HER2, indeks mitotyczny Ki67, czy też obecność przeciwwskazań do zastosowania danej formy leczenia [24]. Standardem postępowania w większości raków piersi w stadium ograniczonym lub zaawansowanym lokoregionalnie jest radykalne leczenie operacyjne z zastosowaniem terapii systemowej.

3.1. Systemowa terapia raka piersi

Systemową terapię raka piersi dzielimy na neoadjuwantową i adjuwantową. Terapia systemowa obejmuje hormonoterapię w przypadku raków hormono-wrażliwych, chemioterapię, a także terapię molekularną anty-HER2 u pacjentek o statusie HER2+. Terapia neoadjuwantowa znajduje zastosowanie szczególnie u pacjentek z lokalnie zaawansowanym rakiem piersi bez przerzutów odległych. Jej celem jest zmniejszeniem rozmiarów guza i ułatwienie operacji chirurgicznej. Terapia adjuwantowa ma z kolei za zadanie eliminację utajonych mikroprzerzutów i wydłużenia czasu przeżycia chorych po zastosowaniu leczenia chirurgicznego [25].

3.2. Strategie leczenia

Na podstawie ekspresji ER/PR/HER2/Ki-67 raki piersi możemy podzielić na podtypy biologiczne pozwalające prognozować odpowiedź na dany typ leczenia oraz jego skuteczność. Wyróżniamy cztery zasadnicze podtypy

molekularne: Luminalny A, Luminalny B, Podstawopodobny (ang. triple negative breast cancer TNBC) oraz HER2-bogaty (ang. HER2-enriched) [26]. Z punktu widzenia doboru optymalnego leczenia dla danego pacjenta, niezbędne jest przeprowadzenie badania histopatologicznego z oznaczeniem receptorów estrogenowych, progesteronowych, receptorów HER2 a także indeksu mitotycznego z wykorzystaniem Ki67. Badanie to umożliwia zaklasyfikowanie raka piersi do jednego z wymienionych wyżej podtypów molekularnych. Badanie to powinno być przeprowadzone w ośrodku referencyjnym posiadającym wystandaryzowane metody oznaczeń, co zapewnia pewność i wiarygodność otrzymanych wyników.

Tabela 1. Podstawowe podtypy molekularne raka piersi według konsensusu z St gallen (2013) [opracowanie własne] [27]

LUMINALNY A	ER+ i/lub PR+	HER2 ujemny	Ki67 < 14 %
LUMINALNY B (HER+)	ER+ i/lub PR+	HER2 dodatni	Ki67 dowolny
LUMINALNY B (HER-)	ER+ i/lub PR+	HER2 ujemny	Ki67 wysoki (>14%)
TRÓJUEMNY (TNBC)	ER-, PR-	HER2 ujemny	Ki67 dowolny
HER2 - dodatni	ER-, PR-	HER2 dodatni	Ki67 dowolny

Typ luminalny A najlepiej reaguje na hormonoterapię. W leczeniu raka luminalnego B stosuje się chemioterapię opartą na antracyklinach i taksanach, a także hormonoterapię. Jeśli jest to podtyp z obecnością receptorów HER2, stosuje się dodatkowo terapię anty-HER2 (trastuzumab, pertuzumab). W terapii raka trójujemnego zastosowanie znajdują głównie chemioterapia. Raka HER2- dodatniego leczy się z kolei przy pomocy terapii anty-HER2 oraz chemioterapii [28].

4. Trastuzumab Derukstekan

Trastuzumab derukstekan (nazwa handlowa - ENHERTU®) po raz pierwszy wszedł do użycia klinicznego w 2019 roku, kiedy to FDA (ang. Food

and Drug Administration) w przyspieszonym trybie zatwierdziła jego użycie u pacjentów z HER2 dodatnim, nieresekcyjnym lub metastatycznym rakiem piersi, leczonych wcześniej przynajmniej dwoma liniami leków przeciw receptorom HER2. Decyzja ta była pokłosiem bardzo pozytywnych wyników badania o nazwie DESTINY-Breast01, które wykazało całkowity odsetek odpowiedzi (ang. overall response rate ORR) na poziomie 60,3%, natomiast mediana czasu odpowiedzi na lek (ang. duration of response DOR) wyniosła 14,8 miesięcy ^[29]. Od tego czasu lek ten stanowi obiekt zainteresowania specjalistów onkologii klinicznej na całym świecie, którzy upatrują w nim nadzieję na prawdziwy przełom w leczeniu licznych HER2 dodatnich nowotworów.

4.1. Mechanizm działania

Trastuzumab derukstekan (T-DXd) należy do grupy leków skoniugowanych typu ADC (ang. Antibody- Drug Conjugate). Składa się z humanizowanego przeciwciała monoklonalnego klasy IgG1 przeciwko receptorowi HER2 (trastuzumab) oraz chemioterapeutyku będącego inhibitorem topozomerazy I (derukstekan), połączonych kowalencyjnie przez tetrapeptydowy łącznik ^[30]. Taka budowa leku zapewnia celowaną terapię raka, opierającą się na dostarczaniu leku bezpośrednio do komórek nowotworowych wykazujących ekspresję receptora HER2 i minimalizuje narażenie zdrowych komórek na działanie derukstekanu ^[31]. Sam trastuzumab oprócz tego, że stanowi swoisty transporter chemioterapeutyku do komórek zmienionych, może ponadto blokować receptor HER2 przyczyniając się w ten sposób do zahamowania stymulacji komórek raka przez czynniki wzrostu ^[32]. T-DXd spośród innych ADC wyróżnia się wyjątkowo wysokim stosunkiem chemioterapeutyków do przeciwciała wynoszącym około 8:1 ^[33]. Dzięki tak wysokiemu stosunkowi lek:przeciwciało T-DXd wykazuje unikalny efekt, tzw. "Bystander effect", polegający na przenikaniu chemioterapeutyku również do sąsiednich komórek, nie wykazujących ekspresji receptorów HER2 na swojej powierzchni. Uważa się, że to właśnie ten efekt jest odpowiedzialny za skuteczność trastuzumabu derukstekanu w leczeniu raków piersi z niską ekspresją receptora HER2.

Po dotarciu T-DXd do komórek docelowych sekwencja zdarzeń wygląda następująco:

- Połączenie trastuzumabu do receptora HER2 na powierzchni komórek raka;
- Internalizacja kompleksu do wnętrza komórki i rozkład łącznika kompleksu T-DXd przez enzymy lizosomalne;

- Uwolnienie derukstekanu, który łącząc się z topoizomerazą I hamuje jej działanie prowadząc do zahamowania replikacji DNA, zatrzymania cyklu komórkowego i w konsekwencji do apoptozy komórki ^[34].

4.2. Miejsce w terapii

Prawdziwy przełom stanowi możliwość zastosowania T-DXd w leczeniu pacjentek z przerzutowym rakiem piersi wykazującym niską ekspresję receptora HER2 (HER2-low). Pacjentki te były dotychczas traktowane tak samo jak pacjentki HER2 ujemne ze względu na fakt, że dostępne terapie anty-HER2 nie poprawiały istotnie wyników leczenia w tej grupie chorych ^[35]. Co za tym idzie, w tej grupie pacjentek możliwości celowanego leczenia były ograniczone i w razie progresji choroby podczas stosowania terapii pierwszej linii były one zazwyczaj kwalifikowane do systemowego leczenia paliatywnego ^[36]. Wszystko zmieniło się wraz z przeprowadzeniem badania o nazwie DESTINY-Breast04, które wykazało skuteczność zastosowania T-DXd w grupie pacjentek z przerzutowym rakiem piersi o statusie HER2-low. Wyniki badania pokazały 50% redukcję ryzyka zgonu lub progresji choroby w tej grupie względem standardowo stosowanej chemioterapii. Przekłada się to na średnie wydłużenie przeżycia o 6 miesięcy ^[37].

4.3. Skutki uboczne

Do skutków ubocznych odnotowanych podczas terapii T-DXd należą przede wszystkim łagodne zaburzenia, takie jak nudności, wymioty oraz łysienie. Do częściej obserwowanych poważnych efektów ubocznych zaliczamy neutropenię u 13,7% pacjentów, anemię - u 8%, śródmiąższowe zapalenie płuc - u 12,1% oraz zaburzenia kurczliwości lewej komory u 4,6% pacjentów ^[38].

5. Podsumowanie

Trastuzumab derukstekanu stanowi niewątpliwie jeden z najbardziej obiecujących leków współczesnej onkologii. Daje nadzieję na poprawę rokowania w licznych grupach pacjentów, zarówno z przerzutowym rakiem piersi, jak i innymi rakami wykazującymi ekspresję receptora HER2. Obecnie T-DXd posiada rejestrację w terapii nowotworów takich jak niedrobnokomórkowy rak płuca, zaawansowany rak żołądka, rak jelita grubego oraz rak piersi, w którym zastosowanie T-DXd opisano w powyższym tekście.

Z pewnością w najbliższych latach możemy spodziewać się licznych prób zastosowania tego nowatorskiego leku w różnych grupach pacjentów, co może istotnie wydłużyć rokowanie w tych grupach chorych.

Referencje

- [1] Hulvat MC. Cancer incidence and trends. *Surg Clin North Am.* 2020;100(3):469-481. doi:10.1016/j.suc.2020.01.002.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL i in. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- [3] Gucalp A, Traina TA, Eisner JR i in. Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;173(1):37-48. doi:10.1007/s10549-018-4921-9.
- [4] Radecka B, Litwiniuk M. Breast cancer in young women. *Ginekologia Polska.* 2016;87(9):659-663. doi:10.5603/gp.2016.0062.
- [5] Hankey BF. State bite age distribution of breast cancer cases. *JNCI J National Cancer Inst.* 1994;86(19):1441. doi:10.1093/jnci/86.19.1441.
- [6] Ribnikar D, Ribeiro JM, Pinto D i in. Breast cancer under age 40: a different approach. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(4). doi:10.1007/s11864-015-0334-8.
- [7] Bennett LM. Breast cancer: genetic predisposition and exposure to radiation. *Mol Carcinog.* 1999;26(3):143-149. doi:10.1002/(sici)1098-2744(199911)26:3%3C143::aid-mc2%3E3.0.co;2-s.
- [8] Ford D, Easton DF, Stratton M i in. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet.* 1998;62(3):676-689. doi:10.1086/301749.
- [9] Jerzak KJ, Mancuso T, Eisen A. Ataxia–telangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: a narrative review. *Curr Oncol.* 2018;25(2):176. doi:10.3747/co.25.3707.

- [10] Kaur RP, Vasudeva K, Kumar R, Munshi A. Role of p53 gene in breast cancer: focus on mutation spectrum and therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 2018;24(30):3566-3575. doi:10.2174/1381612824666180926095709.
- [11] Varna M, Bousquet G, Plassa LF, Bertheau P, Janin A. TP53 status and response to treatment in breast cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1-9. doi:10.1155/2011/284584.
- [12] Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2012;13(11):1141-1151. doi:10.1016/s1470-2045(12)70425-42012;13(11):1141-1151. doi:10.1016/s1470-2045(12)70425-4 .
- [13] Rosato V, Bosetti C, Negri E i in. Reproductive and hormonal factors, family history, and breast cancer according to the hormonal receptor status. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(5):412-417. doi:10.1097/cej.0b013e3283639f7a.
- [14] Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic Rev.* 1993;15(1):36-47. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036115.
- [15] Kanadys W, Barańska A, Malm M i in. Use of oral contraceptives as a potential risk factor for breast cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control studies up to 2010. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(9):4638. doi:10.3390/ijerph18094638.
- [16] Marsden J, Pedder H. HRT and breast cancer risk – Fast facts. *Post Reprod Health.* 2021;27(1):42-44. doi:10.1177/2053369120973424.
- [17] Sun YS, Zhao Z, Yang ZN i in. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci.* 2017;13(11):1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635.
- [18] Freudenheim JL. Alcohol's effects on breast cancer in women. *Alcohol Res.* 2020;40(2). doi:10.35946/arcr.v40.2.11.
- [19] Romieu I, Scoccianti C, Chajès V i in. Alcohol intake and breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int J Cancer.* 2015;137(8):1921-1930. doi:10.1002/ijc.29469.

- [20] Kolak A, Kamińska M, Sygit K i in. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Ann Agric Environ Med.* 2017;24(4):549-553. doi:10.26444/aaem/75943.
- [21] Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Investig.* 2017;127(1):1-4. doi:10.1172/jci92035.
- [22] Hopkins BD, Goncalves MD, Cantley LC. Obesity and cancer mechanisms: cancer metabolism. *J Clin Oncol.* 2016;34(35):4277-4283. doi:10.1200/jco.2016.67.9712.
- [23] Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment. *JAMA.* 2019;321(3):288. doi:10.1001/jama.2018.19323.
- [24] Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician.* 2010;81(11):1339-1346.
- [25] Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *JPN J Clin Oncol.* 2020;50(3):225-229. doi:10.1093/jjco/hyz213.
- [26] Prat A, Pineda E, Adamo B i in. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015;24:S26—S35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008.
- [27] Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care.* 2013;8(2):102-109. doi:10.1159/000351193.
- [28] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-1747. doi:10.1093/annonc/mdr304.
- [29] Narayan P, Osgood CL, Singh H, et al. FDA Approval Summary: Fam-Trastuzumab Deruxtecan-Nxki for the Treatment of Unresectable or Metastatic HER2-Positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2021;27(16):4478-4485. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-4557.
- [30] Keam SJ. Trastuzumab deruxtecan: first approval. *Drugs.* 2020;80(5):501-508. doi:10.1007/s40265-020-01281-4.

- [31] Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1). doi:10.1038/s41392-022-00947-7.
- [32] Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol.* 2007;18(6):977-984. doi:10.1093/annonc/mdl475.
- [33] Nakada T, Sugihara K, Jikoh T, Abe Y, Agatsuma T. The latest research and development into the antibody–drug conjugate, [fam-] trastuzumab deruxtecan (ds-8201a), for HER2 cancer therapy. *Chem Pharm Bull.* 2019;67(3):173-185. doi:10.1248/cpb.c18-00744.
- [34] Yamato M, Hasegawa J, Maejima T i in. DS-7300a, a DNA topoisomerase I inhibitor, dxd-based antibody–drug conjugate targeting B7-H3, exerts potent antitumor activities in preclinical models. *Mol Cancer Ther.* 2022;21(4):635-646. doi:10.1158/1535-7163.mct-21-0554.
- [35] Fehrenbacher L, Cecchini RS, Geyer Jr CE i in. NSABP B-47/NRG oncology phase III randomized trial comparing adjuvant chemotherapy with or without trastuzumab in high-risk invasive breast cancer negative for HER2 by FISH and with IHC 1+ or 2+. *J Clin Oncol.* 2020;38(5):444-453. doi:10.1200/jco.19.01455.
- [36] Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM i in. HER2-Low breast cancer: pathological and clinical landscape. *J Clin Oncol.* 2020;38(17):1951-1962. doi:10.1200/jco.19.02488.
- [37] T-DXd: new standard for her2-low breast cancer. *Cancer Discov.* 2022:OF1. doi:10.1158/2159-8290.cd-nb2022-0043.
- [38] Modi S, Jacot W, Yamashita T i in. Trastuzumab deruxtecan in previously treated her2-low advanced breast cancer. *New Engl J Med.* 2022. doi:10.1056/nejmoa2203690.

Larotrektylib – innowacyjny lek dla pacjentów onkologicznych z guzami litymi z fuzją genów NTRK

Aleksander Kubiak, Patryk Kubiak, Izabela Bywalec,
Konrad Kulka, Wiktoria Król, Donata Kowalczyk

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Standardowe leczenie nowotworów obejmujące leczenie chirurgiczne, chemioterapię oraz radioterapię wiąże się z występowaniem licznych i obciążających pacjenta działań niepożądanych, a w dodatku często bywa nieskuteczne. Nowoczesne podejście do terapii przeciwnowotworowej obejmuje zastosowanie leków wysoce specyficznych względem danych cząsteczek. Jednym z nich jest larotrektylib, będący inhibitorem kinazy TRK. Jest on wykorzystywany w leczeniu guzów litych z obecną fuzją genów z rodziny NTRK, które stanowią aż 1% wszystkich guzów litych. Jego zastosowanie wiąże się z mniejszą liczbą działań niepożądanych dla chorych oraz znaczną (>70%) efektywnością kliniczną pod postacią zmniejszenia objętości guza, a nawet możliwością wystąpienia całkowitej remisji choroby. Ponadto warto zaznaczyć, że larotrektylib wykazuje powyższy efekt we wszystkich rodzajach guzów litych (niezależnie od ich typu histopatologicznego), które wykazują fuzję genów NTRK oraz jest skuteczny w bardzo szerokim przedziale wiekowym obejmującym osoby od 1 miesiąca do 84 roku życia. Wszystkie te cechy wskazują, że larotrektylib stanowi przełom w leczeniu guzów litych z obecną fuzją NTRK oraz daje nadzieję wielu pacjentom na całkowitą lub częściową remisję choroby.

Słowa kluczowe: larotrektylib, nowotwór, NTRK, TRK

Abstract: Standard cancer treatment involving surgery, chemotherapy and radiation therapy is associated with numerous and patient-burdensome side effects, and is often ineffective. Modern approach to anticancer therapy includes the use of drugs that are highly specific to the molecules involved. One of these is larotrectinib, which is a TRK kinase inhibitor. It is used in the treatment of solid tumors with NTRK family gene fusions present, which account for as much as 1% of all solid tumors. Its use is associated with fewer side effects for patients and significant (>70%) clinical efficacy in the form of tumor volume reduction and even the possibility of complete remission of the disease. In addition, it is noteworthy that larotrectinib shows the above effect in all types of solid tumors (regardless of their histopathological type) that express NTRK gene fusion, and is effective in a very wide age range covering patients

from 1 month to 84 years old. All of these features indicate that larotrectinib is a viable treatment for solid tumors with NTRK fusion present, and offers hope to many patients for complete or partial remission of their disease.

Keywords: larotrectinib, tumor, NTRK, TRK

1. Wstęp

Transformacja nowotworowa to proces polegający na nagromadzeniu w materiale genetycznym komórki licznych błędów, które w konsekwencji prowadzą do jej niekontrolowanych podziałów i rozwoju choroby nowotworowej. Każdy nowotwór zawiera charakterystyczny jedynie dla siebie zestaw nagromadzonych błędów w DNA, jednak wiele z poszczególnych nieprawidłowości są powtarzalne wśród różnego typu nowotworów. Guzy łagodne ze względu na swój złożony, lecz mało stabilny genom cechują się większą niestabilnością genomową powodująca występowanie m.in. fuzji genowych. Uważano, iż fuzje genów są specyficzne dla danego rodzaju nowotworu, jednak późniejsze badania przeczyły tej tezie^[1]. Przykładem jest fuzja genów z rodziny NTRK (receptorowej kinazy tyrozynowej dla neurotrofin) powodująca powstawanie nieprawidłowej kinazy receptora tropomiozyny (TRK). Nowoczesne podejście do terapii onkologicznej uwzględnia stosowanie leków wysoce specyficznych, które są skierowane przeciwko konkretnej cząsteczce lub receptorowi charakterystycznemu dla danego nowotworu, co nadaje leczeniu spersonalizowany charakter. Larotrectynib będący inhibitorem skierowanym przeciwko TRK, stanowi nową opcję terapeutyczną w leczeniu guzów łagodnych zlokalizowanych w różnych częściach ciała, które są spowodowane fuzją genów NTRK. Wskazania do jego stosowania obejmują nowotwory w stadium zaawansowanym lub te, które rozprzestrzeniły się na inne części ciała lub sytuacje, w których operacja usunięcia nowotworu może spowodować poważne powikłania oraz jeśli nie ma innych zadowalających możliwości leczenia. Podstawą włączenia leczenia jest wykrycie zmian w genie NTRK^[2]. Jest to możliwe przez zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji opartego na DNA lub RNA, a także innych testów takich jak fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) lub PCR z odwrotną transkryptazą^[3, 4]. Dostępne są ograniczone dane dotyczące przydatności diagnostycznej immunohistochemii w wykrywaniu zmian genu NTRK w praktyce patologii onkologicznej^[5, 6].

2. Metodologia

Poniższy rozdział monografii został opracowany na podstawie dostępnych publikacji naukowych udostępnionych w medycznych bazach naukowych, takich jak Google Scholar, PubMed oraz medycznych podręczników akademickich. Na podstawie danych dostępnych w analizowanych artykułach zostały wykonane tabele.

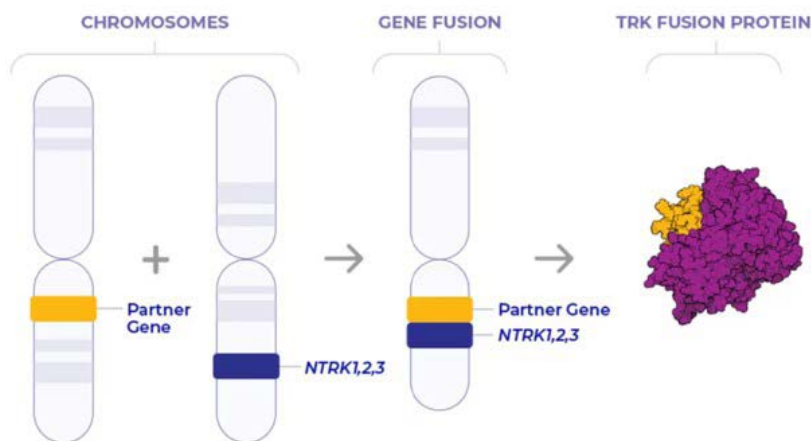
3. Udział genów NTRK w procesie nowotworzenia

Jak już wspomniano wyżej podstawą do włączenia terapii larotrekty nibem jest wystąpienie fuzji genów z rodziny NTRK. Genem fuzyjnym nazywamy gen hybrydowy utworzony z fragmentów pierwotnie niezależnych genów tzw. partnerów fuzyjnych. Partnerskie geny mogą być zlokalizowane na jednym, bądź wielu chromosomach. Rodzina genów NTRK składa się z – NTRK1 (locus 1q23.1), NTRK2 (locus 9q21.33) i NTRK3 (locus 15q25.3) – kodujących kinazy tyrozynowe receptora tropomiozynowego (odpowiednio: TRKA, TRKB oraz TRKC) i biorących udział w procesie rozwoju i utrzymania prawidłowego funkcjonowania neuronów^[7]. Są one aktywowane przez różne ligandy, w tym czynnik wzrostu nerwów (NGF), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), neurotrofinę 4 (NT-4) i neurotrofinę 3 (NT-3). Fuzje TRK (fuzje między jednym z genów NTRK a genem partnerskim 5') powstają w wyniku rearanzacji wewnątrzchromosomalnych lub międzychromosomalnych, które łącznie prowadzą do ekspresji chimerycznej onkoproteiny charakteryzującej się niezależną od ligandu aktywacją kinazy. To prowadzi do niekontrolowanej aktywacji szlaków wewnątrzkomórkowych odpowiedzialnych za proliferację komórki i napędza proces onkogenezy. Łącznie mogą być one odpowiedzialne za 1% wszystkich guzów litych^[8 - 14]. Rearanzacje genów NTRK1/2/3 stwierdzono w wielu typach nowotworów, które można pogrupować według częstości z jaką fuzje te są wykrywane:

- Rzadkie typy raka, które wykazują fuzje NTRK z częstością >90%, w tym wydzielniczy rak piersi, analogiczny rak wydzielniczy sutka (MASC), wrodzony nerczak mezoblastyczny (podtypy komórkowe lub mieszane) i włókniakomięsaki wczesnodziecięce;
- Częste guzy lite z przewagą fuzji NTRK 5–25%: rak brodawkowaty tarczycy, nowotwory szpicowate, nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST) bez kanonicznych zmian KIT, PDGFRA lub RAS oraz niektóre glejaki dziecięce;

- Częste guzy lite z niską częstością występowania fuzji genów NTRK (<5%, ale przeważnie <1%), takie jak gruczolakorak płuc lub trzustki, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi, rak dróg żółciowych, rak piersi, jelita grubego i nerkowokomórkowy, czerniak, pierwotne guzy mózgu wieku dorosłego oraz mięsaki tkanek miękkich inne niż GIST [3, 15].

NTRK Gene Fusions Lead to the Formation of Oncogenic TRK Fusion Proteins¹



Rycina 1. Ilustracja fuzji genów, której powodem jest produkcja onkogenicznie zmienionych białek TRKA, TRKB i TRKC [16].

4. Mechanizm działania i informacje ogólne

Larotrektylib jest inhibitorem kompetycyjnym adenozynotrójfosforanu (ATP) i wysoce selektywnym inhibitorem dla kinazy receptora tropomiozyny (TRK). Lek wywiera efekt przeciwnowotworowy blokując sygnalizację wzrostu w komórkach z konstytutywną aktywacją białek TRK, wynikającą z fuzji genów w komórce, delecji domeny regulującej białka lub w komórkach, w których zachodzi nadekspresja białka TRK. Hamowanie tych efektów jest podstawą leczenia nowotworów fuzyjnych TRK. Larotrektylib dostępny pod nazwą handlową Vitrakvi, został zarejestrowany w przypadkach miejscowo zaawansowanych, przerzutowych lub nieoperacyjnych guzów litych oraz gdy inne terapie nie cechują się zadowalającymi wynikami. Dostępny jest w postaci kapsułek (25mg, 100mg) lub roztworu doustnego (20mg/100ml). W standardowej terapii lek przyjmuje się doustnie dwa razy dziennie do czasu

progresji choroby lub wystąpienia nieakceptowalnej toksyczności. Dawkowanie u dzieci i młodzieży jest oparte na wielkości powierzchni ciała. Zalecana dawka u dzieci i młodzieży to 100 mg/m² larotrektynybu dwa razy na dobę, maksymalnie 100 mg na dawkę. Do działań niepożądanych zgłaszanych w trakcie terapii zaliczyć można: zwiększenie aktywności AlAT, zwiększenie aktywności AspAT, zmniejszenie liczby neutrofilów (neutropenia), zmniejszenie liczby leukocytów (leukopenia), zaburzenia smaku, wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej we krwi, wymioty, zaparcia, zmęczenie, nudności, niedokrwistość, zawroty głowy, i ból mięśni [2]. Bezpieczeństwo stosowania u osób w podeszłym wieku (≥65 lat) jest spójne z profilem obserwowanym u młodszych pacjentów. Na podstawie działania leku nie można wykluczyć działania teratogennego [17].

5. Rezultaty badań klinicznych

Pomiędzy 2014 a 2019 rokiem przeprowadzono trzy otwarte badania kliniczne fazy I i II „SCOUT” i „NAVIGATE”. Łącznie wzięło w nich udział 159 pacjentów w przedziale wiekowym od 1 miesiąca do 84 roku życia. W badaniu „SCOUT” mogli wziąć udział pacjenci z udokumentowaną fuzją genu NTRK lub bez niej, natomiast u pacjentów włączonych do badania „NAVIGATE” musiał występować nowotwór ze stwierdzoną fuzją TRK. Większość pacjentów biorących udział w badaniu było wcześniej poddanych standardowej terapii. Ze względu na rzadkość występowania oraz brak specyficzności fuzji genów NTRK dla konkretnego typu nowotworu pacjenci objęci badaniami stanowili heterogenną grupę obejmującą różne typy guzów nowotworowych (tabela 1.). Lek był podawany doustnie, w ciągłym 28 dniowym harmonogramie, dwa razy dziennie w dawce 100 mg u dorosłych oraz 100 mg/m² (maksymalnie 100 mg) w grupie pediatrycznej. 79% chorych przyjmowała larotrektynib przez 12 miesięcy, a 66% przez 24 miesiące. Zbiorcza analiza wyników badania wykazała, że 79% (121/153) pacjentów uzyskało pozytywną odpowiedź na leczenie pod postacią zmniejszenia wielkości guza. Całkowitą odpowiedź rozumianą jako remisja choroby, uzyskało natomiast 16% pacjentów [18]. Kontynuacja badań obejmująca łącznie 192 pacjentów wykazała całkowity odsetek odpowiedzi pozytywnej na poziomie 72% (139/192). W badaniu brało również udział 33 chorych z pierwotnymi guzami OUN. W ich grupie zarejestrowano potwierdzoną odpowiedź u 24% (8/33), całkowitą odpowiedź u 9% (3/33) oraz stabilizację choroby u 61% (20/33) [2]. Dane te wskazują, że larotrektynib może być również aktywny

w OUN, co daje perspektywy na prowadzenie dalszych badań w tym kierunku. Larotrekty nib wykazuje zbliżoną skuteczność w porównaniu do innego leku o podobnym mechanizmie działania – entrekty nibu, w przypadku którego pozytywna odpowiedź na leczenie stwierdzona w badaniach wynosi od 70 do 74%. Jednak leczenie larotrekty nibem skutkuje medianą lat życia przed progresją na poziomie 5.4 i medianą całkowitych lat życia 7.0 w porównaniu do entrekty nibu, gdzie było to odpowiednio 1.2 oraz 1.8 [3, 19, 20, 21]. Powyższe dane przedstawiono graficznie w tabeli numer 2 (tabela 2.).

Tabela 1. Procentowy rozkład typów zidentyfikowanego guza u leczonych pacjentów [opracowanie własne] [18].

Rodzaj guza	Ilość pacjentów
Włóknakiomęsak niemowłęcy	29 (18%)
Guz podścieliskowy przewodu pokarmowego	4 (3%)
Inny mięsak tkanek miękkich	36 (23%)
Tarczycza	26 (16%)
Gruzoł ślinowy	21 (13%)
Płuco	12 (8%)
Okrężnica	8 (5%)
Czerniak	7 (4%)
Piers	5 (3%)
Mięsak kości	2 (1%)
Rak dróg żółciowych	2 (1%)
Trzustka	2 (1%)
Wrodzony nerczak mezoblastyczny	1 (<1%)
Wątrobowokomórkowy	1 (<1%)
Prostata	1 (<1%)

Tabela 2. Dane z opisanych badań klinicznych wraz z ich wynikami pod postacią odsetka pacjentów, u których obserwowano odpowiedź związaną z leczeniem [opracowanie własne] [2, 18, 19].

Okres badania do 2019 roku	
Pozytywna odpowiedź na leczenie	79%
Całkowita odpowiedź na leczenie	16%
Okres badania po 2019 roku	
Pozytywna odpowiedź na leczenie	72%
Odpowiedź w zakresie pierwotnych guzów OUN	
Pozytywna odpowiedź na leczenie	24%
Całkowita odpowiedź na leczenie	9%
Stabilizacja choroby	61%

6. Refundacja

Lek uzyskał warunkowe dopuszczenie do obrotu, a w Polsce od 1 marca 2023 roku jest objęty programem lekowym (szacunkowa cena leku wynosi €6,330.85 za 56 kapsułek 100 mg). Refundacja obejmuje: leczenie chorych z różnymi typami nowotworów litych, w przypadku których stwierdza się fuzję genu NTRK, leczenie dotyczące pacjentów z nowotworami w stadium miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym, u których brak jest możliwości leczenia miejscowego lub jego podjęcie może doprowadzić do poważnych i niekorzystnych następstw zdrowotnych, przypadki wyczerpania innych możliwości oraz brak innych terapii o potwierdzonych korzyściach klinicznych w danym wskazaniu [22]. Każdy pacjent spełniający powyższe kryteria może zostać włączony do programu lekowego, który obecnie na terenie Polski jest prowadzony w dwóch ośrodkach. Są to Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie oraz Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku. W przyszłości będzie to możliwe w większej ilości miejsc, w związku z ogłoszonymi konkursami w innych województwach, m.in. świętokrzyskim i małopolskim. Szczegółowe informacje dotyczące kryterium przyjęcia do programu są zawarte w bazie ClinicalTrials [23, 24].

7. Podsumowanie

Wdrożenie spersonalizowanego leczenia dostosowanego pod konkretnego pacjenta na podstawie profilu molekularnego występującego u niego nowotworu stanowi przyszłość terapii onkologicznej. Umożliwia to uniknięcie licznych działań niepożądanych obserwowanych u chorych poddawanych chemioterapii oraz radioterapii, które obejmują w przypadku chemioterapii: mielosupresję, niedokrwistość, wypadanie włosów, silne nudności i wymioty, które często wiążą się z koniecznością przyjmowania leków przeciwwymiotnych, czy ogólne wyniszczenie oraz w przypadku radioterapii: zapalenie napromienianej okolicy, włóknienie skóry, tkanki podskórnej i mięśni, czy ryzyko wystąpienia w przyszłości nowotworu w obrębie poddanego terapii fragmentu ciała [25, 26]. Larotrekty nib jako lek wysoce specyficzny powoduje znacznie mniej działań niepożądanych oraz ich mniejsze nasilenie w stosunku do wyżej wspomnianych metod leczenia przez mniejsze oddziaływanie toksyczne na prawidłowe komórki. Jego zastosowanie charakteryzuje się ponad 70% odpowiedzią na leczenie oraz wskaźnikiem całkowitej odpowiedzi na poziomie 16%. Ponadto w przyszłości lek może potencjalnie być wykorzystywany

w leczeniu nowotworów pierwotnych OUN, ze względu na dobre rezultaty jego zastosowania w grupie chorych z tym rodzajem guzów. Należy podkreślić, że skuteczność leczenia z jego użyciem została wykazana w wielu typach guzów litych i była niezależna od wieku chorych, co umożliwiła jego szerokie zastosowanie. Dodatkowo pacjenci poddani terapii z jego użyciem wykazują dłuższą medianę przeżycia bez nawrotów oraz ogólną w stosunku do innego stosowanego preparatu o podobnym mechanizmie działania - entrektylibu. Badania kliniczne nad larotrektylibem oraz innymi specyficznymi inhibitorami stosowanymi w celowanych terapiach przeciwnowotworowych powinny być dalej rozwijane ze względu na ogromny potencjał w leczeniu wyselekcjonowanych pod względem molekularnym nowotworów, które stanowią szeroko rozpowszechniony problem medyczny ze względu na prowadzony styl życia oraz starzejące się społeczeństwo [27]. Dalsze badania umożliwią wprowadzenie kolejnych, jeszcze skuteczniejszych generacji leków oraz obniżą koszt terapii obecnymi preparatami, co znacznie zwiększy ich dostępność. Stanowi to nadzieję dla wielu obecnie i przyszłych chorych na dłuższy okres przeżycia oraz nawet na całkowitą remisję choroby.

Referencje

- [1] Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):233-245. doi:10.1038/nrc2091.
- [2] VITRAKVI - European Medicines Agency. European Medicines Agency. Published December 16, 2021. Accessed March 21, 2023. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/VITRAKVI>.
- [3] Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(12):731-747. doi:10.1038/s41571-018-0113-0.
- [4] Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1417-1427. doi:10.1093/annonc/mdz204.
- [5] Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol*. 2019;32(1):147-153. doi:10.1038/s41379-018-0118-3.

- [6] Solomon JP, Benayed R, Hechtman JF, Ladanyi M. Identifying patients with NTRK fusion cancer. *Ann Oncol.* 2019;30(Suppl_8):viii16-viii22. doi:10.1093/annonc/mdz384.
- [7] Russo, Alessandro, Ana Rita Lopes, Katherine Scilla, Ranee Mehra, Vincenzo Adamo, Julio Oliveira, Stephen V. Liu, & Christian Rolfo. "NTRK and NRG1 gene fusions in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)." *Precision Cancer Medicine* [Online], 3 (2020): n. pag. Web. 10 Jun. 2023.
- [8] Russell JP, Powell DJ, Cunnane M, et al. The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium. *Oncogene.* 2000;19(50):5729-5735. doi:10.1038/sj.onc.1203922.
- [9] Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell.* 2002;2(5):367-376. doi:10.1016/s1535-6108(02)00180-0.
- [10] Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1469-1472. doi:10.1038/nm.3352.
- [11] Wiesner T, He J, Yelensky R, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun.* 2014;5:3116. doi:10.1038/ncomms4116.
- [12] Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov.* 2015;5(1):25-34. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0765.
- [13] Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun.* 2014;5:4846. Published 2014 Sep 10. doi:10.1038/ncomms5846.
- [14] Zhang Y, Yang L, Kucherlapati M, et al. A Pan-Cancer Compendium of Genes Deregulated by Somatic Genomic Rearrangement across More Than 1,400 Cases. *Cell Rep.* 2018;24(2):515-527. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.025.
- [15] Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open.* 2016;1(2):e000023. Published 2016 Mar 18. doi:10.1136/esmoopen-2015-000023.

- [16] 2023 Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Inc. All rights reserved. Bayer, the Bayer Cross, and VITRAKVI are registered trademarks of Bayer. Last updated on 1/2023 PP-VIT-ALL-0596-1 <https://www.vitrakvi.com/about-vitrakvi>.
- [17] Larotrectinib. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; April 15, 2019.
- [18] Hong DS, DuBois SG, Kummar S, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):531-540. doi:10.1016/S1470-2045(19)30856-3.
- [19] Roth JA, Carlson JJ, Xia F, Williamson T, Sullivan SD. The Potential Long-Term Comparative Effectiveness of Larotrectinib and Entrectinib for Second-Line Treatment of TRK Fusion-Positive Metastatic Lung Cancer. *J Manag Care Spec Pharm.* 2020;26(8):981-986. doi:10.18553/jmcp.2020.20045.
- [20] Doebele RC, Drlon A, Paz-Ares L, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2020 Feb;21(2):e70] [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2020 Jul;21(7):e341] [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2020 Aug;21(8):e372] [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2021 Oct;22(10):e428]. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):271-282. doi:10.1016/S1470-2045(19)30691-6.
- [21] Drlon A, Siena S, Dziadziuszko R, et al. Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1-2 trials [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2020 Feb;21(2):e70] [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2020 Jul;21(7):e341]. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):261-270. doi:10.1016/S1470-2045(19)30690-4.
- [22] Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 20 lutego 2023 r. w sprawie wykazu leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na 1 marca 2023 r.
- [23] Baza danych o badaniach klinicznych - Clinical Trials.

- [24] *Vitrakvi*. (n.d.). Kup Vitrakvi (Larotrectinib) Online - Cena I Koszty |. Everyone.org. <https://pl.everyone.org/vitrakvi-larotrectinib>.
- [25] Barazzuol L, Coppes RP, van Luijk P. Prevention and treatment of radiotherapy-induced side effects. *Mol Oncol*. 2020;14(7):1538-1554. doi:10.1002/1878-0261.12750.
- [26] Hauner K, Maisch P, Retz M. Nebenwirkungen der Chemotherapie [Side effects of chemotherapy]. *Urologe A*. 2017;56(4):472-479. doi:10.1007/s00120-017-0338-z.
- [27] Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217-222. doi:10.2991/jegh.k.191008.001.

Pluvicto- nowy radioligand stosowany w leczeniu raka prostaty

**Izabela Bywalec, Donata Kowalczyk, Patryk Kubiak,
Wiktoria Król, Konrad Kulka, Aleksander Kubiak**

Studenckie Koło Naukowe im. Zbigniewa Religii przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Rak prostaty jest najczęstszym nowotworem złośliwym u mężczyzn. Każdego roku w Europie diagnozę słyszy ok. 417 tys. mężczyzn, a liczba rozpoznac wzrasta głównie w wyniku upowszechnienia oznaczania stężenia markera nowotworowego PSA we krwi. Sposób leczenia zależy od szeregu czynników m.in. stopniem zaawansowania nowotworu. Wyzwanie stanowi zaawansowany rak prostaty, oporny na chemioterapię. Nowy lek – Pluvicto, którego substancją czynną jest wipiwotyld-tetraksetan lutetu ¹⁷⁷-Lu oddziałuje na komórki wykazujące ekspresję antygenu PSMA poprzez promieniowanie beta i doprowadza do zniszczenia ich DNA. Dotychczasowe badania pozwalają snuć przypuszczenia, że terapia z wykorzystaniem tego leku będzie lepszą alternatywą dla obecnych metod leczenia zaawansowanego raka gruczołu krokowego.

Słowa kluczowe: radioligand, lutet, mCRPC, PSMA

Abstract: Prostate cancer is the most common malignant tumor among men. Approximately 417,000 people in Europe are diagnosed every year and the number of diagnoses is increasing mainly as a result of popularizing the determination of the concentration of the tumor marker PSA in the blood. The treatment method depends on many factors, including cancer stage. Advanced prostate cancer, which is resistant to chemotherapy, is challenging. A new drug - Pluvicto, whose active substance is vipivotide-lutetium ¹⁷⁷-Lu tetraxetan, affects cells expressing the PSMA antigen. It leads to the destruction of their DNA through beta radiation. The studies carried out so far allow us to speculate that the ligand-related therapy will be a better alternative to the current methods of treating advanced prostate cancer.

Keywords: radioligand, lutetium, mCRPC, PSMA

1. Wstęp

Rak prostaty jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych w populacji mężczyzn na świecie. W Polsce od kilku lat nowotwór ten pod względem zapadalności wyprzedza nowotwór płuca. Transformacja złośliwa w obrębie gruczołu krokowego przebiega wieloetapowo, często mając swój początek jako śród nabłonkowa neoplazja [1,2]. W zdecydowanej większości rak prostaty występuje jako postać ograniczona, rzadziej pojawiają się nacieki na otaczające narządy czy przerzuty do lokalnych węzłów chłonnych. Najrzadziej pojawiająca się postać z obecnymi przerzutami odległymi jest również postacią najbardziej złośliwą, znacznie ograniczającą jakość życia i w praktyce nieuleczalną [3].

Nowotwór prostaty w ponad 95% przypadków występuje w postaci gruczolakoraka, złośliwego nowotworu pochodzenia nabłonkowego, który tworzy struktury gruczolowe. Lokalizuje się zarówno w zrazikach gruczołu krokowego jak również w obrębie przewodów, co jednak zdarza się rzadziej [4,5]. Jako pozostałe 5% w gruczole krokowym rozwinąć się mogą inne typy nowotworów złośliwych, takie jak mięsaki czy raki z nabłonka przejściowego oraz nowotwory o mniejszym potencjale złośliwości, określane jako rozrosty łagodne, czego przykładem jest gruczolak gruczołu krokowego.

Do znanych czynników ryzyka rozwoju raka prostaty oprócz wieku, zalicza się obciążający wywiad rodzinny oraz przynależność rasową i etniczną. Choroba wydaje się być jednak bardziej niż z innymi czynnikami z grupy ryzyka związana z wiekiem - po przekroczeniu 80 roku życia rozwija się u ponad 80% mężczyzn [4-6]. Dodatkowo rolę w rozwoju nowotworu złośliwego gruczołu krokowego odgrywają androgeny - u mężczyzn z niedoczynnością przysadki oraz poddanych kastracji praktycznie nie stawia się jego rozpoznania [7].

1.1. Objawy raka prostaty

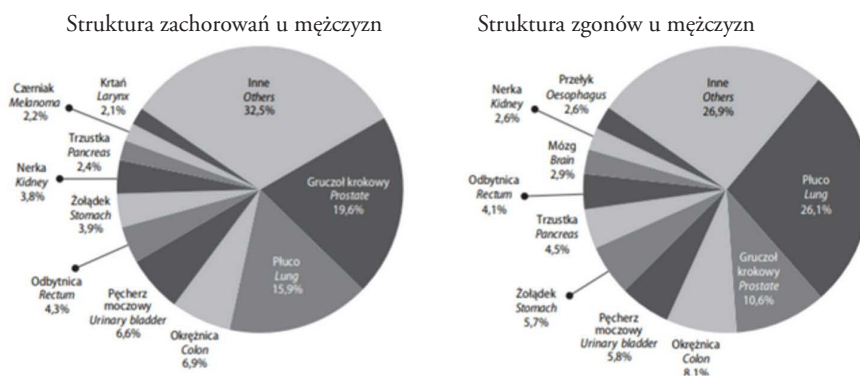
Pacjenci w początkowym stadium raka prostaty często nie odczuwają żadnych specyficznych dolegliwości. Mogą się u nich pojawić objawy z dolnego odcinka dróg moczowych (lower urinary track symptoms, LUST) m.in. związane z gromadzeniem moczu (parcie na mocz), jego oddawaniem (częste oddawanie moczu) czy uczucie niepełnego oddania moczu [1]. Badania wskazują na zwiększone ryzyko występowania zlokalizowanego raka stercza u pacjentów z LUST. Uważa się, że może to wynikać z częstszego zgłaszania się do lekarza pacjentów z LUST, u których wskutek badań diagnozuje się

raka stercza w łagodnym stadium. Nie ma natomiast badań, które potwierdzałyby związek między zaawansowanym rakiem prostaty a LUST [8]. Wraz z rozwojem nowotworu pacjenci mogą zauważać hematospermie i hipospermie [9].

Rak stercza przerzutuje najczęściej do kości, co objawia się bólami kostnymi [1,9]. Inne objawy zaawansowanego nowotworu to niedokrwistość wskutek zajęcia szpiku kostnego i obrzęk dolnej części ciała [9].

1.2. Epidemiologia raka prostaty

Zgodnie z danymi przedstawianymi w raporcie „Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku” nowotwór gruczołu krokowego jest najczęstszym nowotworem mężczyzn z udziałem niemal 20%. Zachorowalność charakteryzuje się największą dynamiką wzrostu, przy jednocześnie utrzymującej się tendencji wzrostowej umieralności (rycina 1.)



Rycina 1. Struktura zachorowań i zgonów na nowotwory wśród mężczyzn według raportu „Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku” publikowanego przez Krajowy Rejestr Nowotworów

Podobne tendencje wzrostowe obserwuje się w całej Europie, gdzie nowotwór prostaty określa się jako najczęstszy nowotwór lity występujący z częstotliwością ponad 214 na 1000 przypadków [10].

Jest to choroba dosięgająca głównie starszych pacjentów w wieku 70 i 80 lat. W związku z wydłużającym się czasem życia, przewiduje się, że problem raka prostaty będzie jedynie narastał.

2. Diagnostyka raka prostaty

W diagnostyce raka prostaty wykorzystuje się badania laboratoryjne stężenia antygenu sterczowego PSA we krwi pacjenta, palpacyjne badanie

przezodbytnicze. Jednak w celu ostatecznego rozpoznania raka prostaty niezbędne jest wykonanie biopsji narządu ^[11].

2.1. Oznaczanie stężenia PSA

Antygen sterczowy jest białkiem wytwarzanym przez komórki nabłonka zarówno zdrowego, jak i zmienionego chorobowo gruczołu krokowego. W surowicy znajduje się PSA związany z nośnikami białkowymi (PSA związane, complexed PSA, cPSA) i tzw. wolne PSA (free PSA, fPSA) ^[12]. Rutynowo w surowicy oznacza się całkowite PSA (total PSA, tPSA), którego zakres referencyjny wynosi od 0 do 4 ng/ml ^[11]. PSA nie jest markerem swoistym dla raka gruczołu krokowego, wzrost jego stężenia w surowicy obserwuje się również w przypadku łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (benin prostatic hyperplasia, BPH), jego zapalenia, w wyniku urazu stercza związanego np. z biopsją gruczołu krokowego ^[11,13]. Przed wykonaniem badania pacjent powinien przestrzegać kilku zaleceń, alby uzyskany wynik był wiarygodny. Na co najmniej 2 dni przed oznaczeniem PSA powinien zrezygnować z czynności takich jak jazda na rowerze czy podróż pociągiem. Wskazane jest również zrezygnowanie z czynności seksualnych w tym czasie. Nie powinno się również wykonywać badania per rectum ani biopsji gruczołu krokowego w krótkim okresie czasu przed oznaczeniem stężenia PSA we krwi. W celu oceny ryzyka raka stercza u pacjentów z wynikiem PSA w zakresie 4-10 ng/ml pomocny jest stosunek fPSA do tPSA. Frakcja poniżej 10% sugeruje raka prostaty, natomiast powyżej 25% łagodny przerost prostaty. Wyniki pomiędzy 10% a 25% są niejednoznaczne ^[14].

2.2. Palpacyjne badanie przez odbytnicze

Badanie per rectum jest prostym badaniem, które pozwala ocenić wielkość i ewentualną nieregularność powierzchni gruczołu krokowego ^[11]. Jego skuteczność we wczesnym wykrywaniu raka stercza jest jednak ograniczona. Większość pacjentów, u których wykryto raka prostaty podczas przesiewowych badań PSA, nie wykazywało nieprawidłowości w badaniu per rectum. Jednak nieprawidłowości wykryte palpacyjnie w badaniu per rectum są wskazaniem do biopsji gruczołu krokowego niezależnie od poziomu PSA we krwi ^[15].

2.3. Biopsja igłowa pod kontrolą ultrasonografii przez odbytniczej (transrectalultrasonography, TRUS)

Biopsję gruczołu krokowego jest wykonywana przez skórę między moszną a odbytem lub przez ścianę odbytnicy. Podczas biopsji gruczoł jest lokalizowany za pomocą ultrasonografii przezodbytniczej [5]. Standardowo pobiera się 10 wycinków z gruczołu krokowego, które następnie badane są histopatologicznie i oceniane wg skali Gleasona. Nie powinno przeprowadzać się rutynowo biopsji u pacjentów z łagodną postacią choroby i bez obecności innych nieprawidłowości np. podwyższonego poziomu PSA [11]. Skala Gleasona opiera się na ocenie architektury komórek dwóch dominujących ognisk nowotworu. Niższy numer w skali Gleasona oznacza wyższy stopień zróżnicowania komórek nowotworowych, ale również wolniejszy rozwój i niższą skłonność do tworzenia przerzutów. Obecnie utkaniu nowotworowemu przypisuje się stopień złośliwości od 3 do 6. Wartości dwóch dominujących ognisk nowotworu dodaje się, a wynik podaje jako Gleasonscore. Minimalny wynik możliwy do uzyskania to 6, który oznacza niski stopień złośliwości nowotworu, natomiast maksymalny wynosi 10 i sugeruje wysoki poziom złośliwości, szybki wzrost, dużą tendencję do naciekania otaczających tkanek [16].

2.4. Biopsja fuzyjna

Biopsja fuzyjna przekroczoowa lub przezodbytnicza polega na fuzji obrazów uzyskanych za pomocą TRUS i rezonansu magnetycznego w celu dokładniejszego ukierunkowania biopsji. Zastosowanie znajduje w następujących przypadkach:

- mężczyźni z podwyższonym poziomem PSA, ale negatywnym wynikiem biopsji pod kontrolą TRUS,
- pacjenci z dużym objętościowogruczołem krokowym,
- nadzór nad mężczyznami z potwierdzonym biopsją rakiem stercza niskiego ryzyka [11,17].

Do względnych przeciwwskazań do wykonania biopsji fuzyjnej, podobnie jak do innych technik biopsji prostaty, są: ostre zapalenie gruczołu krokowego, koagulopatia występująca u pacjenta, bolesne stany anorektum [11].

3. Metody leczenia

Wybór metody leczenia raka prostaty zależy od przebiegu i zaawansowania choroby oraz od wieku pacjenta. W zastosowaniu są zarówno metody chirurgiczne, metody wykorzystujące promieniowanie jonizujące, klasyczna chemioterapia oraz hormonoterapia [tabela 1.]. Metody te zdają się jednak pozostawać jedynie częściowo skuteczne w opornym na kastrację raku prostaty z przerzutami (metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC).

Tabela 1. Metody leczenia raka prostaty, [opracowanie własne]

Metody leczenia raka prostaty	Charakterystyka
Leczenie operacyjne	Polega na usunięciu gruczołu krokowego oraz pęcherzyków nasiennych. Zalecane u pacjentów z postacią ograniczoną do stercza.
Terapia deprywacji androgenów (ang. androgen deprivation therapy, ADT)	Podstawowa metoda leczenia hormonowrażliwego raka prostaty. Stosowana dodatkowo przed leczeniem operacyjnym zwiększa jego efektywność. Również jako terapia paliatywna wśród pacjentów wykluczonych z leczenia radykalnego ^[1,18] .
Kastracja chirurgiczna	Polega na orchidektomii radykalnej-całkowitym usunięciu jąder. Ze względu na złą tolerancję przez pacjentów preferowana jest kastracja farmakologiczna ^[1,19] .
Kastracja farmakologiczna	Wykorzystuje analogii hormonu uwalniającego hormon luteinizujący jak goserelina czy leuprorelina i buserelina lub/ oraz antyandrogeny, np. flutamid czy octan cyproterenu. Nowsze leki hamujące wpływ androgenów to antagoniści receptora androgenowego. Stosowanie antagonistów szlaku AR (ang. androgen receptor, AR), takich jak abirateron lub enzalutamid jest szczególnie skuteczne w przypadku postaci opornej na kastrację bez przerzutów (castration-resistant prostate cancer, CRPC) ^[1,3] .
Chemioterapia	Zalecana u pacjentów z postacią uogólnioną raka stercza oraz w raku stercza z przerzutami, opornym na kastrację mCRPC. Najczęściej wykorzystuje się taksany-docetaksel oraz kaba-zytaksel, rzadziej mitoksantron ^[1,7,19-22] .
Radioterapia	Wykorzystuje radiofarmaceutyki takie jak radionuklid sumaru-153, radionuklid strontu-89 oraz rad- 223 ^[1,21,22] . Wykazuje znaczną skuteczność w przypadku postaci zlokalizowanych oraz z przerzutami do układu kostnego.

Immunoterapia	Immunoterapia komórkowa przy zastosowaniu szczepionki Sipuleucel-T jest zatwierdzona do leczenia bezobjawowego i minimalnie objawowego CRPC [21,22].
Glikokortykosteroidy	Stosowane pomocniczo. Blokują uwalnianie androgenów przez korę nadnerczy na zasadzie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego- farmakologiczna adrenalectomia [18].

W przypadku przerzutów konieczne bywa stosowanie leków niwelujących efekty zajmowania okolicznych i odległych narządów. Pacjenci najczęściej wymagają bisfosfonianów, które zapobiegają utracie gęstości kości, gdzie przerzuty lokalizują się w 90% przypadków [1]. Zbliżone działanie, przy tym jednak mniejszą skuteczność wykazuje donesumab będący inhibitorem ligandu RANK.

4. ¹⁷⁷Lutet wipiwotyld-tetraksetan

Pluvicto jest radiofarmaceutykiem, którego substancją czynną jest wipiwotyld-tetraksetan lutetu ¹⁷⁷-Lu. Jest przeznaczony do leczenia pacjentów z postępującym mCRPC z obecnością antygenu błonowego gruczolu krokowego (ang. prostate-specific membrane antigen, PSMA), którzy byli wcześniej leczeni inhibitorami szlaku sygnałowego AR i chemioterapią opartą na taksanach. Wipiwotyld-trateksan lutetytu ¹⁷⁷-Lu wiąże się z komórkami wykazującymi ekspresję PSMA, a następnie emituje promieniowanie beta z lutetytu ¹⁷⁷-Lu, które oddziałuje na komórki z receptorami PSMA oraz ich otoczenie i w konsekwencji indukuje uszkodzenie DNA komórek [23]. Lek Pluvicto jest podawany dożylnie. Średnie maksymalne stężenie leku po podaniu dożylnie zalecanej dawki wynosi 6,58 ng/ml. Wydalanie następuje głównie przez nerki, a średni czas półtrwania dla tego leku wynosi 41,6 godziny.

4.1. Badanie VISION

Badanie VISION to randomizowane, wielośrodkowe, otwarte badanie III fazy, którego celem była ocena przeżycia pacjentów z przerzutującym, postępującym, opornym na kastrację rakiem gruczolu krokowego z obecnością antygenu PSMA [23,24]. W badaniu wzięło udział 831 mężczyzn, którzy musieli spełniać określone kryteria:

- obecność postępującego PSMA-dodatniego mCRPC,
- stan sprawności wg ECOG 0-2,
- co najmniej 1 przerzut widoczny w TK, MRI lub badaniu obrazowym kości,
- odpowiednia czynność nerek, wątroby oraz odpowiednie parametry hematologiczne,
- wcześniejsze leczenie co najmniej 1 inhibitorem szlaku sygnałowego AR,
- wcześniejsze leczenie co najmniej 2 schematami leczenia taksanami (jeden schemat definiowany był jako ekspozycja na co najmniej 2 cykle leczenia taksanem),
- oczekiwana długość życia przekraczała 6 miesięcy,
- kastracyjny poziom testosteronu <50 ng/dl (<1,7 nmol/l).

Pacjenci poddani byli badaniu PET z wykorzystaniem gozetotytu galu (⁶⁸Ga) w celu oceny ekspresji PSMA. Aby dany chory został zakwalifikowany do badania, musiała u niego występować co najmniej jeden guz z wychwytem ⁶⁸Ga większym niż w prawidłowej tkance wątroby.

Badanie zostało przeprowadzone w 84 ośrodkach (52 w Ameryce Północnej i 32 w Europie). Pacjenci zostali losowo przydzieleni do dwóch grup, z których jedna liczyła początkowo 551 osób, a jej członkowie otrzymywali 7,4 GBq ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 dożylnie co 6 tygodni przez 4 cykle (do maksymalnie 6 cykli według uznania klinicystów) oraz najlepsze leczenie standardowe (ang. Standard of care, SOC). Druga grupa, która składała się z 280 osób, otrzymywała jedynie najlepsze leczenie standardowe. Spośród dozwolonych terapii standardowych wykluczono chemioterapię, immunoterapię, ogólnoustrojowe radioizotopy (rad-223) oraz leki eksperymentalne. Terapie, które były dozwolone obejmowały m.in. zatwierdzone terapie hormonalne, bisfosfoniany, denosumab, glukokortykoidy. Pacjenci byli poddawani kontrolnym skanom CT lub MRI i scyntygrafii kości znakowanym technetem-99m (^{99m}Tc) co 8 tygodni przez 24 tygodnie, a potem co 12 tygodni. Otrzymywali oni tylko SOC lub w połączeniu z ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 do momentu progresji choroby, która została potwierdzona obrazowaniem lub do wystąpienia niemożliwych do zaakceptowania efektów toksycznych, braku klinicznych korzyści, zastosowania zakazanych metod leczenia. Punkty końcowe badania obejmowały całkowite przeżycie (ang. overall survival OS) i przeżycie wolne od progresji radiologicznej (ang. progression free survival, PFS). Drugorzędowe punkty końcowe oceniały czas do wystąpienia objawowych incydentów

kostnych lub zgonu, obiektywną odpowiedź radiologiczną przy użyciu kryteriów określonych w RESIST 1.1 oraz odsetek kontroli choroby oceniany wg RESIST 1.1. Dodatkowo badano również odpowiedź PSA i jakość życia związana ze zdrowiem [24]. Mediana przeżycia i mediana rPFS wynosiły kolejno: 11,3 i 3,4 miesiąca dla pacjentów leczonych SOC oraz 15,3 i 8,7 miesiąca dla chorych poddawanych terapii składającej się z SOC oraz ¹⁷⁷Lu-PSMA-617. Większy spadek poziomu PSA obserwowany był wśród pacjentów otrzymujących SOC razem z ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 w porównaniu do grupy kontrolnej. Ocena jakości życia związana ze stanem zdrowia była znacznie wyższa u pacjentów leczonych ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 razem z SOC. Natomiast czas do nasilenia bólu wynosił odpowiednio 5,9 miesiąca dla terapii składającej się z SOC oraz izotopu i 2,2 miesiąca, dla grupy kontrolnej. Najczęstsze zmiany niepożądane, które pojawiły się u pacjentów leczonych SOC i ¹⁷⁷Lu-PSMA-617, to: zmęczenie (43,1%), suchość w jamie ustnej (38,8%), nudności (35,3%), niedokrwistość (31,8%), ból pleców (23,4%). U chorych otrzymujących jedynie SOC wystąpiły te same objawy niepożądane, jednak obejmowały one znacznie mniejszy odsetek pacjentów. Wszystkie objawy, za wyjątkiem suchości w jamie ustnej mogły być związane z postępem choroby, a nie otrzymywanym leczeniem [24].

4.2. Badanie Therap

Randomizowane badanie 2 fazy prowadzone z ramienia Australijskiej i Nowozelandzkiej Grupy Badań nad Rakiem Moczowo-Płciowym i Prostaty (ang. Australian and New Zealand Urogenital and Prostate Cancer Trials Group, ANZUP), oceniające skuteczność oraz profil bezpieczeństwa chemioterapii z użyciem kabazytakselu w stosunku do terapii ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 wykazało, że ¹⁷⁷Lu-wipiwozyd- tetraksetanu jest skuteczniejszy w osiągnięciu pierwszorzędnego punktu końcowego PSA (zmniejszenie PSA o $\geq 50\%$ w stosunku do wartości wyjściowej) u mężczyzn z mCRPC, u których wcześniej doszło do progresji podczas standardowego leczenia docetakselem. Pacjenci z obu grup jednocześnie kontynuowali leczenie antagonistą LHRH jako wymagane leczenie podstawowe [25,26]. U 65 z 99 pacjentów (66%) przydzielonych do grupy przyjmującej dożylnie ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 o aktywności 6-8,5 GBq po maksymalnie 6 cyklach (dawka w odstępach 6-10 tygodni) zaobserwowano obniżenie PSA o $\geq 50\%$ w stosunku do wartości zmierzonej przed rozpoczęciem leczenia. Dla porównania 37 ze 101 (66% vs 37% lub 44%) uczestników przydzielonych do grupy, z których 85 przyjmowało

kabazytaksel w dawce 20 mg/m² przez maksymalnie 10 cykli (odstęp między dawkami wynosił 21 dni) osiągnęło podobne korzyści z terapii [23,25,25-27].

Radioligand lutetu opóźniał również progresję choroby, progresję radiologiczną oraz zapewniał dłuższe PFS, definiowane jako okres od daty randomizacji do daty pierwszego dowodu świadczącego o progresji PSA lub daty ostatniej znanej wizyty kontrolnej bez progresji PSA, w stosunku do kabazytakselu [2,3]. Jednocześnie częstość ciężkich działań niepożądanych 3. i 4. stopnia była wyższa w grupie pacjentów leczonych taksanem [25,26].

4.3. Badanie LuPSMA

W czasie trwania badania LuPSMA wśród przydzielonych do grupy przyjmującej 4 cykle ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 o średniej podawanej radioaktywności w granicach 7,5 GBq, u 32 z 50 mężczyzn (64%) z postępującym PSMA-dodatnim, objawowym mCRPC zaobserwowano obniżenie wartości PSA o $\geq 50\%$ względem poziomu wyjściowego. 22 zakwalifikowanych uczestników osiągnęło spadek poziom PSA o $\geq 80\%$ [23,28]. W gronie pacjentów, u których doszło do obniżenia PSA mediana całkowitego przeżycia (ang. overall survival, OS) wyniosła 18,4 miesiąca, podczas gdy mediana OS w całej badanej kohorcie była równa 13,3 miesiąca (okres obserwacji wynosił 31,4 miesiąca). Większość pacjentów otrzymywała uprzednio docetaksel (84%), kabazytaksel (48%) oraz abirateron lub enzalutamid (92%), a ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 zdawał się wykazywać wyższe wskaźniki odpowiedzi od wspomnianych terapii systemowych [28].

5. Dyskusja

23 marca 2022 r. Amerykańska Agencja ds. Żywności i leków (ang. Food and Drug Administration, FDA) zarejestrowała preparat Pluvicto (Lu 177 wipiwozyd tetraksetanu), produkt firmy Novartis do leczenia chorych na PSMA-dodatniego mCRPC. Jednocześnie zaakceptowano radioaktywny środek diagnostyczny Locametz (gozetotyd galu Ga 68) wykorzystywany w diagnostyce PET na etapie kwalifikacji do leczenia. Zaakceptowanie pierwszego radioligandu do leczenia przerzutowego nowotworu prostaty stanowi wyjście na przekór narastającemu problemowi, jakim niewątpliwie staje się oporny na kastrację złośliwy nowotwór nabłonkowy stercza, w którym 5-letnie przeżycie nie przekracza 30% [23].

Zaletą nowej terapii jest mechanizm działania poprzez wiązanie, internalizację oraz zatrzymywanie w obrębie komórek nowotworowych gruczołu krokowego - tak obrany model molekularnego działania minimalizuje ryzyko poważnych niepożądanych działań ogólnoustrojowych [23,29]. Powstające w czasie rozpadu lutetu promieniowanie beta minus nie pozostaje jednak bez wpływu na okoliczne tkanki oraz na narządy wykazujące zwiększoną ekspresję PSMA, takie jak: gruczoły ślinowe, przewód pokarmowy, nerki czy gruczoły łzowe [23,27,29,30]. Z badań wynika jednak, że działania niepożądane wysokiego stopnia związane z nieprawidłowościami ze strony tych narządów (3. i 4.) są stosunkowo rzadkie, co skłania do stwierdzenia, że poziom akumulacji tła w zdrowych tkankach jest nieznaczny, a terapia jest bezpieczna przy niskiej toksyczności (ekspresja na poziomie 100–1000 razy niższym niż w prostaty) [29]. Niezmiennie, niektóre działania takie jak uczucie piasku pod powiekami i suchość w jamie ustnej nie są przyjemne dla pacjentów.

Najbardziej problematyczny wydaje się etap kwalifikacji do leczenia i sam jego przebieg. Skuteczność kliniczna Pluvicto jest bezwzględnie uzależniona od ekspresji enzymu PSMA w obrębie guza, co może generować konieczność wyważania dawki, w celu uniknięcia niepotrzebnego promieniowania. Z kolei sam efekt promieniotwórczy wymusza na pacjencie przestrzeganie pewnych zasad oraz chwilową izolację z racji ustępującej emisji promieniowania. Może to powodować negatywne nastroje w gronie chorych. Dodatkowo długotrwałe skumulowane narażenie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia kolejnego nowotworu [31].

Wątpliwości budzić może również konieczność przejścia przez potencjalnie nieskuteczne terapie zanim zostanie się dopuszczonym do schematu z użyciem radioligandu. Czynnikiem wykluczającym z tej nowatorskiej formy terapii jest również obniżony klirens kreatyniny, który w grupie największego ryzyka raka prostaty (> 70 roku życia) w związku z wielochorobowością narastającą wraz z wiekiem, pozostawia bez opcji terapeutycznych pewną grupę pacjentów.

Zarejestrowanie przez FDA stanowi także punkt wyjściowy do badań i w dalszym postępowaniu rejestracji, nad innymi potencjalnymi preparatami radiologicznymi preferencyjnie oddziałującymi z komórkami guza za pośrednictwem PSMA. Prowadzone są badania kliniczne nad wykorzystaniem w tym celu aktywno emitującego promieniowanie alfa [32,33]. Jedne z nich podają go jako następny krok, w przypadku niepowodzenia, konieczności przerwania i progresji po leczeniu $^{177}\text{Lu-PSMA-617}$ [30,33].

Referencje

- [1] Wardecki D, Dołowy M. Prostate cancer - current treatment options. *Farm Polska*. 2022;78(5):268-276. doi:10.32383/farmpol/152041.
- [2] Wang G, Zhao D, Spring DJ, De Pinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Amp Dev*. 2018;32(17-18):1105-1140. doi:10.1101/gad.315739.118.
- [3] Swami U, Mc Farland TR, Nussenzveig R, Agarwal N. Advanced Prostate Cancer: Treatment Advances and Future Directions. *Trends Cancer*. 2020;6(8):702-715. doi:10.1016/j.trecan.2020.04.010.
- [4] Wasim S, Lee SY, Kim J. Complexities of ProstateCancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22):14257. Published 2022 Nov 17. doi:10.3390/ijms232214257.
- [5] Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, Gumunku L, Adegoke A, Masheshe S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*. 2022;27(17):5730. Published 2022 Sep 5. doi:10.3390/molecules27175730.
- [6] Grozescu T, Popa F. Prostate cancer between prognosis and adequate/propertherapy. *J Med Life*. 2017;10(1):5-12.
- [7] Ritch C, Cookson M. Recent trends in the management of advanced prostate cancer. *F1000Res*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-1513. Published 2018 Sep 21. doi:10.12688/f1000research.15382.1.
- [8] Merriel SW, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther*. 2018;35(9):1285-1294. doi:10.1007/s12325-018-0766-1.
- [9] Merriel SW, Pocock L, Gilbert E i in. Systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of prostate-specific antigen (PSA) for the detection of prostate cancer in symptomatic patients. *BMC Med*. 2022;20(1). doi:10.1186/s12916-021-02230-y.
- [10] Włodek M. Rak prostaty - jaką metodą powinniśmy leczyć naszych pacjentów. *Lett Oncol Sci*. 2020;17(3):15-22. doi:10.21641/los.2020.17.3.145.

- [11] Bąk S, Budzeń K, Wesołowski P, Stachura T, Gładysz K. Review of diagnostic methods for prostate cancer with consideration of MRI-TRUS fusion biopsy. *J Educ Health Sport*. 2022;12(9):720-728. doi:10.12775/jehs.2022.12.09.085.
- [12] Targoński A, Prajsner A., Biomarkery raka stercza. *Nowotw J Oncol*. 2014;64(3):258-263. doi:10.5603/njo.2014.0041.
- [13] Skrzypczyk M, Sujecki D, Szostek P, Nyk Ł, Szempliński S, Dobruch J. What is the frequency of incidental prostate cancer diagnosis in the removed prostate adenoma? *Postępy Nauk Med*. 2016; XXIX(11):823-830.
- [14] Ostrowska, M., Handzlik, I., Radomska, M. i Ostrowski, A. 2022. Przegląd dostępnych na rynku biomarkerów w diagnostyce raka prostaty. *Dziennik Edukacji, Zdrowia i Sportu* 12, 11 (listopad 2022), 192–197. doi.org/10.12775/JEHS.2022.12.11.025.
- [15] Descotes JL. Diagnosis of prostate cancer. *Asian J Urol*. 2019;6(2):129-136. doi:10.1016/j.ajur.2018.11.007.
- [16] Dębska-Ślizień A, Czerwiński J, Domański L, Kosieradzki M, Patrzałek D, Serkies K. Zasady zapobiegania przeniesieniu nowotworu złośliwego od dawcy do biorcy przeszczepu. Oznaczanie markerów nowotworowych przy kwalifikacji dawców narządów. *Stanowisko Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego. Forum Nefrol*. 2017;10(3):197-224.
- [17] Whiting D, Bott SRJ. Aktualna diagnostyka raka prostaty. W: Bott SRJ, Ng KL, wyd. *Rak Prostaty* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2021, Rozdział 4. doi: 10.36255/exonpublications.prostatecancer.diagnostics.2021.
- [18] Desai K, McManus JM, Sharifi N. Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *Endocr Rev*. 2021;42(3):354-373. doi:10.1210/edrv/bnab002.
- [19] Williams IS, McVey A, Perera S i in. Modern paradigms for prostate cancer detection and management. *Med J Aust*. 2022. doi:10.5694/mja2.51722.
- [20] Litwin MS, Tan H. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017;317(24):2532–2542. doi:10.1001/jama.2017.7248.

- [21] Teo MY, Rathkopf DE, Kantoff P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med.* 2019;70: 479-499. doi:10.1146/annurev-med-051517-011947.
- [22] Komura K, Sweeney CJ, Inamoto T, Ibuki N, Azuma H, Kantoff PW. Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *Int J Urol.* 2018;25(3):220-231. doi:10.1111/iju.13512.
- [23] Keam, SJ Lutet Lu 177 Vipivotide Tetraxetan: Pierwsza aprobata. *Mol Diagn Ther* 26, 467–475 (2022). <https://doi.org/10.1007/s40291-022-00594-2/>.
- [24] Sartor O, de Bono J, Chi KN i in. Lutetium-177–PSMA-617 for Metastatic Castration - Resistant Prostate Cancer. *New Engl J Med.* 2021;385(12):1091-1103. doi:10.1056/nejmoa2107322.
- [25] Ng TSC, Gao X, Salari K, Zlatev DV, Heidari P, Kamran SC. Incorporating PSMA- Targeting Theranostics Into Personalized Prostate Cancer Treatment: a Multidisciplinary Perspective. *Front Oncol.* 2021;11:722277. Published 2021 Jul 28. doi:10.3389/fonc.2021.722277.
- [26] Hofman MS, Emmett L, Violet J, et al. TheraP: a randomized phase 2 trial of 177 Lu-PSMA-617 theranostic treatment vs cabazitaxelin progressive metastatic castration - resistant prostate cancer (Clinical Trial Protocol ANZUP 1603). *BJU Int.* 2019;124 Suppl 1:5-13. doi:10.1111/bju.14876.
- [27] Hofman MS, Emmett L, Sandhu S i in. [177Lu]Lu-PSMA-617 versus cabazitaxelin patient with metastatic castration - resistant prostate cancer (TheraP): a randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet.* 2021;397(10276):797-804. doi:10.1016/s0140-6736(21)00237-3.
- [28] Hofman M, Violet JA, Hicks RJ i in. Results of a 50 patient single-center phase II prospective trial of Lutetium-177 PSMA-617 theranostics in metastatic castrate - resistant prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2019;37(7_suppl):228. doi:10.1200/jco.2019.37.7_suppl.228.
- [29] Hennrich U, Eder M. [177Lu]Lu-PSMA-617 (pluvictotm): the first fda - approved radiotherapeutic for treatment of prostate cancer. *Pharmaceuticals.* 2022;15(10):1292. doi:10.3390/ph15101292.

- [30] Parent EE, Kase AM. A treatment paradigm shift: targeted radionuclide therapies for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancers*. 2022;14(17):4276. doi:10.3390/cancers14174276.
- [31] Jadvar H. The VISION Forward: Recognition and Implication of PSMA-/FDG+ mCRPC. *J Nucl Med*. 2021;jnumed.121.263274. doi:10.2967/jnumed.121.263274.
- [32] Feuerrecker B, Tauber R, Knorr K, et al. Activity and Adverse Events of Actinium-225-PSMA-617 in Advanced Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer After Failure of Lutetium-177-PSMA. *Eur Urol*. 2021;79(3):343-350. doi:10.1016/j.eururo.2020.11.013.
- [33] Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, et al. ²²⁵Ac-PSMA-617 for PSMA - Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med*. 2016;57(12):1941-1944. doi:10.2967/jnumed.116.178673.

Wiroterapia onkolityczna wirusem odry – nowoczesna metoda leczenia nowotworów

Dominika Kaczyńska, Adam Mitrega, Aleksandra Wocław,
Piotr Dudek, Michał Bielówka, Błażej Pilarski

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Nowotwory stanowią jedną z głównych przyczyn śmierci na całym świecie, a potrzeba opracowania skutecznych i mniej toksycznych terapii przeciwnowotworowych jest nieustannie obecna. W ostatnich latach zainteresowanie immunoterapią, zwłaszcza wykorzystaniem wirusów onkolitycznych, wzrosło ze względu na ich zdolność do selektywnego infekowania i niszczenia komórek nowotworowych, przy minimalnym efekcie cytopatycznym na zdrowe tkanki. W tym kontekście wirus odry (ang. *measles virus* - MV) stał się obiektem intensywnych badań jako potencjalne narzędzie w immunoterapii nowotworów. W badaniach przedklinicznych i klinicznych wykorzystuje się różne strategie terapeutyczne, takie jak bezpośrednie wstrzykiwanie MV do guza lub dootrzewnowo w celu osiągnięcia selektywnej infekcji i destrukcji komórek nowotworowych. Istnieją również badania nad inżynierią genetyczną wirusa odry w celu zwiększenia jego onkolitycznej aktywności. Wyniki badań klinicznych wykazują obiecujące odpowiedzi terapeutyczne, w tym częściową lub całkowitą remisję nowotworów. Wirus odry wykazuje zdolność do aktywacji układu odpornościowego, indukowania odpowiedzi immunologicznej oraz zwiększania skuteczności terapii przeciwnowotworowych. W niniejszym artykule przedstawiamy przegląd postępów w badaniach zastosowania wirusa odry w immunoterapii nowotworów oraz omawiamy jego mechanizmy działania i wyniki badań klinicznych. W tym celu przeanalizowano związaną z tematem literaturę dostępną w medycznych bazach danych, w tym: PubMed, Scopus, Google Scholar.

Słowa kluczowe: MV, viroterapia onkolityczna

Abstract: Cancer is one of the leading causes of death worldwide, and the need to develop effective and less toxic anti-cancer therapies is ever-present. In recent years, interest in immunotherapy, especially the use of oncolytic viruses, has increased due to their ability to selectively infect and destroy cancer cells, with minimal cytopathic effects on healthy tissues. In this context, measles virus (MV) has become the focus of intense research as a potential tool in cancer immunotherapy. Preclinical and clinical studies are using various therapeutic strategies, such as direct injection of MV into the tumor or intraperitoneally to achieve selective infection and destruction of tumor cells. There is also research into genetic engineering of the measles virus to enhance its oncolytic activity. Results of clinical trials show promising therapeutic responses,

including partial or complete remission of tumors. The measles virus has shown the ability to activate the immune system, induce an immune response and enhance the efficacy of anti-cancer therapies. In this article, we provide an overview of the progress in the study of the use of measles virus in cancer immunotherapy and discuss its mechanisms of action and results of clinical trials. For this purpose, we analyzed the related literature available in medical databases, including: PubMed, Scopus, Google Scholar.

Keywords: MV, oncotic virotherapy

1. Wprowadzenie

Nowotwory stają się jedną z głównych przyczyn śmierci na całym świecie. Zgodnie z raportem Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer - IARC*) z roku 2018, rocznie diagnozuje się osiemnaście milionów nowych przypadków chorób nowotworowych, które są powodem niemalże dziesięciu milionów zgonów ^[1, 2].

Zasady nowotworzenia są podobne w różnych nowotworach. Podczas podziałów komórkowych lub przez czynniki egzogenne – fizyczne np. promieniowanie UV, jonizujące, chemiczne np. węglowodory aromatyczne, aflatoksyna B1, azbest, biologiczne: wirusy (np. brodawczaka ludzkiego, zapalenia wątroby typu B i C) ^[3] często dochodzi do mutacji, które w większości są korygowane przez wyspecjalizowane białka wewnątrzkomórkowe. W sytuacji, kiedy mechanizmy te nie są skuteczne, komórki zmutowane są usuwane w wyniku apoptozy. Większość mutacji to mutacje pasażerskie - nie wpływające na funkcjonowanie komórek. W odróżnieniu od tego mutacje mechanizmów sterujących umożliwiają nabycie zdolności komórek nowotworowych, takich jak m. in. zdolność do tworzenia przerzutów bądź odporność na apoptozę ^[4].

Wszystkie komórki nowotworowe zawierają wiele mutacji, dlatego tworzą struktury obce, które mogą być potencjalnie wykrywane i niszczone przez układ odpornościowy człowieka. Zaburzenie tego mechanizmu przez dysfunkcję układu immunologicznego, jest ściśle związane z progresją i nawrotami guza. Bezpośrednio komórki nowotworowe lub mikrośrodowisko guza promują działania immunosupresyjne, dzięki czemu nowotwór zyskuje korzystne warunki do wzrostu. To zagadnienie wzbudziło rozwój immunoterapii, której najważniejszym celem jest aktywacja i modyfikacja komórek układu odpornościowego do atakowania komórek nowotworowych ^[5,6].

W immunoterapii nowotworów często stosowanym leczeniem jest chemioterapia, radioterapia, jak również terapie hormonalne, których główną wadą są poważne skutki uboczne ^[7]. Większość złośliwych nowotworów, szczególnie w zaawansowanym stadium, pomimo ogromnego postępu osiągniętego ostatnimi czasy, nadal pozostaje nieuleczalna. Problem ten sprawdza potrzebę opracowania nowych terapii – bardziej ukierunkowanych oraz mniej toksycznych ^[8].

Rewolucyjnym narzędziem w leczeniu nowotworów może okazać się wiroterapia onkolityczna, która w ciągu ostatnich dwóch dekad przynosi obiecujące wyniki ^[9]. Jest to nowe podejście do leczenia, wykorzystujące zdolność wybranych wirusów do selektywnego infekowania i destrukcji komórek nowotworowych ^[10]. Wirusy onkolityczne przez replikację mogą skutecznie namnażać się w komórkach guza wzmacniając działanie przeciwnowotworowe.

Tysiące lat ewolucji adaptacyjnej dostarczyły wirusom wielostronne, skuteczne strategie infekowania komórek ludzkich oraz eksploatacji komórkowego aparatu biosyntetycznego. Te działania prowadzą do lizy zainfekowanych komórek, uwolnienia wirusowego potomstwa i rozprzestrzeniania infekcji na sąsiednie tkanki ^[11].

Większa część wirusów onkolitycznych używanych w terapiach przeciwnowotworowych to szczepy, które mogą infekować oraz replikować się u ludzi nie wywołując choroby lub szczepy atenuowane. Istotną funkcją tych wybranych wirusów jest zdolność wykorzystywania układu odpornościowego człowieka - gospodarza do identyfikowania i destrukcji komórek nowotworowych ^[12].

Terapie onkowirusowe cechują się swoistością wobec komórek nowotworowych, co daje im przewagę nad innymi immunoterapiami celującymi we wszystkie dzielące się komórki. Co więcej wirusy onkolityczne są mniej korelatywne od konkretnych wzorców ekspresji receptora i wynikającej z tego oporności transkrypcyjnej bądź mutacyjnej, która może wystąpić. Onkowirusy pozwalają na wzmacnianie lub przywracanie nieskutecznej odporności przeciwnowotworowej czy też indukowanie nowej odpowiedzi antygenowej ^[13].

Dotychczas translację kliniczną przeszły niektóre rodziny wirusów onkolitycznych, w tym adenowirusy, wirus odry, wirus opryszczki pospolitej, wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej oraz wirus Newcastle ^[14].

Celem tego przeglądu jest podsumowanie postępów w badaniach klinicznych i przedklinicznych zastosowania wirusa odry w immunoterapii nowotworów, a także omówienie obecnych strategii rozwoju tej dziedziny.

2. Charakterystyka onkolitycznych szczepów wirusa odry

Wirus odry (ang. *measles virus* - MV), należący do rodziny *Paramyxoviridae*, jest otoczkowym, jednoniciowym wirusem RNA o ujemnej nici. Powoduje powszechną, wysoce zakaźną infekcję dróg oddechowych, czasem prowadzącą do śmiertelnych powikłań w postaci uszkodzeń płuc i mózgu. Szczepy szczepionki MV są natomiast niezakaźne i niepatogenne oraz skutecznie stosowane jako szczepionki dożywotnio uodparniające na odrę [15].

Genom MV składa się z sześciu genów kodujących osiem odrębnych białek. RNA jest chronione przez kompleks rybonukleoproteinowy, składający się z nukleoproteiny (N), dużego białka (L) i jego kofaktora – fosfoproteiny (P). Kompleks ten otoczony jest macierzą (M). Białko fuzyjne (F) i białko hemaglutyniny (H) wystają z dwuwarstwy lipidowej i są odpowiedzialne za wnikanie wirusa do komórki gospodarza [16].

Zakażenie wirusem odry odbywa się za pomocą fuzji błonowej niezależnej od pH. Białko H łączy się z receptorami na powierzchni komórki, indukując zmianę konformacyjną, która aktywuje białko F, co prowadzi do fuzji błon [17]. Następnie zakażone komórki eksprymują na swojej powierzchni wirusowe proteiny H i F, umożliwiając oddziaływanie z receptorami MV sąsiednich komórek. Prowadzi to do fuzji komórka-komórka [18]. Proces ten daje początek gigantycznym agregatom komórkowym, określanym jako „syncytia”, które ostatecznie przechodzą w śmierć apoptyczną. Tworzenie się syncytiów ma związek z poprawą cytotoksyczności za pośrednictwem wirusów [19]. Dla przykładu w linii komórkowej glejaka wielopostaciowego U87, transfekcja fuzogennych glikoprotein H i F wirusa odry, indukuje tworzenie syncytiów, które następnie mogą niszczyć do 80 sąsiednich nietransfekcyjnych komórek [20].

2.1. Receptory wirusa odry oraz mechanizmy specyficzności

Receptory wirusa odry wiążą się z białkiem H, które odpowiada za rozpoznanie i wiązanie wirusa z komórkami gospodarza [18]. Białko H jest transbłonową glikoproteiną o masie cząsteczkowej 79 kDa, składającą się z dwóch podjednostek – H i L. Podjednostka H bierze udział w identyfikowaniu i wiązaniu do powierzchni komórki receptorów, natomiast podjednostka L jest odpowiedzialna za wejście wirusa do komórki [17].

Wirus odry może wiązać się z kilkoma różnymi receptorami, co umożliwia rozprzestrzenianie szerokiego zakresu infekcji i kolonizację wielu typów

komórek gospodarza ^[21]. Znane są trzy główne receptory wirusa odry – CD150, CD46 oraz nektyna-4. Są one wykorzystywane przez MV do wejścia do komórki docelowej ^[22].

CD150 to białko transbłonowe o masie 75-110 kDa, które jest związane z błoną komórkową limfocytów NK, B i T. Białko to między innymi bierze udział w regulacji proliferacji oraz różnicowania komórek, a także udział w interakcjach komórkowych. CD150 nosi nazwę receptora dzikiego. Innym receptorem tego typu jest SLAMF1 (CD150a), który jest białkiem homologicznym do CD150 i również ulega ekspresji na powierzchni limfocytów, niektórych komórek dendrytycznych, makrofagów i komórek nabłonkowych ^[23].

W przeciwieństwie do tego laboratoryjne, atenuowane szczepy szczepionkowe linii MV-Edmonston (MV-Edm), które są selektywnie onkolityczne, głównie bazują na CD46 - białku będącym kofaktorem błony zaangażowanym w regulację dopełniacza, obecnym we wszystkich komórkach jądrzastych ^[24]. Komórki nowotworowe wykazują wysoki poziom ekspresji tego białka, które prawdopodobnie chroni je przed lizą spowodowaną układem dopełniacza ^[25]. Szczepy MV-Edm są zdolne do wykorzystywania CD46 jako alternatywę do SLAM w celu wchodzenia do komórki docelowej, dzięki seryjnemu pasażowaniu *in vitro*, tym samym ułatwiając im infekcję komórek nowotworowych z nadekspresją CD46, inicjując przy tym niewielki efekt cytotatyczny w zdrowych komórkach organizmu, o mniejszej ekspresji tego receptora ^[26].

Niedawno zidentyfikowany receptor nabłonkowy - nektyna-4 (ang. *poliiovirus-receptor-like-4* - PVRL4), to białko adhezyjne, występuje zarówno w szczepach typu dzikiego, jak i w szczepionkach ^[27]. Białko to jest ważne w patogenezie wirusa odry, gdyż powoduje „uwalnianie” wirusa do nabłonka dróg oddechowych podczas infekcji ^[21]. Dodatkowo, wykazuje obfitą ekspresję w gruczołakoraku płuc, okrężnicy, jajnika oraz piersi, co powoduje, że jest potencjalnym markerem nowotworowym ^[28]. Zwiększona aktywność przeciwnowotworowa MV-Edm w komórkach gruczołakoraków z podwyższonymi poziomami nektyny-4, skłania ku przekonaniu, iż jej ekspresja koreluje z onkologią za pośrednictwem tego wirusa ^[29].

Oprócz powinowactwa MV do konkretnych receptorów komórkowych, istnieją inne mechanizmy determinujące selektywność nowotworową szczepów MV-Ebm. W komórkach nowotworowych zjawiskiem powszechnym są defekty w szlaku przeciwwirusowym IFN, co czyni je bardziej podatnymi na infekcje wirusowe, w przeciwieństwie do prawidłowych komórek ^[30]. W zdrowych komórkach opornych na MV wykrycie wirusowego RNA, powoduje aktywację kaskady wrodzonych szlaków odpornościowych prowadzących do

produkcji interferonów typu 1 (IFN α/β). Doprowadza to do indukcji genów stymulowanych IFN, odpowiedzialnych za obronę przeciwwirusową i apoptozę. Aby uchronić nowotwór przed atakiem układu odpornościowego gospodarza, mechanizm ten jest często zaburzony w tych komórkach [31]. Świadczy o tym badanie wykonane przez Berchtold et al. oceniające wpływ wrodzonej obrony immunologicznej na podatność komórek mięsaka na onkolizę opartą o wirus szczepionki odry [32].

3. Bezpieczeństwo wirusów odry onkolitycznej

Stosowanie wiroterapii onkogennej może nasuwać poważne obawy dotyczące bezpieczeństwa. MV typu dzikiego jest w stanie wywołać groźną chorobę, jednakże atenuowane szczepy szczepionkowe MV-Edm, podawane milionom dzieci przez ostatnie dekady, prezentują doskonałe wyniki w zakresie bezpieczeństwa - nie mają zdolności do wywoływania jawnej choroby [33]. Ponadto rozprzestrzenianie się MV-Edm w populacji ogólnej jest bardzo nieprawdopodobne, gdyż większość osób żyjących w krajach uprzemysłowionych posiada odporność przeciwko odrze nabytą za pośrednictwem przebytej choroby, bądź szczepienia oraz jak dotąd nie odnotowano powrotu szczepów tej szczepionki do patogenności [34].

4. Działanie układu odpornościowego w onkolizie za pośrednictwem MV

Ważną cechą w wykorzystywaniu wirusa odry w walce z nowotworami jest zastosowanie układu immunologicznego do rozpoznawania, namierzania i w konsekwencji destrukcji komórek nowotworowych. Szczególnie obiecujące okazują się być transgeny, wzmacniające odpowiedź immunologiczną gospodarza, skierowaną przeciwko nowotworowi. W badaniu prowadzonym przez Grote et al. wykazano pozytywny wpływ neutrofilii na efekt przeciwnowotworowy wirusa odry. Wygenerowano MV z zakodowanym czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii mysich granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Ekspresja tego czynnika powodowała wzmocnienie funkcji neutrofilii u gospodarza. W mysim modelu ludzkiego chłoniaka, skuteczność wirusa odry, kodującego mysie GM-CSF, była skorelowana z naciekiem neutrofilii w guzie i regresją guza, co istotnie zwiększyło potencjał terapeutyczny wirusa [35]. W innym badaniu Grossardt et al. ponownie potwierdzili pozytywny wpływ GM-CSF w wiroterapii onkolitycznej wirusem odry.

Użyto komórek MC38cea, w immunokompetentnym mysim modelu gruczolakoraka okrężnicy, z zakodowanym ludzkim antygenem rakowo-płodowym (ang. *carcino-embryonic antigen* - CEA). Badanie to wykazało, że MV z zakodowanym CEA, uzbrojony w GM-CSF, zwiększał medianę całkowitego przeżycia oraz doprowadził do trwałej całkowitej remisji u jednej trzeciej myszy. Myszy te odrzuciły nowotwory przy ponownej prowokacji, wykazując pamięć immunologiczną z trwałą ochroną ^[36].

Innym sposobem wykorzystania układu odpornościowego w leczeniu nowotworów wirusem odry jest przełomowa terapia umożliwiająca aktywację limfocytów naciekających guz (ang. *tumor-infiltrating lymphocytes* - TIL). Infekcja MV komórek nowotworowych powoduje przyciąganie cytotoksycznych limfocytów T do guza oraz zwiększenie ekspresji PD-L1 (białka programowanej śmierci) w komórkach nowotworowych i odpornościowych ^[37]. W badaniu prowadzonym przez Engeland et al. połączono wyżej opisaną zależność z możliwością wykorzystania inhibitorów punktów kontrolnych (ang. *immune checkpoint inhibitors* – ICIs). Wygenerowano atenuowane wektory wirusa odry kodujące przeciwciała CTLA-4 i PD-L1 i stwierdzono, iż wirusoterapia MV została znacząco wzmocniona przez ICIs w immunokompetyjnym mysim modelu czerniaka ^[38]. Kolejną możliwością, która angażuje TIL do atakowania komórek rakowych, są Bi-specyficzne czynniki angażujące komórki T (ang. *bispecific T-cell engager* - BiTE). Są to jednołańcuchowe fragmenty zmienne o podwójnej specyficzności wobec pożądanego antygeny nowotworowego i komórek T, zbliżając je do siebie oraz tworząc sztuczną synapsę immunologiczną ^[39]. W badaniu przeprowadzonym przez Speck et al. wykazano skuteczność terapeutyczną funkcjonalnych przeciwciał BiTE zakodowanych na onkolitycznych wirusach odry w dwóch różnych modelach guzów litych bez oznak toksyczności. Skuteczność była związana ze zwiększonym naciekiem limfocytów T wewnątrz guza oraz indukcją ochronnej odporności przeciwnowotworowej ^[40].

Komórki dendrytyczne są następnym ogniwem układu odpornościowego zaangażowanym w udział w terapii przeciwnowotworowej wirusem odry. Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne prowadzą do immunogennej śmierci komórek nowotworu przez indukowanie produkcji IFN α oraz prezentację krzyżową antygenów guza komórkom T CD8+. Wykazano również, iż zainfekowanie MV komórek czerniaka, powoduje aktywację komórek dendrytycznych, stymulując adaptacyjną przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną ^[41].

5. Aktualne doniesienia w badaniach klinicznych

Pierwszym badaniem klinicznym, w którym zastosowano niezmodyfikowany szczepionki MV-Edmonston-Zagreb (MV-EZ) jako środek onkolityczny, było badanie I fazy ze zwiększaniem dawki, przeprowadzone w Szwajcarii. Celem badania była ocena wpływu MV-EZ na chłoniaka skórny z komórek T (ang. *cutaneous T-cell lymphoma* - CTCL) w stadium >IIb, który był oporny na konwencjonalne leczenie lub obserwowano nawrót po konwencjonalnej terapii. Badanie to przeprowadzono u 5 pacjentów odpornych na odrę z CTCL. Trzem pacjentom podano po cztery wstrzyknięcia w dwóch cyklach leczenia, a dwóm pacjentom po dwa wstrzyknięcia w jednym cyklu leczenia. Dodatkowo, aby chronić zdrowe tkanki przed rozprzestrzenieniem się MV-EZ, każde wstrzyknięcie wirusa było poprzedzone podskórnym podaniem interferonu-alfa na 72 i 24 godziny przed leczeniem wirusowym. Jak opisano wyżej – komórki nowotworowe są bardziej podatne na infekcje wirusowe niż prawidłowe tkanki, ponieważ występują u nich wrodzone defekty w szlakach sygnałowych IFN, stąd wynika podanie IFN α przed terapią wirusową. Dawki stosowane wahały się od 10^2 do 10^3 TCID $_{50}$ /zastrzyk. Leczenie to było dobrze tolerowane, nie zaobserwowano toksyczności ograniczającej dawkę. Terapia MV-EZ spowodowała całkowitą regresję jednego guza CTCL u jednego pacjenta po pierwszym cyklu leczenia, drugą zmianę leczono w następnym cyklu. Częściowe regresje zaobserwowano u czterech pacjentów. U dwóch pacjentów zaobserwowano również poprawę w odległych nieostrzykiwanych zmianach. CTCL jest chorobą immunosupresyjną, a pomimo tego, miana przeciwciał przeciwko odrze wzrosła u wszystkich pięciu pacjentów po leczeniu MV-EZ. Wstępne wyniki tych badań są obiecujące, w szczególności, że podawane dawki wirusa były bardzo niskie [42].

W USA przeprowadzono badanie kliniczne, które oceniało użyteczność i bezpieczeństwo MV-CEA u pacjentek z nawracającym rakiem jajnika. Dwudziestu jeden pacjentkom odpornym na odrę z rakiem jajnika opornym na platynę i paklitaksel, ograniczonym do jamy otrzewnej, wstrzyknięto dootrzewnowo MV-CEA. U wszystkich pacjentek choroba była oporna na chemioterapię z medianą 3 schematów chemioterapii przed rozpoczęciem badania klinicznego. Dootrzewnowe podawanie wirusa powtarzano co miesiąc do łącznej liczby 6 dawek na pacjenta. Leczono siedmioma poziomami dawek (3 pacjentki na jeden poziom dawki) od 10^3 do 10^9 TCID $_{50}$ /zastrzyk. Nie stwierdzono działań toksycznych ograniczających dawkę przy żadnym poziomie dawki. U wszystkich trzech pacjentek leczonych dawką maksymalną

- 10^9 TCID₅₀ wykazano podwyższone poziomy CEA w surowicy. Stabilizację choroby otrzymano u wszystkich pacjentek w zakresie dawek 10^7 - 10^9 , lecz przy niższych poziomach dawek stabilizację osiągnięto u 5 z 12 pacjentek. Wskazuje to na zależność odpowiedzi od dawki. Badane osiągnęły medianę przeżycia całkowitego (OS) 12,15 miesiąca życia, przy oczekiwanej medianie przeżycia 6 miesięcy w tej populacji pacjentów^[43], opartej na historycznych kontrolach^[44]. Dodatkowo u pacjentek otrzymujących wyższe dawki 10^8 i 10^9 mediana OS wynosiła 38,4 miesiąca. U 5 badanych stwierdzono spadek poziomu antygeny nowotworowego CA-125 o >30%, natomiast analiza immunohistochemiczna próbek guza wykazała silną ekspresję CD46 u 13 z 15 pacjentek, u których były dostępne próbki tkanek do analizy CD46. Potwierdza to możliwość użytku CD46 obecnie wykorzystywanego przeciwko odrze, do optymalizacji skuteczności leczenia nowotworów^[43].

Istnieje badanie nad terapią MV-NIS (rekombinowanej pochodnej MV-Edm z ekspresją genu symportera jodku sodu - NIS), który podawano dootrzewnowo pacjentkom z nawracającym rakiem jajnika. Celem badania była ocena bezpieczeństwa terapii MV-NIS oraz przydatności obrazowania opartego na NIS. Dodatkowo, opierając się o wstępne obserwacje kliniczne i dane przedkliniczne^[45], oceniano również zdolność wirusoterapii odry do indukowania odpowiedzi przeciwnowotworowej przez układ immunologiczny w mechanizmie aktywacji komórek T pomocniczych 1 (CD4+), które są istotnym mediatorem przeciwnowotworowym^[46]. W badaniu uczestniczyło 16 pacjentów opornych na toksol i platynę, z niepowodzeniem wcześniejszych terapii (średnio 3,4 schematy leczenia). Każdy z badanych otrzymał MV-NIS co 4 tygodnie przez maksymalnie 6 cykli. Leczenie było dobrze tolerowane, a mediana przeżycia całkowitego była niezwykle obiecująca. Pacjentów leczono dawkami - 10^8 - 10^9 TCID₅₀. Najczęstsze zdarzenia niepożądane, które towarzyszyły leczeniu to bóle brzucha i zmęczenie. U 13 z 16 pacjentów nastąpiła stabilizacja choroby (11 z 13 otrzymywało dawkę 10^9 TCID₅₀), mediana OS wynosiła 26,6 miesiąca, przy oczekiwanej medianie 6-12 miesięcy, w tej populacji pacjentów. U wszystkich badanych w analizie immunohistochemicznej wykryto wysokie poziomy ekspresji CD46 lub nektyny-4. Wyniki te po raz kolejny udowodniły skuteczność wiroterapii onkologicznej^[47].

Obecnie trwa wiele badań klinicznych z zastosowaniem MV dla pacjentów m.in. z szpiczakiem mnogim, rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, nowotworem osłonek nerwów obwodowych oraz nawracającym nowotworem teratoidnym.

6. Podsumowanie

Wirus odry (MV) wykazuje obiecujący potencjał jako narzędzie w immunoterapii nowotworów. Zastosowanie wirusów onkolitycznych, takich jak MV, stanowi nowatorskie podejście terapeutyczne, wykorzystujące zdolność wirusów do infekowania i niszczenia komórek nowotworowych. Badania przedkliniczne i kliniczne dotyczące terapii wirusem odry wskazują na jego skuteczność i bezpieczeństwo w leczeniu różnych rodzajów nowotworów.

Mechanizm działania wirusa odry polega na selektywnym namnażaniu się w komórkach nowotworowych, co prowadzi do ich destrukcji. Ponadto, wirus odry może aktywować układ odpornościowy człowieka do rozpoznania i eliminacji komórek nowotworowych. Jest to istotne, ponieważ większość nowotworów hamuje niektóre mechanizmy układu odpornościowego, co sprzyja ich wzrostowi i unikaniu działania układu immunologicznego.

W badaniach klinicznych wykorzystujących wirusa odry zaobserwowano pozytywne odpowiedzi terapeutyczne, w tym częściową lub całkowitą regresję guzów nowotworowych. Szczególnie interesujące wyniki uzyskano w przypadku chłoniaka skórniego z komórek T, gdzie terapia wirusem odry spowodowała regresję guzów u pacjentów, którzy nie reagowali na konwencjonalne metody leczenia.

Ponadto, wirus odry wykazuje korzystne cechy, takie jak zdolność do infekcji i replikacji w komórkach nowotworowych oraz możliwość wzmacniania lub przywracania nieskutecznej odporności przeciwnowotworowej. To sprawia, iż MV jest obiecującym kandydatem do dalszych badań i rozwoju terapii onkolitycznych.

Mimo postępów w terapii nowotworowej, wiele nowotworów nadal pozostaje nieuleczalnych, a istniejące metody leczenia często wiążą się z poważnymi skutkami ubocznymi. Dlatego rozwój terapii onkolitycznych, takich jak wiroterapia onkotyczna wirusem odry, stanowi istotny kierunek w poszukiwaniu nowych, bardziej ukierunkowanych i mniej toksycznych terapii przeciwnowotworowych.

Wnioski z przeprowadzonych badań wskazują, że wirus odry stanowi atrakcyjne narzędzie w immunoterapii nowotworów, jednak konieczne są dalsze badania, zarówno przedkliniczne, jak i kliniczne, aby lepiej zrozumieć jego mechanizmy działania, optymalizować dawkowanie i zidentyfikować odpowiednich pacjentów, mogących najbardziej skorzystać z tej terapii. Wprowadzenie wirusa odry do praktyki klinicznej przedstawi nowe perspektywy

leczenia nowotworów i przyczyni się do poprawy wyników terapeutycznych dla pacjentów z różnymi typami nowotworów.

Referencje

- [1] Lippman SM, Hawk ET. Cancer prevention: from 1727 to milestones of the past 100 years. *Cancer Res.* 2009 Jul 1;69(13):5269-84. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1750. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19491253.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
- [3] DiMaio D, Emu B, Goodman AL, Mothes W, Justice A. Cancer Microbiology. *J Natl Cancer Inst.* 2022 May 9;114(5):651-663. doi: 10.1093/jnci/djab212. PMID: 34850062; PMCID: PMC9086797.
- [4] Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018 Apr 17;48(4):812-830.e14. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.023. Epub 2018 Apr 5. Erratum in: *Immunity.* 2019 Aug 20;51(2):411-412. PMID: 29628290; PMCID: PMC5982584.
- [5] Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec;35 Suppl:S185-S198. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.004. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25818339.
- [6] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
- [7] Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016 Oct;107(10):1373-1379. doi: 10.1111/cas.13027. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27486853; PMCID: PMC5084676.

- [8] Liu TC, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007 Feb;4(2):101-17. doi: 10.1038/ncponc0736. PMID: 17259931.
- [9] Bell J, McFadden G. Viruses for tumor therapy. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):260-5. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.002. PMID: 24629333; PMCID: PMC3963258.
- [10] Msaouel P, Opyrchal M, Domingo Musibay E, Galanis E. Oncolytic measles virus strains as novel anticancer agents. *Expert Opin Biol Ther*. 2013 Apr;13(4):483-502. doi: 10.1517/14712598.2013.749851. Epub 2013 Jan 6. PMID: 23289598; PMCID: PMC3810368.
- [11] Msaouel P, Iankov ID, Dispenzieri A, Galanis E. Attenuated oncolytic measles virus strains as cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Jul;13(9):1732-41. doi: 10.2174/138920112800958896. PMID: 21740361; PMCID: PMC3298624.
- [12] Sasso E, D'Alise AM, Zambrano N, Scarselli E, Folgori A, Nicosia A. New viral vectors for infectious diseases and cancer. *Semin Immunol*. 2020 Aug;50:101430. doi: 10.1016/j.smim.2020.101430. Epub 2020 Nov 29. PMID: 33262065.
- [13] Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother Cancer*. 2018 Dec 4;6(1):140. doi: 10.1186/s40425-018-0458-z. PMID: 30514385; PMCID: PMC6280382.
- [14] Hemminki O, Dos Santos JM, Hemminki A. Oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2020 Jun 29;13(1):84. doi: 10.1186/s13045-020-00922-1. PMID: 32600470; PMCID: PMC7325106.
- [15] Baker JP. The first measles vaccine. *Pediatrics*. 2011 Sep;128(3):435-7. doi: 10.1542/peds.2011-1430. Epub 2011 Aug 28. PMID: 21873696.
- [16] Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*. 2006 Oct;87(Pt 10):2767-2779. doi: 10.1099/vir.0.82221-0. PMID: 16963735.

- [17] Navaratnarajah CK, Oezguen N, Rupp L, Kay L, Leonard VH, Braun W, Cattaneo R. The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Feb;18(2):128-34. doi: 10.1038/nsmb.1967. Epub 2011 Jan 9. PMID: 21217701; PMCID: PMC3059746.
- [18] Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol.* 1991 Feb;72 (Pt 2):439-42. doi: 10.1099/0022-1317-72-2-439. PMID: 1993882.
- [19] Long MA, Rossi FM. Targeted cell fusion facilitates stable heterokaryon generation in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2011;6(10):e26381. doi: 10.1371/journal.pone.0026381. Epub 2011 Oct 24. PMID: 22039476; PMCID: PMC3200330.
- [20] Galanis E, Bateman A, Johnson K, Diaz RM, James CD, Vile R, Russell SJ. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum Gene Ther.* 2001 May 1;12(7):811-21. doi: 10.1089/104303401750148766. PMID: 11339897.
- [21] Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray PB Jr, McChesney MB, Cattaneo R. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2448-58. doi: 10.1172/JCI35454. PMID: 18568079; PMCID: PMC2430500.
- [22] Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000 Aug 24;406(6798):893-7. doi: 10.1038/35022579. PMID: 10972291.
- [23] Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol.* 2001 May;75(9):4399-401. doi: 10.1128/JVI.75.9.4399-4401.2001. PMID: 11287589; PMCID: PMC114185.

- [24] Navaratnarajah CK, Leonard VH, Cattaneo R. Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;329:59-76. doi: 10.1007/978-3-540-70523-9_4. PMID: 19198562; PMCID: PMC7121846.
- [25] Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schüler H, Kraus S, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z, Kirschfink M. Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol Immunol.* 1999 Sep-Oct;36(13-14):929-39. doi: 10.1016/s0161-5890(99)00115-7. PMID: 10698347.
- [26] Vongpunsawad S, Oezgun N, Braun W, Cattaneo R. Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J Virol.* 2004 Jan;78(1):302-13. doi: 10.1128/jvi.78.1.302-313.2004. PMID: 14671112; PMCID: PMC303414.
- [27] Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Gonçalves A, Dubreuil P, Lopez M. Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem.* 2005 May 20;280(20):19543-50. doi: 10.1074/jbc.M410943200. Epub 2005 Mar 22. PMID: 15784625.
- [28] Derycke MS, Pambuccian SE, Gilks CB, Kalloger SE, Ghidouche A, Lopez M, Bliss RL, Geller MA, Argenta PA, Harrington KM, Skubitz AP. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol.* 2010 Nov;134(5):835-45. doi: 10.1309/AJCPGXK0FR4MHIHB. PMID: 20959669; PMCID: PMC3042138.
- [29] Awano M, Fujiyuki T, Shoji K, Amagai Y, Murakami Y, Furukawa Y, Sato H, Yoneda M, Kai C. Measles virus selectively blind to signaling lymphocyte activity molecule has oncolytic efficacy against nectin-4-expressing pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* 2016 Nov;107(11):1647-1652. doi: 10.1111/cas.13064. PMID: 27561180; PMCID: PMC5132336.

- [30] Naik S, Russell SJ. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Sep;9(9):1163-76. doi: 10.1517/14712590903170653. PMID: 19637971.
- [31] Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci.* 2008 Mar;99(3):467-78. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00720.x. Epub 2008 Jan 9. PMID: 18190617.
- [32] Berchtold S, Lampe J, Weiland T, Smirnow I, Schleicher S, Handgretinger R, Kopp HG, Reiser J, Stubenrauch F, Mayer N, Malek NP, Bitzer M, Lauer UM. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol.* 2013 Mar;87(6):3484-501. doi: 10.1128/JVI.02106-12. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23302892; PMCID: PMC3592150.
- [33] Griffin DE, Pan CH. Measles: old vaccines, new vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;330:191-212. doi: 10.1007/978-3-540-70617-5_10. PMID: 19203111.
- [34] McQuillan GM, Kruszon-Moran D, Hyde TB, Forghani B, Bellini W, Dayan GH. Seroprevalence of measles antibody in the US population, 1999-2004. *J Infect Dis.* 2007 Nov 15;196(10):1459-64. doi: 10.1086/522866. Epub 2007 Nov 1. PMID: 18008224.
- [35] Grote D, Cattaneo R, Fielding AK. Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6463-8. PMID: 14559838.
- [36] Grossardt C, Engeland CE, Bossow S, Halama N, Zaoui K, Leber MF, Springfeld C, Jaeger D, von Kalle C, Ungerechts G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine. *Hum Gene Ther.* 2013 Jul;24(7):644-54. doi: 10.1089/hum.2012.205. PMID: 23642239; PMCID: PMC3719441.
- [37] Liu Z, Ravindranathan R, Kalinski P, Guo ZS, Bartlett DL. Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy. *Nat Commun.* 2017 Mar 27;8:14754. doi: 10.1038/ncomms14754. PMID: 28345650; PMCID: PMC5378974.

- [38] Engeland CE, Grossardt C, Veinalde R, Bossow S, Lutz D, Kaufmann JK, Shevchenko I, Umansky V, Nettelbeck DM, Weichert W, Jäger D, von Kalle C, Ungerechts G. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Mol Ther*. 2014 Nov;22(11):1949-59. doi: 10.1038/mt.2014.160. Epub 2014 Aug 26. PMID: 25156126; PMCID: PMC4429737.
- [39] Dietz L, Engeland CE. Immunomodulation in Oncolytic Measles Virotherapy. *Methods Mol Biol*. 2020;2058:111-126. doi: 10.1007/978-1-4939-9794-7_7. PMID: 31486034.
- [40] Speck T, Heidbuechel JPW, Veinalde R, Jaeger D, von Kalle C, Ball CR, Ungerechts G, Engeland CE. Targeted BiTE Expression by an Oncolytic Vector Augments Therapeutic Efficacy Against Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2018 May 1;24(9):2128-2137. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2651. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29437789.
- [41] Donnelly OG, Errington-Mais F, Steele L, Hadac E, Jennings V, Scott K, Peach H, Phillips RM, Bond J, Pandha H, Harrington K, Vile R, Russell S, Selby P, Melcher AA. Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Ther*. 2013 Jan;20(1):7-15. doi: 10.1038/gt.2011.205. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22170342; PMCID: PMC3378495.
- [42] Heinzerling L, Künzi V, Oberholzer PA, Kündig T, Naim H, Dummer R. Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2287-94. doi: 10.1182/blood-2004-11-4558. Epub 2005 Jun 16. PMID: 15961518.
- [43] Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, Kaur JS, Haluska PJ Jr, Aderca I, Zollman PJ, Sloan JA, Keeney G, Atherton PJ, Podratz KC, Dowdy SC, Stanhope CR, Wilson TO, Federspiel MJ, Peng KW, Russell SJ. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):875-82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2762. Epub 2010 Jan 26. PMID: 20103634; PMCID: PMC2890216.

- [44] Markman M, Webster K, Zanotti K, Peterson G, Kulp B, Belinson J. Survival following the documentation of platinum and taxane resistance in ovarian cancer: a single institution experience involving multiple phase 2 clinical trials. *Gynecol Oncol.* 2004 Jun;93(3):699-701. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.03.023. PMID: 15196867.
- [45] Gauvrit A, Brandler S, Sapede-Peroz C, Boisgerault N, Tangy F, Gregoire M. Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4882-92. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6265. PMID: 18559536.
- [46] Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res.* 2013 Sep;62(9):823-34. doi: 10.1007/s00011-013-0645-9. Epub 2013 Jul 19. PMID: 23868500.
- [47] Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, Knutson KL, Dowdy SC, Cliby WA, Haluska P Jr, Long HJ, Oberg A, Aderca I, Block MS, Bakum-Gamez J, Federspiel MJ, Russell SJ, Kalli KR, Keeney G, Peng KW, Hartmann LC. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res.* 2015 Jan 1;75(1):22-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2533. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25398436; PMCID: PMC4377302

Krioablacja - aktualne zastosowanie i jej przyszłość w leczeniu nowotworów

Aleksandra Skowronek, Jakub Kołodziej, Martyna Żurek,
Zofia Graca, Łukasz Czogalik, Joanna Jureczko

Studenckie Koło Naukowe im. Prof. Zbigniewa Religi przy Katedrze Biofizyki w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrzu, Śląski, Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Krioablacja jest szeroko stosowanym pojęciem obejmującym zamrożenie tkanek. Ludzkość korzystała z zimna w celu terapeutycznym od tysięcy lat, od prawie dwóch setek celowane jest ono w nowotwory, jednak dopiero dzisiaj możemy zacząć w pełni korzystać z jej wszystkich właściwości. Rozwój diagnostyki obrazowej pozwala na jednoczesne obserwowanie przeprowadzanego zabiegu. Nie opieramy się już jedynie na metodach ultrasonografii a coraz częściej sięgamy po obrazy rezonansu magnetycznego czy tomografii komputerowej. Co więcej zwiększa się również liczba dziedzin, w których stosujemy krioablację. Zarówno w leczeniu terapeutycznym m.in nowotworów prostaty, piersi czy nerki, ale również w leczeniu paliatywnym, np. w nowotworze trzustki. Poprzez poznanie dokładnego mechanizmu krioablacji, jej zastosowania w aktualnym leczeniu a także możliwości, jakie w przyszłości może nam ona zagwarantować, jesteśmy w stanie w pełnym jej zrozumieniu korzystać ze wszystkich jej korzyści. Co więcej krioablacja jest dziedziną z szerokim zakresem rozwoju. Dzięki postępowi w obszarze nanotechnologii i jej wykorzystaniu w krioterapii, dążymy do zwiększenia jej skuteczności i zminimalizowania efektów ubocznych.

Słowa kluczowe: krioablacja, leczenie nowotworów, guz nowotworowy, przyszłość krioablacji, nanomateriały

Abstract: Cryoablation is a widely used concept that encompasses the freezing of tissues. Humans have used cold for therapeutic purposes for thousands of years, and for almost two hundred years it has been targeted at cancers, but only today can we fully take advantage of its properties. The development of imaging diagnostics allows for simultaneous observation of the procedure being performed. We no longer rely solely on ultrasound methods, and increasingly use magnetic resonance imaging or computed tomography images. Furthermore, the number of fields in which we use cryoablation is increasing. Both in therapeutic treatment, such as prostate, breast and kidney cancers, but also in palliative treatment, such as pancreatic cancer. By understanding the exact mechanism of cryoablation, its use in current treatment and the possibilities it may offer us in the future, we are able to fully understand and benefit from all of its benefits. Cryoablation is also a field with a wide scope of development.

With advancements in nanotechnology and its application in cryotherapy, we strive to increase its efficacy and minimize side effects.

Keywords: cryoablation, cancer treatment, cancer tumor, future of cryoablation, nanomaterials

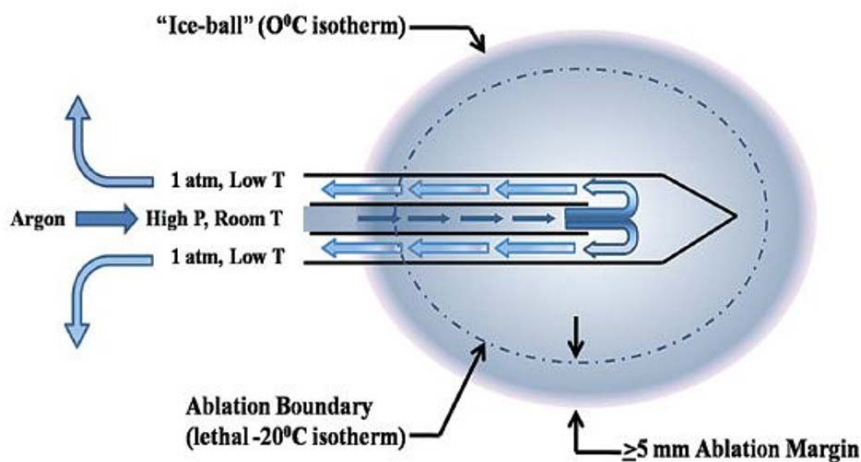
1. Wstęp

Pojęcie krioablacji obejmuje wszystkie metody niszczenia tkanki poprzez zamrożenie ^[1]. Komórki ulegają nekrozie po gwałtownym poddaniu ich na działanie bardzo niskiej temperatury ^[2]. Krioablacja jest prostym oraz przede wszystkim coraz mniej inwazyjnym zabiegiem, stale poszerzającym swoje spektrum działania w dziedzinach medycyny. Tak naprawdę terapia zimnem w onkologii sięga już XIX wieku, kiedy James Arnott w 1845 roku zaczął używać głęboko zamrożonych roztworów soli. Miały one na celu zmniejszyć średnicę guzów nowotworowych przy jak najmniejszym odczuwaniu bólu przez pacjenta. Ze względu na ograniczenia techniczne, krioablacja zawężała się jedynie do łatwo dostępnych obszarów ciała, takich jak skóra czy błony śluzowe ^[3]. Aktualnie krioablacja stosowana jest w takich nowotworach jak nowotwory kości, macicy, piersi, nerki, wątroby, prostaty czy płuca, jednak obszar jej działania stale się poszerza. Dzięki prosperującej inżynierii medycznej, mamy w zasięgu coraz to lepszy sprzęt, który umożliwi przeprowadzanie coraz mniej inwazyjnych zabiegów. Celem pracy jest zwiększenie świadomości lekarzy, a także samych pacjentów, o tym jak wygląda mechanizm całego zabiegu, jakie są jego korzyści, w których sytuacjach możemy po niego sięgnąć i przede wszystkim jakie nadzieje wiążemy z krioablacją w przyszłości.

2. Mechanizm krioablacji

Krioablacja jest procesem, w którym w szczególnie krótkim czasie poddajemy komórkę działaniu bardzo niskiej temperatury. Czas i temperatura tej procedury są wysoce istotne. Narażenie komórek na zimno powoduje osmotyczne wypłynięcie z nich wody, jednak jest to w dużym stopniu odwracalny efekt. Jeśli natomiast skrócimy czas do minimum i obniżymy odpowiednio temperaturę, woda nie zdąży osmotycznie opuścić komórki i jej pozostałości zamienią się w kryształki. Doprowadzą one do uszkodzenia błony komórkowej, naczyń krwionośnych, odżywiających komórki a co za tym idzie uszkodzenia całej jednostki ^[4]. Czas poddawania komórek zimnem

został zoptymalizowany do około kilku minut [5]. Początkowe badania wykazywały, że temperatura wyrządzająca uszkodzenie tkanki wynosi około -20°C , oczywiście przy tak ekstremalnym zimnie zachodzi obumieranie komórek, należy jednak nadmienić, że są to temperatury wyniszczające zdrową tkankę. Aby ustalić temperaturę zagrażającą komórkom guza nowotworowego sprawa się komplikuje. W zależności od charakteru guza i jego położenia w naszym organizmie, temperatura wywołująca nekrozę komórek jest bardzo różna i oscylować może w okolicach -40 do -50°C , czy jak wykazał według swoich badań Neel, nawet do -60°C . Dodatkowo cały proces wymaga często kilkukrotnego powtórzenia [6]. Obecnie w procesie krioablacji wykorzystujemy aparaty zamrażające wiele próbek jednocześnie lub w określonej sekwencji. Stosuje się do tego argon (-186°C) oraz podtlenek azotu ($-89,5^{\circ}\text{C}$), które wprowadzane do kriosondy w temperaturze pokojowej, zmieniają swoją temperaturę zgodnie z efektem Joule'a-Thomsona [7].



Rycina 1. Na rycinie przedstawiono mechanizm krioablacji. Gaz wykorzystywany w tej procedurze wprowadzany jest do kriosondy w temperaturze pokojowej pod bardzo wysokim ciśnieniem. Jak opisuje efekt Joule'a-Thomsona powoduje to znaczne obniżenie temperatury wprowadzanego gazu (w tym wypadku argon) i wytworzenie „lodowej kuli” co prowadzi do wyniszczenia tkanki [<https://oncohemakey.com/cryoablation-mechanism-of-action-and-devices/>], [7]

Obecne osiągnięcia w dziedzinie diagnostyki obrazowej pozwoliły na wykonywanie współczesnych zabiegów krioablacji pod ścisłą kontrolą jednoczesnego badania obrazowego. Oczywiście najbardziej dostępnym obrazowaniem jest obrazowanie ultrasonograficzne (USG) i to ono króluje w większości sal operacyjnych, gdzie przeprowadza się drobne krioablacje. Niestety dużo zalet

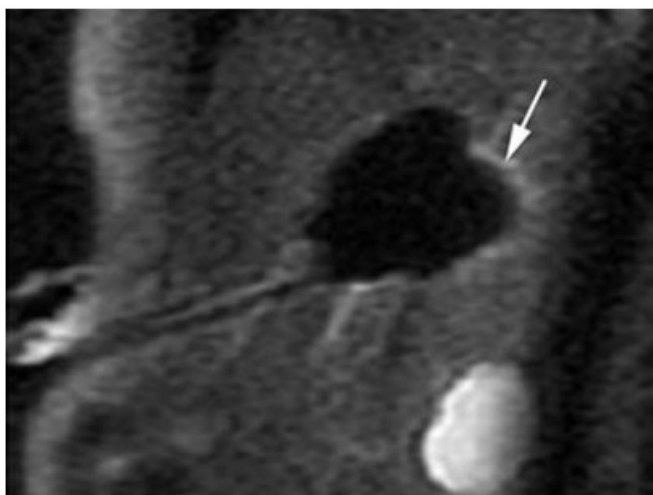
USG, takich jak dostępność, koszty kupna i utrzymania sprzętu czy niskie wymagania okołoperacyjne, niesie ze sobą równie dużo wad, takich jak brak obrazu trójwymiarowego czy brak możliwości bardzo dokładnego pomiaru temperatury tkanki, która jest przecież bardzo istotna podczas całego zabiegu [5]. Dzięki stale rozwijającej się technice obrazowej już dziś wykorzystujemy dodatkowo do obrazowania zabiegu m. in. Tomografię Komputerową (ang. *Computerized Tomography CT*), Rezonans Magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging MRI*) czy Elektryczną Tomografię Impedancyjną (ang. *Electrical Impedance Tomography EIT*). Pierwsza z nich umożliwia zobrazowanie całego przekroju poprzecznego tkanki, do której wprowadzana jest kriosonda. Obraz mieści się w granicach użyteczności mimo, że nie jest transmitowany w dokładnym czasie rzeczywistym bo pojawia się co około minutę [5]. Aktualnie jest to najczęściej, zaraz po USG, używany sposób obrazowania tego zabiegu.



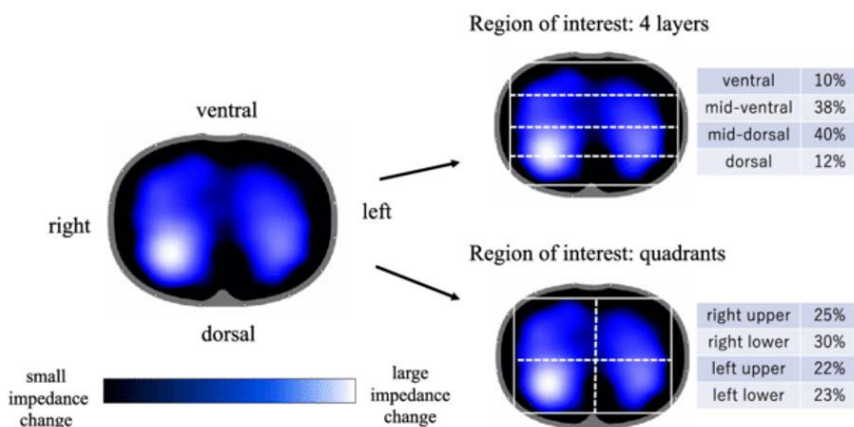
Rycina 2. Na rycinie przedstawiono zabieg krioablacji guza nowotworowego lewej nerki przeprowadzonego przy pomocy CT [<https://advances.augusta.edu/1619>]

Znacznie bardziej obiecującym dla chirurga widokiem przeprowadzanej krioablacji okazał się trójwymiarowy obraz ukazujący się przy wykorzystaniu rezonansu magnetycznego. Obrazuje on objętości tkanek, płynów i samego guza, co ułatwia przeprowadzenie zabiegu. Aby to było możliwe, wykorzystuje się specjalne kriosondy, które są kompatybilne do MRI. Mimo,

że to obrazowanie daje dobre rezultaty i sama technika ciągle się rozwija, mało prawdopodobnym jest, ażeby zastąpiła inne metody obrazowania krioablacji. Aktualnie duże koszty, jakie niesie ze sobą używanie specjalistycznie dobranych kriosond i specjalne wymagania związane z polem elektromagnetycznym, skreśla MRI z listy technik rutynowego obrazowania podczas zabiegu [5].



Rycina 3. Na rycinie przedstawiono monitorowanie tworzenia się „kuli lodowej” podczas wykonywanego zabiegu krioablacji z obrazowaniem MRI. Strzałka wskazuje obręb utworzonej „kuli” [https://ncigt.org/mri-guided-cryoablations-liver-and-kidney-tumors]



Rycina 4. Na rycinie przedstawiono przykładowy mechanizm EIT oraz obraz jaki przy tym się ukazuje (tutaj wentylacja płuc) [https://www.researchgate.net/figure/EIT-tidal-image-Left-typical-EIT-tidal-image-is-shown-Regional-distribution-of-tidal_fig1_330490096]

Kolejną alternatywą diagnostyki obrazowej w krioablacji miała okazać się EIT ze względu na obraz, który pojawia się w czasie rzeczywistym ^[5]. Technika ta wykorzystuje pomiar impedancji biologicznej wnętrza ciała. Mimo, że nie korzysta z promieniowania jonizującego a co za tym idzie obrazy są niższej rozdzielczości przestrzennej, ich wysoka dynamika sprawia, że są one bardzo przydatne przy obserwacji jednocześnie przeprowadzanego zabiegu ^[9]. Dziedzina ta jednak wymaga dalszej nowelizacji, aby była szeroko wykorzystywana w procesach krioablacji ^[5].

3. Ogólne wady i zalety krioablacji

Pacjenci onkologiczni są wyjątkową grupą. Większość z nich to ludzie starsi, wielu z nich podczas swojego leczenia przeszło już cały szereg otwartych operacji, ciężką chemio- i radioterapię. Są to kryteria, które dyskwalifikują ich do przeprowadzenia kolejnego zabiegu chirurgicznego pod znieczuleniem ogólnym. W tym miejscu rozwiązaniem staje się krioablacja. Jako zabieg trwa od pół godziny do około dwóch godzin i przeprowadzana jest jedynie pod znieczuleniem miejscowym. Pacjenci na czas zabiegu są całkowicie przytomni. Dzięki temu poddawani mogą być chorzy nawet z grupy wysokiego ryzyka, gdyż eliminowane są wszystkie działania niepożądane związane ze znieczuleniem ogólnym. Drugą istotną zaletą krioablacji jest fakt, że pacjenci nie odczuwają bólu ani podczas zabiegu ani po jego zakończeniu. Wprowadzana igła ma temperaturę pokojową, a znieczulenie miejscowe zmniejsza odczuwanie jej wprowadzania do tkanki ^[8]. Dodatkowo zamrożenie tkanki i okolicznych nerwów wywołuje efekt znieczulający ^[1]. Kolejnym argumentem przemawiającym za krioablacją jest szybka regeneracja pacjenta po takim zabiegu ^[8], a zatem krótszy pobyt pacjentów w szpitalu, mniejsze ryzyko powikłań po i okołoperacyjnych. W puli zalet znajdziemy również możliwość jednoczesnej obserwacji i kontroli całej procedury dzięki diagnostyce obrazowej. Co więcej, krioablacja jest bardzo efektywnym zabiegiem i cechuje się wysoką łatwością w jego przeprowadzeniu. Główną wadą krioablacji jest możliwość uszkodzenia zdrowej tkanki i zmniejszona śmiertelność komórek nowotworowych na obrzeżach powstałej kuli lodowej, co może przyczynić się do nawrotów samego nowotworu ^[10]. Ponadto może wystąpić tzw. „krioszok” wywołany zwrotną odpowiedzią immunologiczną po wykonanym zabiegu. Nadprodukcja cytokin może wywołać m.in. niedociśnienie, wielonarządowe zaburzenie funkcji czy rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe ^[1]. Ponadto przeprowadzenie takiej operacji wymaga specjalnego sprzętu,

którego zasoby (wprowadzony do tkanki gaz) muszą być po każdym zabiegu, regularnie uzupełniane, co wiąże się z dodatkowym kosztem.

4. Krioablacja w leczeniu nowotworów prostaty

4.1. Nowotwór gruczołu krokowego, statystyki zapadalności i dotychczasowe leczenie

Gruczoł krokowy, inaczej prostata czy stercz, jest męskim narządem gruczołowo-mięśniowym, otaczającym początkowy odcinek cewki moczowej przy dolnej części pęcherza moczowego^[11]. Nowotwory złośliwe tego narządu najczęściej rozwijają się w obwodowej części gruczołu. Zapadalność na tego typu nowotwór w Polsce zajmuje drugie miejsce pod względem częstości zachorowania, zaraz po raku płuca^[12]. Co więcej rośnie również ilość zgonów spowodowana tym nowotworem- z ok 92 tys. zgonów rocznie w 2010 roku do nawet 107 tys. w 2018 roku (ostatnie dane prezentowane publicznie)^[13]. W Stanach Zjednoczonych natomiast, od 15 lat rak ten jest najczęściej występującym nowotworem wśród mężczyzn^[12]. Dotychczasowe leczenie opiera się głównie na wycinaniu całego gruczołu krokowego (radykałna prostatektomia), radioterapii, w tym brachyterapii oraz teleradioterapii, czy niestety na jedynie aktywnym nadzorze i uważnym czuwaniu nad postępami choroby^[14].

4.2. Dotychczasowy zakres krioablacji w leczeniu nowotworów prostaty

Krioablacja w obrębie gruczołu krokowego, stając się pionierem, w Stanach Zjednoczonych została uwzględniona jako jeden z elementów schematu leczenia nowotworu już w 1999 roku^[13]. Jako alternatywa w szczególności do pełnego zabiegu chirurgicznego, od 24 lat może stanowić źródło wiedzy, na którym oparty będzie rozwój krioablacji w leczeniu innych nowotworów. Pomimo tak długiego okresu dalej brakuje m.in. badań prospektywnych z randomizacją. Aktualne dane pozwalają na śledzenie poszczególnych, indywidualnych przypadków chorych, u których zastosowano krioablacje miejscową (tylko w obrębie guza) lub kompleksową- całego gruczołu krokowego. Pomimo tak wąskiego zakresu bazy danych, na tej podstawie jesteśmy w stanie wyciągnąć już wiele wniosków. Badania pokazują, że u 1160 pacjentów leczonych ogniskowo, 75.7% z nich, przez 3 lata po zabiegu wolne było od nawrotu. Podobne wyniki oscylują również u chorych poddanych krioablacji

całego stercza i wynoszą 75.1% również po 3 latach ^[4]. Ponadto w porównaniu z konwencjonalną chirurgią wycinania prostaty, krioablacja skraca czas hospitalizacji, rekonwalescencji pooperacyjnej ^[13] oraz znacząco zmniejsza komplikacje po samym zabiegu ^[4]. Co więcej do korzyści krioablacji zaliczamy także szybki powrót do aktywności seksualnej ^[13].

5. Krioablacja w leczeniu paliatywnym nowotworu trzustki

5.1. Nowotwór trzustki, statystyki zapadalności i dotychczasowe leczenie

Anatomicznie trzustka jest gruczołem trawiennym, wydzielającym enzymy trawienne, takie jak amylaza, lipaza czy tripsyna, oraz produkującym hormony regulujące metabolizm, takie jak glukagon, insulina, somatostatyna czy polipeptyd trzustkowy ^[15]. Nowotwór tego narządu charakteryzuje się wysoką śmiertelnością, ze względu na fakt bardzo późnego jego rozpoznawania. Niecharakterystyczne objawy prowadzą najczęściej do diagnozy w momencie przerzutów, kiedy rak staje się już nieoperacyjny. Wszystko to doprowadziło do śmiertelnych statystyk, takich jak m.in. piąte miejsce w Stanach Zjednoczonych jako najczęstsza przyczyna umieralności z powodu nowotworu złośliwego ^[16]. Aktualnie leczenie tego nowotworu opiera się na chirurgicznej resekcji guza, jednak jest to możliwe tylko u 25% chorych. Pozostałe 75% pacjentów nie kwalifikuje się do operacji a ich leczenie opiera się na stosowaniu chemioterapii paliatywnej ^[17].

5.2. Dotychczasowy zakres krioablacji w leczeniu nowotworu trzustki

Krioablacja w leczeniu nowotworów nie ogranicza się jedynie do zamrażania guza nowotworowego, choć jest to jej najczęstsze zastosowanie. W przypadku tak ciężkiego przebiegu jak rak trzustki, krioablacje stosuje się również w leczeniu paliatywnym, które zazwyczaj opiera się na protezowaniu przewodu trzustkowego. Jest to operacja mająca na celu udrożnienie zwężonego najczęściej przez guza przewodu trzustkowego. W celu uśmierzania bólu od paru lat zaczęto łączyć przeprowadzanie protezowania z krioablacją. Udowodniono, że takie połączenie nie gwarantuje w żadnym stopniu zmniejszenie guza, jednak znacznie poprawia jakość i długość życia chorych, nawet o 6 miesięcy ^[10]. Biorąc pod uwagę statystyki umieralności krioablacja nie ma

na nie istotnego wpływu, może być rozważona jedynie jako element terapii paliatywnej, jednak jest to również dziedzina, w której potrzebujemy więcej badań potwierdzających tą tezę.

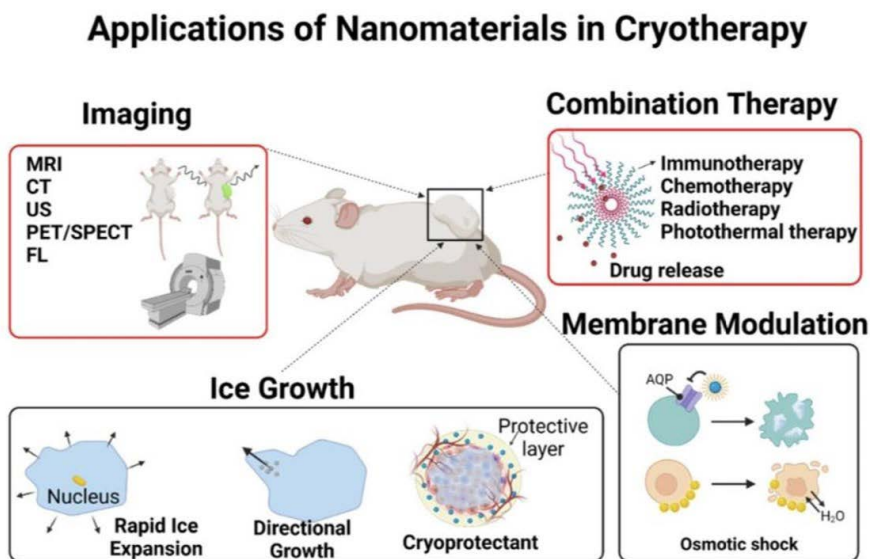
6. Krioablacja w przyszłości

W dzisiejszych czasach krioablacja swoje zastosowanie znajduje w wielu dziedzinach, od leczenia arytmii po uśmierzanie bólu. Przyszedł i czas na rozwój w dziedzinie nowotworów. Stale poszerzający się zakres działania diagnostyki obrazowej, coraz lepszy sprzęt do wykonywania krioablacji oraz wysoka precyzja wykonywanego zabiegu dają dużą nadzieję dla leczenia nowotworów szczególnie dla pacjentów, którzy nie kwalifikują się do operacji chirurgicznych ze względu na przeprowadzanie ich pod znieczuleniem ogólnym, ze względu na wiek czy choroby współistniejące. Dodatkowo, niski procent powikłań około i pooperacyjnych, niskie odczuwanie bólu podczas i długo po zabiegu czy szybka rekonwalescencja, są argumentami przemawiającymi nad wybraniem krioablacji ponad klasycznym zabiegiem chirurgicznym. Zatem może kiedyś przyjdzie czas, kiedy krioablacja zastąpi alternatywne sposoby usuwania guzów nowotworowych?

6.1. Nanomateriały jako przyszłość krioablacji

Aby zminimalizować wady krioablacji, takie jak m.in. skłonność do nawrotu, nowoczesna krioablacja dąży do maksymalnego kontrolowania obszaru zamrażania tkanki i zwiększenia śmiertelności komórek nowotworowych. W celu zwiększenia skuteczności całej terapii nowotworowej łączy się krioablacje z chemioterapią. Docelowo, chcielibyśmy aby podany lek, działający zabójczo również na zdrowe tkanki, działał jedynie miejscowo, zamykając się w obszarze krioterapii. Szacuje się, że możemy to osiągnąć dzięki wykorzystaniu przy zabiegu nanomateriałów. Mogą być one wykorzystywane jako bezpośrednio nośniki chemioterapetyków, w celu zwiększenia skuteczności celowania leku lub jako środki kontrastujące dla przeprowadzanego równocześnie obrazowania. Co więcej, niektóre nanocząstki są zdolne do generowania pod wpływem m.in. promieniowania, reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. Reactive Oxygen Species), które są dodatkowym czynnikiem działającym antynowotworowo. Mimo, że przemysł nanotechnologiczny jest stosunkowo szeroko zbadaną i opisaną dziedziną w aktualnych przeglądach naukowych, jedynie niewielki jego zakres został zauważony w obszarze krioablacji. Zatem

w jakim stopniu nanotechnika stałaby się przydatna w krioterapii guzów nowotworowych? Przede wszystkim mogą wspomagać szybsze tworzenie się kuli lodowej, doprowadzać do uszkodzenia komórek poprzez zmianę właściwości błon komórkowych, poprawiać obrazowanie, kontrolować kształt i zakres wytwarzanego lodu oraz chronić zdrowe tkanki przed ewentualnym narażeniem na śmiertelne zimno ^[9].



Rycina 5. Na rycinie przedstawiono wykorzystanie nanomateriałów w krioblacji. Wykorzystywane są w terapii skojarzonej wraz z chemioterapią, immunoterapią czy radioterapią. Powodują uszkodzenie błon komórkowych komórek nowotworowych poprzez ich modulację. Tworzą powłokę ochronną dla zdrowej tkanki. A wszystko to pod kontrolą aktualnych metod obrazowania ^[9].

Zatem wprowadzenie nanotechnologii do etapu badań klinicznych w leczeniu skojarzonym z krioblacją umożliwi potwierdzenie zwiększenia skuteczności całego zabiegu przy maksymalnym zminimalizowaniu efektów ubocznych.

7. Inne zastosowania krioblacji w medycynie

Krioblacja jest zabiegiem przeprowadzanym nie tylko do zmniejszania objętości guzów nowotworowych. Od wielu lat znajduje swoje zastosowanie również w kardiologii w celu wyeliminowania źródła zaburzeń rytmu serca. Zabieg polega na izolacji ujść żył płucnych do lewego przedsionka serca za pomocą bardzo niskiej temperatury. Dzięki temu zostają zniszczone fragmenty

tkanek, które są odpowiedzialne za nieprawidłowe powstawanie i rozchodzenie się impulsów elektrycznych w sercu^[18]. Krioterapia stosowana jest również w leczeniu bólów przy zwyrodnieniu kręgosłupa, gdy inne metody zawiodły. Zabieg z reguły przeprowadzany jest pod kontrolą RTG i polega na wprowadzeniu igły, przez którą dostaje się gaz schładzający dany obszar. Powoduje to częściowe uszkodzenie włókien nerwowych w tej okolicy, wywołujących uczucie bólu w zmienionych chorobowo strukturach. Uszkodzone włókna nerwowe regenerują się w czasie ok. 6-12 miesięcy, dlatego zabieg powtarza się wielokrotnie aby utrzymać efekt niwelujący ból^[19].

8. Podsumowanie

Pomysł terapii zimnem sięga już XIX wieku, jednak dzięki rozwojowi techniki swoje skrzydła może rozwijać dopiero dzisiaj. Dzięki jednoczesnemu obrazowaniu przeprowadzanych zabiegów, krioablacje wykorzystujemy w różnych dziedzinach medycyny, m.in. do leczenia guzów nowotworowych. Stosowana w alternatywie do konserwatywnych operacji chirurgicznych, daje nadzieję wszystkim pacjentom, którzy z różnych przyczyn nie mogą być do nich kwalifikowani. Stosujemy ją nie tylko do zmniejszania bądź likwidowania w całości guzów nowotworowych w leczeniu terapeutycznym, ale także w celu uśmierzania bólu w leczeniu paliatywnym, które jest przecież wszechobecne w leczeniu nowotworów. Do głównych zalet krioablacji zaliczamy m.in. szybszą rekonwalescencję, mniej powikłań okołoperacyjnych czy bezbolesność. Pomimo tych wielu korzyści ciągle brakuje długoterminowych badań, które pozwoliłyby na rozwój krioablacji. Naszym zadaniem powinno być uświadamianie lekarzy oraz ich pacjentów o możliwościach jakie daje krioablacja a także zachęcać do finansowania i przeprowadzania kolejnych prac naukowych, zbierających kluczowe informacje, analizujących uzyskane efekty co w przyszłości doprowadzić może do zastąpienia klasycznych zabiegów chirurgicznych właśnie krioablacją. Co więcej przyszłość tego zabiegu stanowiąc mogą nanocząsteczki, których wykorzystanie docelowo zwiększy skuteczność celowania chemioterapii w określone komórki nowotworowe przy jak najmniejszym uszkodzeniu zdrowych tkanek podczas przeprowadzania krioterapii.

Referencje

- [1] Erinjeri JP, Clark TW. Cryoablation: mechanism of action and devices. *J Vasc Interv Radiol*. 2010;21(8 Suppl):S187-S191. doi:10.1016/j.jvir.2009.12.403.
- [2] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984;247(3 Pt 1):C125-C142. doi:10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
- [3] Gage AA. History of cryosurgery. *Semin Surg Oncol*. 1998;14(2):99-109. doi:10.1002/(sici)1098-2388(199803)14:2<99::aid-ssu2>3.0.co;2-1.
- [4] Mahnken AH, König AM, Figiel JH. Current Technique and Application of Percutaneous Cryotherapy. *Aktuelle Technik und Anwendung der perkutanen Kryotherapie*. *Rofo*. 2018;190(9):836-846. doi:10.1055/a-0598-5134.
- [5] Baust JG, Gage AA. Progress toward optimization of cryosurgery. *Technol Cancer Res Treat*. 2004;3(2):95-101. doi:10.1177/153303460400300202.
- [6] Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo. *Cryobiology*. 2009;59(3):229-243. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.10.001.
- [7] Georgiades CS, Marx JK. Cryoablation: Mechanism of Action and Devices. *OncoHEMA Key*. Dostęp 14.02.2023. <https://oncohemakey.com/cryoablation-mechanism-of-action-and-devices/>.
- [8] Zwrotnik raka.
- [9] Drägerwerk AG & Co KGaA. Elektryczna tomografia impedancyjna: Na drodze do wzorcowej normy? www.draeger.com. Dostęp 14.02.2023. <https://www.draeger.com/Library/Content/image-guided-lung-protection-wp-9106742-pl.pdf>.
- [10] Kwak K, Yu B, Lewandowski RJ, Kim DH. Recent progress in cryoablation cancer therapy and nanoparticles mediated cryoablation. *Theranostics*. 2022;12(5):2175-2204. Published 2022 Feb 14. doi:10.7150/thno.67530.

- [11] krokowy gruczoł, Encyklopedia PWN: źródło wiarygodnej i rzetelnej wiedzy. Encyklopedia PWN: źródło wiarygodnej i rzetelnej wiedzy. Dostęp 14.02.2023. <https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/3927554>
- [12] Nowotwór gruczołu krokowego. Krajowy Rejestr Nowotworów. Dostęp 14.02.2023. <https://onkologia.org.pl/pl/nowotwor-gruczolu-krokowego-czym-jest#page-main-image>.
- [13] Stelmach M. Mimo postępów w leczeniu rośnie śmiertelność z powodu raka prostaty. Wydawnictwo Medyczne Termedia – Książki, Konferencje, Artykuły. 15.06.2022. Dostęp 14.02.2023. <https://www.termedia.pl/onkologia/Mimo-postepow-w-leczeniu-rosnie-smiertelnosc-z-powodu-raka-prostaty,47472.html>.
- [14] Rodríguez SA, Arias Fúnez F, Bueno Bravo C, et al. Cryotherapy for primary treatment of prostate cancer: intermediate term results of a prospective study from a single institution. *Prostate Cancer*. 2014;2014:571576. doi:10.1155/2014/571576.
- [15] trzustka, Encyklopedia PWN: źródło wiarygodnej i rzetelnej wiedzy. Encyklopedia PWN: źródło wiarygodnej i rzetelnej wiedzy. Dostęp 14.02.2023. <https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/trzustka;3989699.html>.
- [16] Rak trzustki - pierwsze objawy choroby. [Zwrotnikraka.pl](http://zwrotnikraka.pl). Dostęp 14.02.2023. <https://www.zwrotnikraka.pl/pierwsze-objawy-raka-trzustki-symptomy-nowotworu/>.
- [17] Leczenie raka trzustki - aktualne wytyczne. [Zwrotnikraka.pl](http://zwrotnikraka.pl). Dostęp 18.02.2023. <https://www.zwrotnikraka.pl/leczenie-raka-trzustki-aktualne-wytyczne/>.
- [18] Kazimierska I. Krioablacja – uderzenie zimnem w źródło arytmii. pulsmedycyny.pl. 9.05.2018. <https://pulsmedycyny.pl/krioablacja-uderzenie-zimnem-w-zrodlo-arytmii-938914>.
- [19] Kočan L, Rapčan R, Sudžina R, et al. Radiofrequency denervation and cryoablation of the lumbar zygapophysial joints in the treatment of positive lumbar facet joint syndrome - a report of three cases. *Radiol Case Rep*. 2022;17(12):4515-4520. Published 2022 Sep 26. doi:10.1016/j.radcr.2022.09.010.

Ferroptoza w terapii glejaka wielopostaciowego – wykorzystanie nanocząsteczek tlenku żelaza

Karolina Zięba¹, Justyna Zientek¹, Zuzanna Złotnicka¹,
Jakub Kołodziej¹, Marlena Grzybek¹, Joanna Jureczko²

1. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Akademia Śląska w Katowicach

Abstrakt: Glejak wielopostaciowy (ang. GM) jest na najbardziej rozpowszechnionym pierwotnym nowotworem mózgu u dorosłych. Charakteryzuje go najwyższy stopień śmiertelności. Obecnie stosowane terapie, w postaci resekcji guza, radioterapii i chemioterapii, napotyka ją wiele istotnych utrudnień wynikających ze specyfiki i umiejscowienia guza. Powszechnym zjawiskiem w przypadku GM są również bardzo częste nawroty, wynikające z naciekającego charakteru guza po resekcji. Połączenie wiedzy z zakresu metabolizmu żelaza i lipidów oraz charakterystyki komórek nowotworowych pozwoliło na wysnucie przypuszczeń dotyczących istoty procesu ferroptozy w terapii guza. Ferroptoza to nowo sklasyfikowana forma śmierci komórek związana z akumulacją żelaza i peroksydacją lipidów na skutek wywołania stresu oksydacyjnego w przebiegu reakcji Fentona, stanowiąca dobrze rokującą perspektywę w leczeniu GM. Nanocząsteczki na bazie żelaza wywołujące ferroptozę, stają się obiecującym nowym sposobem hamowania wzrostu komórek nowotworowych, pokonując jednocześnie istotne przeszkody innych metod leczenia. Celem poniższego rozdziału jest przybliżenie mechanizmu ferroptozy oraz zastosowania nanocząsteczek tlenku żelaza w przebiegu tego procesu w terapii glejaka wielopostaciowego.

Słowa kluczowe: glejak wielopostaciowy, ferroptoza, nanocząsteczki tlenku żelaza

Abstract: Glioblastoma multiforme (GM) is the most common brain tumor that can affect adults. It is characterized by a higher degree of mortality than others, ranking among the most deadly tumor types. Current therapies, in the form of tumor resection, radiotherapy and chemotherapy, struggle with many complications associated with the specificity and location of the tumor. A common occurrence in the case of GM is also very frequent relapses, due to the infiltrative nature of the tumor after resection. Combination of knowledge in the field of iron metabolism and lipid metabolism and the characteristics of cancer cells allowed us to make assumptions about the essence of the ferroptosis process in tumor therapy. Ferroptosis

is a newly classified form of cell death related to iron accumulation and lipid peroxidation caused by oxidative stress which happens during Fenton reaction, making it a promising prospect in the treatment of GM. Iron-based nanoparticles that induce ferroptosis become a promising new way of slowing or completely stopping the growth of cancer cells, additionally overcoming significant obstacles and difficulties attributed to other treatments. The goal of this section is to present the mechanism of ferroptosis and the usage of iron oxide nanoparticles during this specific therapy process for the treatment of glioblastoma multiforme.

Keywords: glioblastoma, ferroptosis, iron oxide nanoparticles

1. Glejak wielopostaciowy

1.1. Podstawowe informacje i klasyfikacja

Glejak wielopostaciowy (ang. GB) to pierwotny guz mózgu, zaliczany do heterogennej grupy guzów zwanych glejakami. Jest to grupa guzów wywodzących się z komórek glejowych lub ich prekursorów, obejmujących gwiaździaki i skąpodrzewiaki ^[1]. Glejak wielopostaciowy został sklasyfikowany przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako rozlany gwiaździak IV stopnia, o wysokiej złośliwości, wysokim współczynniku podziału komórek i proliferacji naczyń oraz centralnym obszarem martwicy guza ^[2,3]. GM może powstawać w dowolnym miejscu ośrodkowego układu nerwowego (OUN), niemniej najczęściej lokalizuje się w płatach czołowych lub skroniowych ^[4]. Cecha ta pozwala odróżnić go od powszechniejszych wtórnych guzów mózgu, powstałych w wyniku przerzutów z odległych ognisk pierwotnych ^[5].

1.2. Epidemiologia

Zapadalność na nowotwory złośliwe OUN wynosi 7,08 na 100 000 mieszkańców. Glejak wielopostaciowy stanowi 47,7% wszystkich nowotworów złośliwych OUN, a mediana całkowitego przeżycia dla pacjentów z rozpoznaniem wynosi zaledwie 8 miesięcy ^[6]. Z kolei mediana wieku rozpoznania sięga 65 roku życia, jednak nie wyklucza to występowania schorzenia u dzieci i młodych dorosłych ^[7]. Częstość występowania jest około 1,6 razy większa u mężczyzn niż u kobiet, ale przyczyna tej zależności pozostaje niepewna ^[8].

1.3. Obraz pacjenta w podstawowej opiece zdrowotnej

Znaczącym utrudnieniem diagnostycznym pacjentów z glejakiem wielopostaciowym jest niespecyficzny obraz kliniczny z zasadniczo podobnymi

objawami podmiotowymi i przedmiotowymi jak w przypadku innych pierwotnych lub wtórnych guzów mózgu czy też w częstszych łagodnych stanach neurologicznych. U około połowy pacjentów, którzy w większości zgłaszali się w przeszłości z objawami do lekarza rodzinnego, diagnoza stawiana jest po nagłym przybyciu do szpitala [9].

Do najczęstszych wczesnych objawów guza mózgu zaliczamy ból głowy, jednak występuje on jedynie u 1-2 na 1000 pacjentów sygnalizujących ten objaw lekarzowi rodzinemu [10]. Charakterystyka bólu głowy różni się w zależności od wielkości guza, jego umiejscowienia i tempa wzrostu. Może mieć charakter napięciowy lub migrenowy oraz tendencję do zaostrzania się w pozycji leżącej, stąd najczęściej występuje po przebudzeniu [11]. Napady padaczkowe występują u około 20% pacjentów z glejakiem, a u kolejnych 20% rozwijają się w późniejszym okresie choroby [12]. Ten mniej powszechny objaw ma jednak największą dodatnią wartość predykcyjną spośród wszystkich pojedynczych objawów. Wysoką wartość predykcyjną posiadają także objawy w postaci osłabienia motorycznego i dezorientacji [13]. Kombinacja tych objawów, zwłaszcza zauważalnie postępująca, znacząco zwiększa prawdopodobieństwo postawienia diagnozy [14].

Pomimo wielu postępów terapeutycznych nawroty pozostają największym wyzwaniem klinicznym w przypadku pacjentów z glejakiem wielopostaciowym [15].

2. Ferroptoza

Ferroptoza jest jedną z form programowanej śmierci komórki (ang. PDC) stanowiącej podstawę homeostazy tkankowej [16]. Swoją mechanizm działania, ukierunkowany między innymi na zapobieganiu chorobom hiperproliferacyjnym, opiera na peroksydacji lipidów wywołanej stresem oksydacyjnym [17].

2.1. Metabolizm żelaza

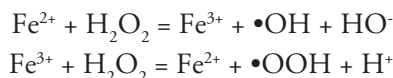
Żelazo pełni wiele kluczowych funkcji w organizmie. Bierze udział w procesach biologicznych, takich jak naprawa kwasów nukleinowych, synteza DNA, wzrost i śmierć komórek, stając się tym samym pierwiastkiem niezbędnym do przetrwania organizmu [18].

Żelazo wchłaniane jest głównie w dwunastnicy i górnej części jelita czczego w postaci kationu żelazawego (Fe^{2+}) [19]. Dalej, w komórkach nabłonkowych błony śluzowej jelita cienkiego, dochodzi do utlenienia Fe^{2+} do kationu

żelazowego (Fe^{3+}), który następnie wiązany jest przez transferynę (ang. TF) [20]. Kolejno żelazo jest uwalniane w endosomie i pod wpływem sześciotransbłonowego antygenu nabłonkowego gruczołu krokowego 3 metaloreduktazy (ang. STEAP3) jest redukowane do Fe^{2+} , umożliwiając jego eksport do cytozolu za pośrednictwem receptora transferyny 1 (ang. TFR1). Znajdujące się w cytozolu żelazo może być wykorzystywane do biosyntezy hemu hemoglobiny bądź magazynowane w ferrytynie, w zależności od potrzeb komórkowych [21]. Pomimo udziału w wielu istotnych procesach biologicznych, nadmiar żelaza może być szkodliwy dla komórek. Żelazo może sprzyjać utlenianiu biomolekuł, generując reaktywne formy tlenu (ROS). Dodatkowo, żelazo posiada zdolność do reagowania z reaktywnymi formami tlenu (np. H_2O_2), promując tworzenie rodników hydroksylowych (OH) w reakcji Fentona. Z kolei wzrost stężenia rodników hydroksylowych sprzyja utlenianiu wielonasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), co stanowi charakterystyczną cechę ferroptozy [22].

2.2. Peroksydacja lipidów

Produkty peroksydacji lipidów powstają między innymi w reakcji Fentona, w której oprócz żelaza (II lub III) uczestniczy nadtlenek wodoru (H_2O_2) [23].



Stąd też zawartość żelaza i metabolizm w tkance jest ściśle związany z obumieraniem tego pierwiastka w komórkach.

Peroksydacja lipidów przebiega w trzech fazach: inicjacji, propagacji i terminacji [24].

2.2.1. Faza inicjacji

W tej fazie reaktywne formy tlenu (ROS) w postaci rodnika hydroksylowego czy rodników hydronadtlenowych i reaktywnych form azotu reagują z atomem wodoru z alliowego węgla błony PUFA, prowadząc do powstania rodnika lipidowego [25].

2.2.2. Faza propagacji

Następnie rodnik lipidowy, podatny na reakcję w tlenem, tworzy rodnik nadtlenkowy (LOO), który z kolei może oddziaływać z innym węglem allilowym PUFA, tworząc nowy rodnik i nadtlenek lipidu (LOOH) [25].

2.2.3. Faza terminacji

Ma miejsce, gdy dwa lub więcej lipidowych rodników nadtlenkowych osiąga stężenie wystarczające do reagowania z przeciwutleniaczami, w postaci glutationu (GSH) i GP4, neutralizując ten sposób wolne rodniki, co w warunkach fizjologicznych, jest równoznaczne z zakończeniem procesu peroksydacji [25].

Jednakże, jeśli faza terminacji zostanie przerwana przez indukcję ferroptozy, nadtlenki lipidów mogą ulec rozkładowi do dialdehydu malonowego (MDA) i 4-hydrokso-2-nonenalu (4-HNE). Wspomniane cząsteczki są odpowiedzialne na sygnalizację zdarzeń inicjacji śmierci komórki przez promowanie procesu toksyczności w kluczowych białkach [26].

2.3. Ferroptoz w glejaku wielopostaciowym

Głównym składnikiem tkanki mózgowej jest lipid, stanowiący przedmiot działania ferroptozy na drodze peroksydacji wywołanej stresem oksydacyjnym [27]. Mózg, w porównaniu z innymi tkankami, jest dodatkowo bardziej podatny na stres oksydacyjny (niska aktywność enzymów antyoksydacyjnych) i posiada wyższą zawartość PUFA [28].

Dodatkowo, komórki nowotworowe mają wyższe zapotrzebowanie metaboliczne na żelazo, w porównaniu z innymi komórkami, co czyni je bardziej podatnymi na ferroptozę [29]. Potwierdzono również istnienie wielu innych cząsteczek zaangażowanych w ferroptozę w komórkach nowotworowych, z których znaczna część może stanowić cel terapeutyczny dla przyszłych badań [30].

3. Nanocząsteczki tlenku żelaza obciążone paklikatselem (IONP-PTX)

Prężnie rozwijającą się dziedziną w sferze systemu podaży leków okazuje się być nanomedycyna. Nanocząsteczki (ang. NP) to małe materiały, o wymiarach w zakresie 1-100 nm [31].

Nanocząsteczki pozostają w krwiobiegu przez dłuższy czas, co umożliwia uwalnianie leków zgodnie z zamierzoną dawką. Pozwala to na mniejsze wahania dawki w surowicy i zmniejszenie działań niepożądanych [32]. Dodatkową zaletą stosowania nanocząsteczek jest ich niewielki rozmiar i możliwość wspomagania wychwytu leku przez komórki docelowe [33]. Kolejnym atutem NP obejmują ich stabilność i biokompatybilność [34]. Możemy wyróżnić NP organiczne: dendrymery, micelle lub liposomy i nieorganiczne - na bazie metali i krzemionki [35]. Niezwykle istotnym czynnikiem umożliwiającym zastosowanie NP w leczeniu glejaka wielopostaciowego, jest ich zdolność pokonania bariery krew-mózg, która stanowi przeszkodę dla wielu innych potencjalnych terapii [36].

3.1. Paklitaksal (PTX)

Paklitaksel (PTX) to bardzo silny lek przeciwnowotworowym stosowanym między innymi do leczenia glejaka wielopostaciowego oraz przerzutów do mózgu [37]. Znaczącą przeszkodą w wykorzystaniu obiecujących właściwości terapeutycznych PTX jest jednakże jego niska biodostępność, słaba rozpuszczalność w wodzie oraz wysoka toksyczność [38]. Skutecznym kierunkiem w podwyższeniu biodostępności PTX może być nowy system dostarczania leku z wykorzystaniem nanocząsteczek tlenku żelaza.

3. Ultradrobne nanocząsteczki tlenku żelaza (USIONP)

W ostatnich latach nanocząsteczki zyskały szerokie zainteresowanie i pokonały ograniczenia tradycyjnych terapii, w postaci chociażby cytotoksyczności chemioterapii i radioterapii [39]. Bezpośrednie zastosowanie kliniczne znalazły nanocząstki tlenku żelaza (IONP), a w szczególności ultradrobne nanocząstki tlenku żelaza (ang. USIONP, ultrasmall IONP) o średnicy uwodnionej cząstki poniżej 50 nm. Nanocząsteczki, po przedostaniu się do naczyń krwionośnych, mogą być biernie kierowane do komórek nowotworowych dzięki zwiększonej przepuszczalności i efektowi retencji w tkankach nowotworowych [40]. Zjawisko to wykorzystuje fakt, iż nanocząsteczki w naczyniach krwionośnych, mimo iż są ciałami obcymi, nie są łatwo pochłaniane przez makrofagi jednojądrzaste [41].

3.3. Badanie hamującego wpływu IONP-PTX na wzrost komórek linii U251 ludzkiego glejaka wielopostaciowego

W przeprowadzonych badaniach 1,5107 stałej linii komórkowej U251 pochodzącej z ludzkiego glejaka wielopostaciowego wystryknięto podskórnie w prawą przednią kończynę myszy w celu ustanowienia ksenoprzeszczepów GMB. Myszy zostały losowo podzielone na 4 grupy z jednoczesnym zaprojektowaniem równoważnej liczby grup kontrolnych.

Przez 28 dni, odpowiednio co 2 dni, grupom mysz podawano dootrzewnowo PTX, IONP-PTX, kombinację IONP-PTX z 3-metyladeniną (3-MA) i kombinacją IONP-PTX z rapamycyną ^[43].

3.4. Wyniki

Zarówno PTX jak i IONP-PTX hamowały żywotność komórek U251. PTX zmniejszył żywotność komórek HMC3 istotniej niż IONP-PTX, wykazując, że działanie hamujące IONP-PTX na komórki HMC3 było mniejsze niż działanie PTX.

Żywotność, migracja i inwazja komórek linii U251 były istotnie hamowane w grupie inkubowanej z IONP-PTX w porównaniu z grupą PTX. Ponadto względna ekspresja białka Beclin1 związanego z autofagią LC3II do LC3I wzrosła znacznie w przypadku IONP-PTX w porównaniu z PTX.

Dodatkowo, wewnątrzkomórkowy poziom jonów żelaza, ROS i peroksydacji lipidów był istotnie wyższy w grupie IONP-PTX niż w grupie PTX. Co ciekawe, inhibitor autofagii 3-MA osłabiał działanie IONP-PTX, podczas gdy wzmacniacz autofagii - rapamycyna promował działanie IONP-PTX. Podobne wyniki wykryto w badaniu względnego poziomu białka GPX4 związanego z ferroptozą.

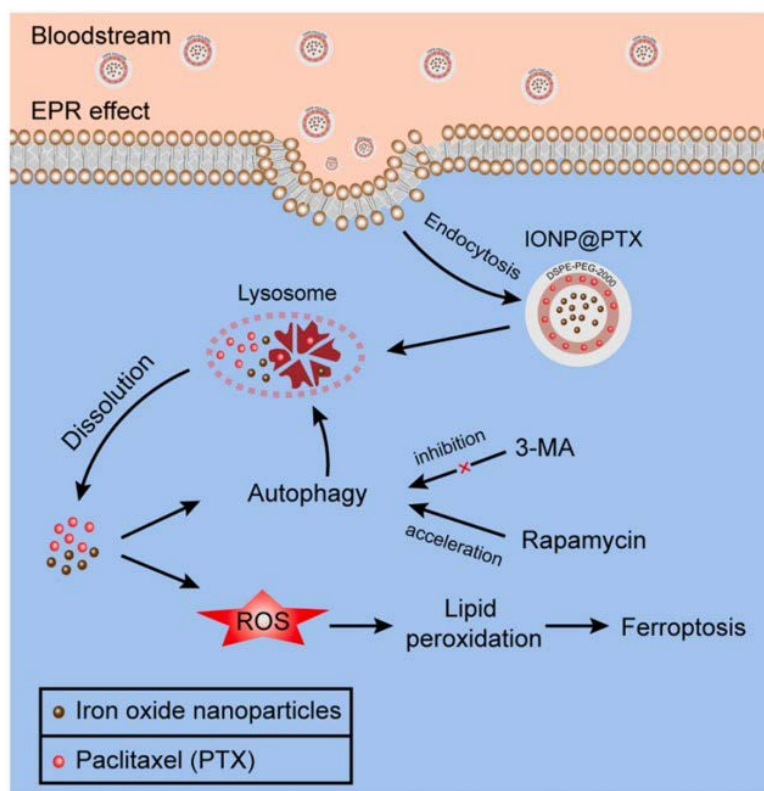
W ciągu 28 dni przeprowadzania badania IONP-PTX zmniejszył objętość guza ksenoprzeszczepów GMB, w porównaniu z grupą kontrolną. Również w tej sferze zaobserwowano osłabiony efekt w przypadku 3-MA i wzmocniony w przypadku rapamycyny, co wskazuje na skuteczność terapeutyczną IONP-PTX poprzez wzmocnienie autofagii.

Ponadto podawanie IONP-PTX obniżyło poziom ekspresji białka GPX4 w tkankach nowotworowych w porównaniu z grupą kontrolną, z równoczesną obserwacją inhibicji 3-MA i wzmocnionym efektem rapamycyny, co wskazuje na fakt iż ferroptoza może być bezpośrednio zaangażowana w hamowanie wzrostu guza.

Co istotne, dootrzewnowe wstrzyknięcie IONP-PTX, kombinacji IONP-PTX z 3-MA i kombinacji IONP-PTX z rapamycyną, nie wpłynęło na masę ciała, fizjologię wątroby i śledziony.

3.5. Wzmacnianie szlaku ferroptozy zależnego od autofagii

Udowodniono, że hamowanie wzrostu glejaków poprzez szlak autofagii (mechanizm usuwania zbędnych lub dysfunkcyjnych składników komórkowych zależny od lizosomu) możliwe jest dzięki lokalnemu dostarczeniu PTX o przedłużonym czasie uwalniania, uzyskanym dzięki wykorzystaniu nanocząsteczek (IONP-PTX) [42]. Dodatkowo wykazano, iż śmierć komórek nowotworowych może być zainicjowana przez peroksydację lipidów za pośrednictwem żelaza, a zjawisko to określane jest jako ferroptaza [44]. Żelazo (zarówno Fe^{2+} jak i Fe^{3+}) może być uwalniane z nanocząsteczek w kwaśnych lizosomach, co prowadzi do ferroptozy komórek nowotworowych w wyniku akumulacji tego pierwiastka.



Rycina 1. Schematyczna ilustracja potencjalnego mechanizmu leżącego u podstaw ferroptozy zależnej od autofagii wywołanej przez IONP-PTX [43].

IONP-PTX może zwiększać wewnątrzkomórkowe stężenie jonów żelaza, aktywować reaktywne formy tlenu oraz peroksydację lipidów, z jednoczesnym obniżeniem poziomu ekspresji białka GPX4, co w konsekwencji wywiera hamujący wpływ na komórki nowotworowe. Zależność ta potęgowana jest ponadto zjawiskiem autofagii, która promuje uwalnianie jonów żelaza i bezpośrednio uczestniczy w peroksydacji lipidów ^[43] (ryc.1).

Dodatkowo, porównywalne działanie PTX i IONP-PTX w zakresie hamowania komórek U251, korelowało ze zmniejszonym wpływem IONP-PTX na komórki linii HMC3, co sugeruje, że IONP może bezpiecznie zmniejszać toksyczność chemioterapeutyków.

4. Dyskusja

Dotychczasowe poszukiwania alternatywnych skutecznych metod leczenia glejaka wielopostaciowego zakończyły się niepowodzeniem. Objawy GB i następstwa leczenia często prowadzą do uzależnienia funkcjonalnego i upośledzenia funkcji poznawczych, uniemożliwiając pacjentom powrót do normalnych czynności przed rozpoznaniem ^[45].

Istnieje wiele nierozwiązanych przeszkód stojących na drodze skutecznej terapii. Obejmują one zarówno utrudnienia związane z badaniami klinicznymi: zaawansowany wiek pacjentów, ograniczające objawy neurologiczne jak i przeszkody związane z samą terapią: niemożność przekroczenia bariery krew-mózg czy bariery mózg-guz przez większość leków oraz niekorzystne interakcje metaboliczne z innymi lekami kontrolującymi objawy ^[46].

Wykorzystanie nanocząstek indukujących szlak ferroptozy w komórkach nowotworowych pozwala niewątpliwie na ominięcie wielu istotnych przeszkód w terapii glejaka, na co wskazują obiecujące efekty w eksperymentach przedklinicznych. Oczekuje się, że w przyszłości nanomateriały przewyższą obecną terapię przeciwnowotworową w postaci operacyjnego usuwania guzów, chemioterapii i radioterapii ^[47].

Nadal konieczne jest podejmowanie nieprzerwanych wysiłków w celu wyjaśnienia mechanizmu związku między zjawiskiem ferroptozy a glejakiem wielopostaciowym.

Referencje

- [1] Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *The Lancet*. 2018;392(10145):432-446. doi:10.1016/s0140-6736(18)30990-5.
- [2] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
- [3] Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015;129(6):829-848. doi:10.1007/s00401-015-1432-1.
- [4] (Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, et al. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-Oncology*. 2007;9(3):319-325. doi:10.1215/15228517-2007-016.
- [5] Gállego Pérez-Larraya J, Hildebrand J. Brain metastases. *Handbook of Clinical Neurology*. Published online 2014:1143-1157. doi:10.1016/b978-0-7020-4088-7.00077-8.
- [6] Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-Oncology*. 2020;22(Supplement_1):iv1-iv96. doi:10.1093/neuonc/noaa200.
- [7] Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86. doi:10.1093/neuonc/noy131.
- [8] Brodbelt A, Greenberg D, Winters T, Williams M, Vernon S, Collins VP. Glioblastoma in England: 2007–2011. *European Journal of Cancer*. 2015;51(4):533-542. doi:10.1016/j.ejca.2014.12.014.

- [9] Walter FM, Penfold C, Joannides A, et al. Missed opportunities for diagnosing brain tumours in primary care: a qualitative study of patient experiences. *Br J Gen Pract.* 2019;69(681):e224-e235. doi:10.3399/bjgp19x701861.
- [10] Ozawa M, Brennan PM, Zienius K, et al. The usefulness of symptoms alone or combined for general practitioners in considering the diagnosis of a brain tumour: a case-control study using the clinical practice research database (CPRD) (2000-2014). *BMJ Open.* 2019;9(8):e029686. doi:10.1136/bmjopen-2019-029686.
- [11] Kirby S, Purdy RA. Headaches and Brain Tumors. *Neurologic Clinics.* 2014;32(2):423-432. doi:10.1016/j.ncl.2013.11.006.
- [12] Wen PY, Weller M, Lee EQ, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology.* 2020;22(8):1073-1113. doi:10.1093/neuonc/noaa106.
- [13] Ozawa M, Brennan PM, Zienius K, et al. The usefulness of symptoms alone or combined for general practitioners in considering the diagnosis of a brain tumour: a case-control study using the clinical practice research database (CPRD) (2000-2014). *BMJ Open.* 2019;9(8):e029686. doi:10.1136/bmjopen-2019-029686.
- [14] Rasmussen BK, Hansen S, Laursen RJ, et al. Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *J Neurooncol.* 2017;135(3):571-579. doi:10.1007/s11060-017-2607-5.
- [15] Sharma A, Guerrero-Cázares H, Maciaczyk J. Editorial to Special Issue “Glioblastoma: Recapitulating the Key Breakthroughs and Future Perspective.” *IJMS.* 2023;24(3):2548. doi:10.3390/ijms24032548.
- [16] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell.* 2012;149(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [17] Cheng Z, Li Y. What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. *Chem Rev.* 2007;107(3):748-766. doi:10.1021/cr040077w.

- [18] Vogt ACS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. *IJMS*. 2021;22(9):4591. doi:10.3390/ijms22094591.
- [19] Karaskova E, Pospisilova D, Velganova-Veghova M, et al. Importance of Hepcidin in the Etiopathogenesis of Anemia in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2020;66(10):3263-3269. doi:10.1007/s10620-020-06652-1.
- [20] Zhao J, Wang Y, Tao L, Chen L. Iron Transporters and Ferroptosis in Malignant Brain Tumors. *Front Oncol*. 2022;12. doi:10.3389/fonc.2022.861834.
- [21] Vogt ACS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. *IJMS*. 2021;22(9):4591. doi:10.3390/ijms22094591
- [22] Dixon SJ, Stockwell BR. The Hallmarks of Ferroptosis. *Annu Rev Cancer Biol*. 2019;3(1):35-54. doi:10.1146/annurev-cancerbio-030518-055844.
- [23] Dunford H. Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. *Coordination Chemistry Reviews*. 2002;233-234:311-318. doi:10.1016/s0010-8545(02)00024-3.
- [24] Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;482(3):419-425. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
- [25] Yin H, Xu L, Porter NA. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem Rev*. 2011;111(10):5944-5972. doi:10.1021/cr200084z.
- [26] Higdon A, Diers AR, Oh JY, Landar A, Darley-Usmar VM. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochemical Journal*. 2012;442(3):453-464. doi:10.1042/bj20111752.
- [27] Mitre AO, Florian AI, Buruiana A, et al. Ferroptosis Involvement in Glioblastoma Treatment. *Medicina*. 2022;58(2):319. doi:10.3390/medicina58020319.

- [28] Rao GM, Rao AV, Raja A, Rao S, Rao A. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. *Clinica Chimica Acta*. 2000;296(1-2):203-212. doi:10.1016/s0009-8981(00)00219-9.
- [29] Hassannia B, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer. *Cancer Cell*. 2019;35(6):830-849. doi:10.1016/j.ccell.2019.04.002.
- [30] Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1). doi:10.1186/s13045-019-0720-y.
- [31] Jadoun S, Chauhan NPS, Zarrintaj P, et al. Synthesis of nanoparticles using microorganisms and their applications: a review. *Environ Chem Lett*. 2022;20(5):3153-3197. doi:10.1007/s10311-022-01444-7.
- [32] De Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS (2008). *Nanotechnology for drug delivery*. Germany: Springer Science & Business Media.
- [33] Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol*. 2018;16(1). doi:10.1186/s12951-018-0392-8.
- [34] Gavas S, Quazi S, Karpiński TM. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Res Lett*. 2021;16(1). doi:10.1186/s11671-021-03628-6.
- [35] Shergalis A, Bankhead A III, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. Barker EL, ed. *Pharmacol Rev*. 2018;70(3):412-445. doi:10.1124/pr.117.014944.
- [36] Chen YP, Chou CM, Chang TY, et al. Bridging Size and Charge Effects of Mesoporous Silica Nanoparticles for Crossing the Blood–Brain Barrier. *Front Chem*. 2022;10. doi:10.3389/fchem.2022.931584.
- [37] Zeng W, Yuen Kwan Law B, Kam Wai Wong V, et al. HM30181A, a potent P-glycoprotein inhibitor, potentiates the absorption and *in vivo* antitumor efficacy of paclitaxel in an orthotopic brain tumor model. *Cancer Biol Med*. 2020;17(4):986-1001. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0128.

- [38] Jibodh RA, Lagas JS, Nuijen B, Beijnen JH, Schellens JHM. Taxanes: Old drugs, new oral formulations. *European Journal of Pharmacology*. 2013;717(1-3):40-46. doi:10.1016/j.ejphar.2013.02.058.
- [39] Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem Rev*. 2016;116(5):2826-2885. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00148.
- [40] Xu Y, Wu H, Huang J, et al. Probing and Enhancing Ligand-Mediated Active Targeting of Tumors Using Sub-5 nm Ultrafine Iron Oxide Nanoparticles. *Theranostics*. 2020;10(6):2479-2494. doi:10.7150/thno.39560.
- [41] Wen J, Jiang S, Chen B. The effect of 100 Hz magnetic field combined with X-ray on hepatoma-implanted mice. *Bioelectromagnetics*. 2011;32(4):322-324. doi:10.1002/bem.20646.
- [42] Ding L, Wang Q, Shen M, et al. Thermoresponsive nanocomposite gel for local drug delivery to suppress the growth of glioma by inducing autophagy. *Autophagy*. 2017;13(7):1176-1190. doi:10.1080/15548627.2017.1320634.
- [43] Chen H, Wen J. Iron oxide nanoparticles loaded with paclitaxel inhibits glioblastoma by enhancing autophagy-dependent ferroptosis pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2022;921:174860. doi:10.1016/j.ejphar.2022.174860.
- [44] Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;104:144-164. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004.
- [45] Minaya P, Baumstarck K, Berbis J, et al. The CareGiver Oncology Quality of Life questionnaire (CarGOQoL): Development and validation of an instrument to measure the quality of life of the caregivers of patients with cancer. *European Journal of Cancer*. 2012;48(6):904-911. doi:10.1016/j.ejca.2011.09.010.
- [46] Pineda E, Domenech M, Hernández A, Comas S, Balaña C. Recurrent Glioblastoma: Ongoing Clinical Challenges and Future Prospects. *OTT*. 2023;Volume 16:71-86. doi:10.2147/ott.s366371.

- [47] Liu D, Dai X, Ye L, et al. Nanotechnology meets glioblastoma multiforme: Emerging therapeutic strategies. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2022;15(1). doi:10.1002/wnan.1838.

Nowe technologie w badaniach przesiewowych w kierunku raka piersi

Karolina Grodkowska, Paulina Jaruga, Vanessa Gąsiorowska,
Marcin Jezierzański, Oskar Fogiel, Michał Tutaj

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Badania przesiewowe w kierunku raka piersi zmniejszają śmiertelność związaną z rakiem piersi, a wcześniejsze wykrycie zwiększa skuteczność leczenia. Niestety, obecne metody badań przesiewowych są niedoskonałe, ze względu na niską czułość i wysoki odsetek wyników fałszywie dodatnich, szczególnie u kobiet z gęstą tkanką piersi. Nowe techniki obrazowania piersi, takie jak cyfrowa tomosynteza piersi, mammografia spektralna wzmocniona kontrastem, automatyczne USG, skrócony rezonans magnetyczny, czy obrazowanie dyfuzyjne rezonansu magnetycznego mogą pomóc pokonać ograniczenia obecnych badań przesiewowych.

Słowa kluczowe: rak piersi, badania przesiewowe w kierunku raka piersi, gęstość piersi, badania obrazowe piersi

Abstract : Breast cancer screening reduces breast cancer-related mortality, and earlier detection increases the effectiveness of treatment. Unfortunately, current screening methods are imperfect due to low sensitivity and high false-positive rates, especially in women with dense breast tissue. New breast imaging techniques such as digital breast tomosynthesis, contrast-enhanced spectral mammography, automated ultrasound, shortened MRI, and MRI diffusion imaging can help overcome the limitations of current screening.

Keywords: breast cancer, breast cancer screening, breast density, breast imaging

1. Wstęp

W 2020 roku rak piersi stał się najczęstszym nowotworem na świecie, wyprzedzając raka płuc pod względem liczby przypadków ^[1]. Wiele randomizowanych kontrolowanych badań klinicznych i badań obserwacyjnych

wykazało, że regularna mammografia przesiewowa może znacznie zmniejszyć śmiertelność z powodu raka piersi [2]. Badania przesiewowe i diagnostyka raka piersi ewoluowały w ciągu ostatnich 20 lat. Na początku 2000 roku mammografia cyfrowa w pełnym polu (ang. full-field digital mammography FFDM) zastąpiła mammografię analogową, poprawiając wydajność diagnostyczną, szczególnie u kobiet z gęstą tkanką piersi [3], a cyfrowa tomosynteza piersi staje się nowym standardem opieki w mammografii przesiewowej [4]. USG piersi również rozwinęło się poza swoją początkową rolę w różnicowaniu torbieli w stosunku do mas stałych wykrytych podczas mammografii lub badania fizykalnego [5]. Rezonans magnetyczny piersi (MRI), początkowo uważany za przydatny jako narzędzie do rozwiązywania problemów, jest obecnie standardowym dodatkowym narzędziem przesiewowym dostępnym zarówno dla kobiet wysokiego jak i pośredniego ryzyka [6]. Wraz z ciągłym, szybkim postępem technologicznym spodziewanym w następnej dekadzie, jest prawdopodobne, że badania przesiewowe w kierunku raka piersi będą bardzo różnić się od obecnych standardów.

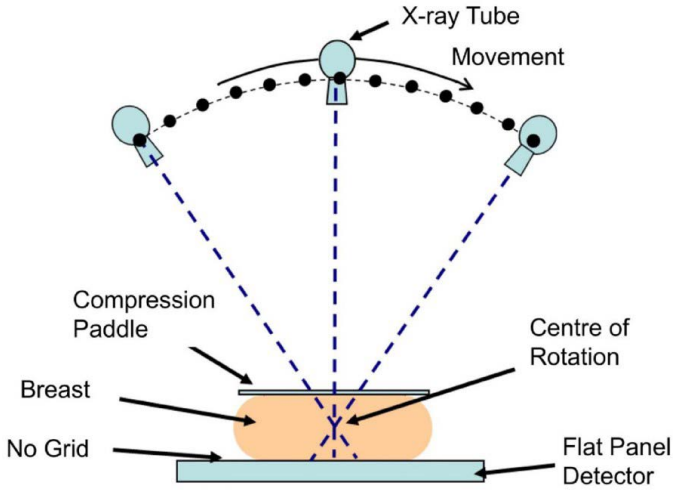
2. Mammografia

Mammografia jest obecnie złotym standardem w badaniach przesiewowych raka piersi. Polega ona na badaniu rentgenowskim piersi w standardowych widokach skośnych –czaszkowo-krzyżowych i środkowo-bocznych [7]. Wiele randomizowanych kontrolowanych badań nad rakiem piersi [8-10] dowodzi, że rutynowa mammografia przesiewowa u kobiet w wieku powyżej 40 lat może wykryć wczesne stadium raka piersi i zmniejszyć śmiertelność z powodu raka piersi o ponad 30%. Jednak mammografia jest badaniem niedoskonałym i jest szczególnie ograniczona przez gęstą tkankę piersi. Gęsta tkanka piersi może maskować leżący u jej podstaw guz, a tym samym zmniejsza czułość mammografii. Ponadto gęsta tkanka piersi jest niezależnym czynnikiem ryzyka raka piersi. W porównaniu z kobietami z przewagą tkanki tłuszczowej piersi, kobiety z gęstą tkanką piersi mają dwukrotnie większe ryzyko wystąpienia raka piersi [11-14].

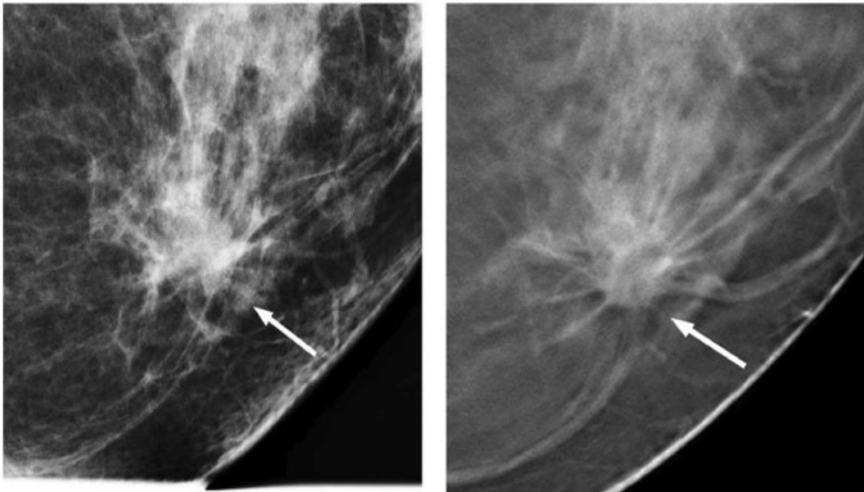
2.1. Tomosynteza

Ważnym postępem technologicznym mammografii jest cyfrowa tomosynteza piersi (ang. digital breast tomosynthesis DBT), pseudo „trójwymiarowa” technika mammografii, w której uzyskuje się wiele niskodawkowych

obrazów mammograficznych. Obrazy te są uzyskiwane, gdy lampa rentgenowska obraca się po łuku w poprzek nieruchomej piersi. (rycina 1.). Następnie algorytm komputerowy rekonstruuje serię przekrojów przez pierś, które są odczytywane podobnie jak przegląd badania obrazowego tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego. Dzięki temu guzy i ich morfologia stają się bardziej widoczne (rycina 2.) ^[15-17].



Rycina 1. Standardowa geometria cyfrowego systemu tomosyntezy piersi (DBT), ilustrująca, w jaki sposób lampa rentgenowska porusza się po łuku, podczas gdy płaski detektor uzyskuje serię obrazów piersi o niskiej dawce ^[15].

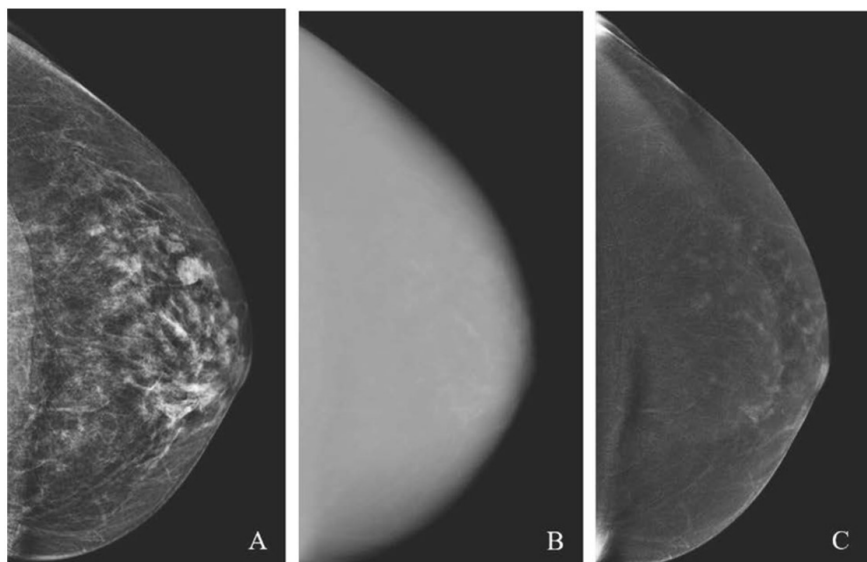


Rycina 2. Inwazyjny rak przewodowy o niskim stopniu złośliwości, porównanie pełnopolowej mammografii cyfrowej (po lewej) i cyfrowej tomosyntezy piersi (po prawej) ^[15].

Główną zaletą tomosyntezy jest jej zdolność do zmniejszania efektu maskującego nakładania się tkanek i szumu strukturalnego, zwykle spotykanego w mammografii 2D. Ta cecha jest szczególnie przydatna w przypadku gęstych piersi i pomaga poprawić wiarygodność odczytu radiologicznego. Dzięki lepszej czułości i swoistości oferowanej przez tomosyntezę piersi, w większości ośrodków coraz częściej stosuje się tę technologię ^[18-20].

2.2. Mammografia wzmocniona kontrastem

Mammografia wzmocniona kontrastem (ang. contrast-enhanced spectral mammography CESH) to nowa technika wykorzystująca jodowe środki kontrastowe do wizualizacji neowaskularyzacji piersi w sposób podobny do rezonansu magnetycznego ^[21]. Z naczyń powstałych w procesie angiogenezy często uwalnia się materiał kontrastowy ^[22], a środek kontrastowy dyfunduje w obrębie tkanki nowotworowej, co daje obraz wzmocniony jodem. Pozwala to zobaczyć nowotwór złośliwy pomimo pokrywającej go gęstej tkanki piersi. CESH to technika wykorzystująca podwójną energię, generująca dwa zestawy obrazów, obraz o niskiej energii, który odpowiada standardowej mammografii cyfrowej 2D, oraz zrekombinowany obraz, który pokazuje wychwyt środka kontrastowego (rycina 3.) ^[23,24]. W konsekwencji, gdy wykonuje się badanie CESH, standardową mammografię cyfrową 2D można bezpiecznie pominąć. Dawka promieniowania CESH jest od 1,2 do 1,8 razy większa niż w przypadku standardowej mammografii cyfrowej 2D, ale mieści się w zaleceniach dotyczących dawki maksymalnej w mammografii ^[25, 26]. Badania pokazują, że CESH przewyższa mammografię połączoną z USG w wykrywaniu zmian, jak również w ocenie wielkości i stopnia zaawansowania choroby ^[27-30]. W porównaniu z MRI większość badań CESH wykazuje jedynie niewielką redukcję czułości, zapewniając jednocześnie wyższą swoistość ^[31, 32]. Choć CESH łączy wady mammografii (dawka promieniowania rentgenowskiego i kompresja) oraz MRI piersi (potrzeba dożylnego materiału kontrastowego), badania wskazują na jej duży potencjał jako narzędzia przesiewowego ^[33, 34].



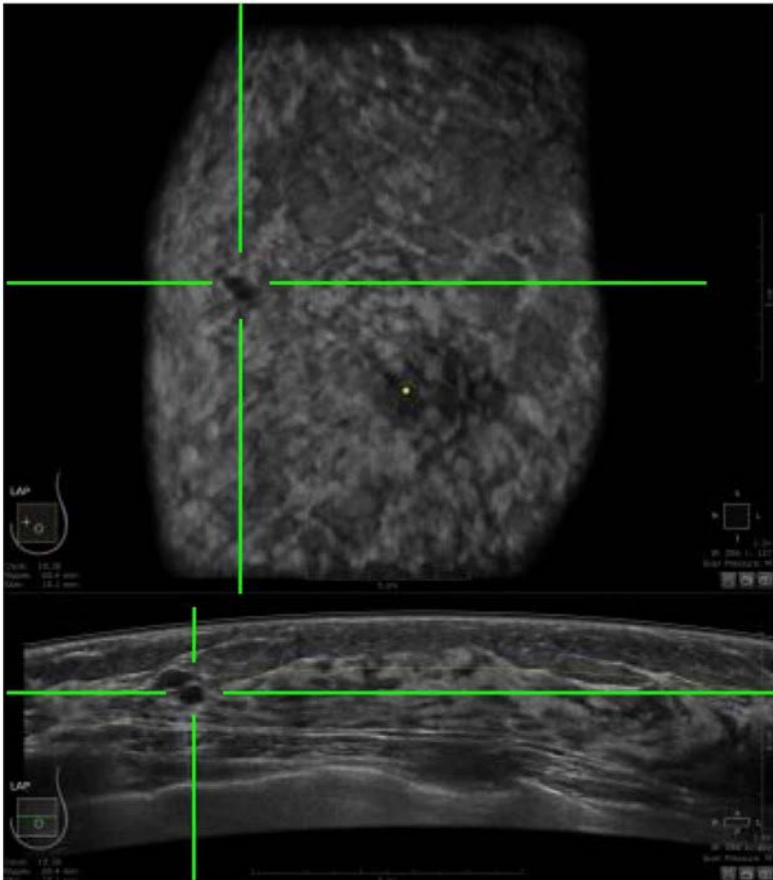
Rycina 3. Po dożylnym podaniu środka kontrastowego uzyskuje się sparowane obrazy czasowo-ogonowe o niskiej energii (A) i wysokiej energii (B). Przetwarzanie końcowe generuje zrekombinowany obraz (C), który uwydatnia obszary wychwytu jodu. Na pokazanym tutaj zrekombinowanym obrazie nie ma żadnych podejrzanych śladów; rozproszone obszary wzmocnienia są zgodne z łagodnym wzmocnieniem miększu tła^[24].

3. Ultrasonografia

USG jest powszechnie uważane za dodatkową technikę przesiewową, szczególnie dla kobiet z gęstym utkaniem gruczołu sutkowego, u których mammografia i ma niższą czułość. Główną zaletą USG jest to, że nie wykorzystuje promieniowania jonizującego. Jest to metoda z wyboru do dalszej oceny wyczuwalnych zmian w piersiach i nieprawidłowości wykrytych w badaniach przesiewowych. Ponadto ultrasonografia jest zalecana dla następujących trzech grup kobiet jako pierwsze badanie diagnostyczne przed napromienianiem: (a) poniżej 30 roku życia, (b) w okresie laktacji oraz (c) w ciąży.^[35] Konsekwentnie zgłaszano dodatkowe wskaźniki wykrywania raka piersi przy wykorzystaniu obrazowania USG wynoszące około 4 na 1000 badań przesiewowych i wykazano, że USG może zmniejszyć częstość występowania raka interwałowego^[36]. Jednak USG ma stosunkowo niską swoistość, co prowadzi do wielu biopsji zmian łagodnych. Chociaż badania wykazały zwiększające się dodatnie wartości predykcyjne badań przesiewowych USG^[37], to nadal ważne jest zwiększenie swoistości USG w celu poprawy jego wartości jako metody badań przesiewowych.

3.1. Automatyczne USG piersi

W zautomatyzowanym USG piersi (ang. automated breast ultrasound ABUS) szeroka głowica skanuje całą pierś, która jest obrazowana w dwóch do pięciu nachodzących na siebie projekcjach (przednio-tylnej, bocznej i środkowej). Ciągłe skanowanie umożliwia rekonstrukcję uzyskanych obrazów w płaszczyźnie czołowej i strzałkowej wyświetlanych obok oryginalnie uzyskanych płaszczyzn ^[38]. Technika rejestruje obrazy całej piersi, eliminując potrzebę oceny wyników w czasie rzeczywistym, umożliwiając ich zdalny odczyt



Rycina 4. Zautomatyzowany obraz ultrasonograficzny piersi (ABUS) w płaszczyźnie poziomej (na dole) i płaszczyźnie koronalnej (u góry), w której zielony krzyżyk identyfikuje lokalizację zmiany nowotworowej ^[15].

przez radiologów i ułatwia porównywanie aktualnych i wcześniej uzyskanych obrazów, co jest ważne w badaniach przesiewowych. Jakość diagnostyczna ABUS jest porównywalna z jakością USG ręcznego, jednak zgłaszany wysoki

odsetek wyników fałszywie dodatnich (do 13%) i długi czas odczytu ostudziły entuzjazm dla ABUS jako dodatkowej metody badań przesiewowych [39,40]. Niemniej jednak ABUS jest realną alternatywą dla ręcznego badania przesiewowego USG u kobiet z gęstym utkaniem gruczołu sutkowego lub u kobiet z grupy wysokiego ryzyka, u których MRI jest przeciwwskazany. Przyszły rozwój, w tym włączenie USG Dopplera lub elastografii, mogą zmniejszyć odsetek wyników fałszywie dodatnich i poprawić wartość tej techniki w badaniach przesiewowych [41]. Rycina 4 przedstawia zautomatyzowany obraz ultrasonograficzny piersi w płaszczyźnie poziomej (na dole) i płaszczyźnie koronalnej (u góry), gdzie zielony krzyżyk wskazuje lokalizację zmiany nowotworowej [15].

4. Rezonans Magnetyczny

Wśród obecnych metod obrazowania klinicznego rezonans magnetyczny (MRI) piersi ma najwyższą czułość we wczesnym wykrywaniu raka, zwłaszcza u kobiet z gęstą tkanką piersi [42]. Jednak z punktu widzenia badań przesiewowych MRI ma cztery główne wady w porównaniu z mammografią: czas spędzony w skanerze, konieczność wstrzyknięcia środka kontrastowego, takiego jak gadolin, mała swoistość oraz wysokie koszty inwestycyjne sprzętu. Dlatego jego zastosowanie dotyczy przede wszystkim diagnostyki, a jako narzędzie przesiewowe w dużej mierze ogranicza się do kobiet z ryzykiem wystąpienia nowotworu piersi przekraczającym 20% [43]. Postępująca technologia w MRI, taka jak skrócony MRI piersi i obrazowanie dyfuzyjne rezonansu magnetycznego (ang. diffusion-weighted imaging DWI), okazała się jednak bardzo obiecująca jako przyszłe zastosowanie w badaniach przesiewowych raka piersi [44].

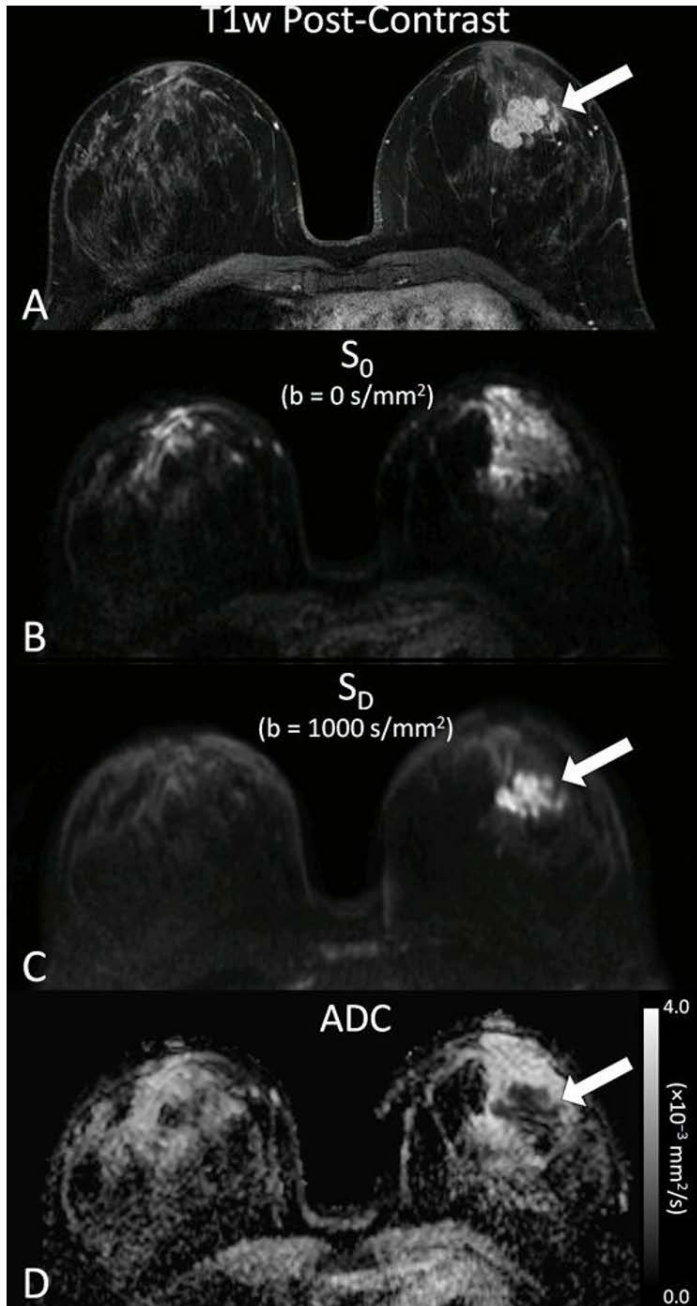
4.1. Skrócony MRI

Skrócony MRI piersi skraca czas pozyskiwania obrazu i jego interpretacji zwiększając dostęp i zmniejszając koszty związane z MRI piersi. Wymagania akredytacyjne American College of Radiology dotyczące MRI piersi obejmują sekwencję T2-zależną oraz obrazy T1-zależne przed kontrastem, wczesny po kontraście i opóźniony po kontraście [45]. W przeciwieństwie do tego skrócony protokół obejmuje badanie przed podaniem kontrastu i jedno badanie T1-zależne po podaniu kontrastu, a także obrazy odejmowane i obrazy projekcyjne o maksymalnym natężeniu. W przełomowym badaniu Kuhl i wsp. [46] stwierdzili równoważną dokładność diagnostyczną dla skróconych i pełnych protokołów wśród 443 kobiet i 606 badań MRI. Oba protokoły umożliwiły

identyfikację wszystkich 11 raków piersi. Dodatkowo autorzy stwierdzili podobne dokładności diagnostyczne: swoistość wyniosła 94,5% dla skróconego protokołu i 93,9% dla pełnego protokołu diagnostycznego, a dodatnia wartość predykcyjna wyniosła 24,4% dla skróconego protokołu i 23,4% dla pełnego protokołu diagnostycznego. Ponadto nastąpiła znaczna redukcja czasu akwizycji obrazu (17 minut w porównaniu z 3 minutami) i interpretacji radiologa (28 sekund dla pierwszych obrazów po podaniu kontrastu i 2,8 sekundy dla samego obrazu projekcyjnego o maksymalnej intensywności) ^[46].

4.2. Obrazowanie dyfuzyjne rezonansu

Obrazowanie dyfuzyjne rezonansu magnetycznego jest nową metodą diagnostyczną, gwałtownie rozwijającą się w ostatniej dekadzie. Wyjątkowość DWI polega na możliwości obserwacji gęstości i mikrostruktury komórek nowotworowych lub mikrounaczynienia na poziomie komórkowym bez użycia środków kontrastowych ^[47]. DWI opiera się na ruchach Browna cząsteczek wody i można je określić ilościowo za pomocą wartości pozornego współczynnika dyfuzji (ang. apparent diffusion coefficient ADC) ^[48, 49]. Może to odzwierciedlać mikrostrukturę tkanek (rycina 5) ^[49, 50, 51]. Powodem tego jest fakt, że ruch protonów jest ograniczony przede wszystkim przez komórki i błony komórkowe. Dlatego tkanka o większej komórkowości bardziej ogranicza dyfuzję niż tkanka o mniejszej komórkowości ^[51, 52]. Ponadto guzy o większym rozmiarze jądrowym wydają się mieć niższe wartości ADC ^[52]. Zostało to zaobserwowane w wielu badaniach przedklinicznych i klinicznych obejmujących wiele jednostek nowotworowych i regionów ciała ^[50]. Mniejsze badania były w stanie wykazać, że wartości ADC korelują z komórkowością i zrębem guza piersi, np. gruczolakowłókniami ^[53], różnymi rodzajami raka piersi ^[54, 55] i śluzowym rakiem piersi ^[56], więc te właściwości DWI odnoszą się również do guzów piersi. W rezultacie DWI zostało włączone do klinicznego protokołu MRI w wielu ośrodkach. Należy jednak zauważyć, że DWI nie zostało jeszcze włączone do oficjalnych kryteriów BI-RADS (ang. Breast Imaging-Reporting and Data System), a zatem nie może być jeszcze wykorzystywane do klasyfikacji wyników MRI BI-RADS ^[48].



Rycina 5. Przykładowe obrazy DWI piersi uzyskane u 37-letniej kobiety z inwazyjnym rakiem piersi. Pokazano odpowiednie obrazy z (A) obrazu T1-zależnego po kontraście, (B) DWI S₀ z b = 0 s/mm² (T2-zależny), (C) DWI SD z b = 1000 s/mm², (D) mapa pozornego współczynnika dyfuzji (ADC). Inwazyjny rak zrazikowy (strzałka) wykazuje zmniejszoną dyfuzyjność w obrazowaniu DW, pojawiając się jako hiperintensywny na obrazie SD i hipointensywny na mapie ADC [50].

5. Podsumowanie

Mammografia przesiewowa, mimo swoich wad zmniejszyła znacznie śmiertelność z powodu raka piersi. Fałszywie ujemne wyniki mammografii są istotnym ograniczeniem, głównie u kobiet z gęsto utkaną tkanką piersi. Cyfrowa tomosynteza piersi może jednocześnie zwiększyć wykrywalność raka i zmniejszyć odsetek wyników fałszywie dodatnich. Ponadto uzupełniające badania przesiewowe takie jak ultrasonografia piersi, rezonans magnetyczny piersi i mammografia z kontrastem dają nadzieję na dalsze zwiększenie wykrywalności raka piersi. W przyszłości do mammografii przesiewowej prawdopodobnie zostaną dodane bardziej spersonalizowane badania przesiewowe.

Referencje

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, i in. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- [2] Tabár L, Dean PB, Chen TH, i in. The incidence of fatal breast cancer measures the increased effectiveness of therapy in women participating in mammography screening. *Cancer.* 2018;125(4):515-523. doi:10.1002/cncr.31840.
- [3] Pisano ED, Gatsonis C, Hendrick E, i in. Diagnostic Performance of Digital versus Film Mammography for Breast-Cancer Screening. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1773-1783. doi:10.1056/nejmoa052911.
- [4] Chong A, Weinstein SP, McDonald ES, Conant EF. Digital Breast Tomosynthesis: Concepts and Clinical Practice. *Radiology.* 2019;292(1):1-14. doi:10.1148/radiol.2019180760.
- [5] Hooley RJ, Scoutt LM, Philpotts LE. Breast Ultrasonography: State of the Art. *Radiology.* 2013;268(3):642-659. doi:10.1148/radiol.13121606.
- [6] Mann RM, Cho N, Moy L. Breast MRI: State of the Art. *Radiology.* 2019;292(3):520-536. doi:10.1148/radiol.2019182947.

- [7] Welch HG, Prorok PC, O'Malley AJ, Kramer BS. Breast-Cancer Tumor Size, Overdiagnosis, and Mammography Screening Effectiveness. *N Engl J Med.* 2016;375(15):1438-1447. doi:10.1056/nejmoa1600249.
- [8] Tabár L, Vitak B, Chen THH, i in. Swedish Two-County Trial: Impact of Mammographic Screening on Breast Cancer Mortality during 3 Decades. *Radiology.* 2011;260(3):658-663. doi:10.1148/radiol.11110469.
- [9] Smith RA, Duffy SW, Gabe R, Tabar L, Yen AMF, Chen THH. The randomized trials of breast cancer screening: what have we learned? *Radiologic Clinics of North America.* 2004;42(5):793-806. doi:10.1016/j.rcl.2004.06.014.
- [10] Hellquist BN, Duffy SW, Abdsaleh S, i in. Effectiveness of population-based service screening with mammography for women ages 40 to 49 years. *Cancer.* 2010;117(4):714-722. doi:10.1002/cncr.25650.
- [11] McCormack VA, dos Santos Silva I. Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2006;15(6):1159-1169. doi:10.1158/1055-9965.epi-06-0034.
- [12] Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. Comparison of the Performance of Screening Mammography, Physical Examination, and Breast US and Evaluation of Factors that Influence Them: An Analysis of 27,825 Patient Evaluations. *Radiology.* 2002;225(1):165-175. doi:10.1148/radiol.2251011667.
- [13] Harvey JA, Bovbjerg VE. Quantitative Assessment of Mammographic Breast Density: Relationship with Breast Cancer Risk. *Radiology.* 2004;230(1):29-41. doi:10.1148/radiol.2301020870.
- [14] Boyd NF, Guo H, Martin LJ, i in. Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(3):227-236. doi:10.1056/nejmoa062790.
- [15] Vaughan CL. Novel imaging approaches to screen for breast cancer: Recent advances and future prospects. *Medical Engineering & Physics.* 2019;72:27-37. doi:10.1016/j.medengphy.2019.09.001.

- [16] Seely JM, Alhassan T. Screening for Breast Cancer in 2018—What Should We be Doing Today? *Current Oncology*. 2018;25(11):115-124. doi:10.3747/co.25.3770.
- [17] Helvie MA. Digital Mammography Imaging: Breast Tomosynthesis and Advanced Applications. *Radiologic Clinics of North America*. 2010;48(5):917-929. doi:10.1016/j.rcl.2010.06.009.
- [18] Noroozian M, Hadjiiski L, Rahnema-Moghadam S, i in. Digital Breast Tomosynthesis Is Comparable to Mammographic Spot Views for Mass Characterization. *Radiology*. 2012;262(1):61-68. doi:10.1148/radiol.11101763.
- [19] Tagliafico A, Astengo D, Cavagnetto F, i in. One-to-one comparison between digital spot compression view and digital breast tomosynthesis. *Eur Radiol*. 2011;22(3):539-544. doi:10.1007/s00330-011-2305-1.
- [20] Dhamija E, Gulati M, Deo SVS, Gogia A, Hari S. Digital Breast Tomosynthesis: an Overview. *Indian J Surg Oncol*. 2021;12(2):315-329. doi:10.1007/s13193-021-01310-y.
- [21] Patel BK, Lobbes MBI, Lewin J. Contrast Enhanced Spectral Mammography: A Review. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 2018;39(1):70-79. doi:10.1053/j.sult.2017.08.005.
- [22] Kuhl C. The Current Status of Breast MR Imaging Part I. Choice of Technique, Image Interpretation, Diagnostic Accuracy, and Transfer to Clinical Practice. *Radiology*. 2007;244(2):356-378. doi:10.1148/radiol.2442051620.
- [23] Lalji UC, Jeukens CRLPN, Houben I, i in. Evaluation of low-energy contrast-enhanced spectral mammography images by comparing them to full-field digital mammography using EUREF image quality criteria. *Eur Radiol*. 2015;25(10):2813-2820. doi:10.1007/s00330-015-3695-2.
- [24] Sogani J, Mango VL, Keating D, Sung JS, Jochelson MS. Contrast-enhanced mammography: past, present, and future. *Clinical Imaging*. 2021;69:269-279. doi:10.1016/j.clinimag.2020.09.003.

- [25] .Fallenberg EM, Dromain C, Diekmann F, i in. Contrast-enhanced spectral mammography: Does mammography provide additional clinical benefits or can some radiation exposure be avoided? *Breast Cancer Res Treat.* 2014;146(2):371-381. doi:10.1007/s10549-014-3023-6.
- [26] Jeukens CRLPN, Lalji UC, Meijer E, i in. Radiation Exposure of Contrast-Enhanced Spectral Mammography Compared With Full-Field Digital Mammography. *Investigative Radiology.* 2014;49(10):659-665. doi:10.1097/rli.000000000000068.
- [27] Dromain C, Thibault F, Muller S, i in. Dual-energy contrast-enhanced digital mammography: initial clinical results. *Eur Radiol.* 2010;21(3):565-574. doi:10.1007/s00330-010-1944-y.
- [28] Cheung YC, Lin YC, Wan YL, i in. Diagnostic performance of dual-energy contrast-enhanced subtracted mammography in dense breasts compared to mammography alone: interobserver blind-reading analysis. *Eur Radiol.* 2014;24(10):2394-2403. doi:10.1007/s00330-014-3271-1.
- [29] Tagliafico AS, Bignotti B, Rossi F, i in. Diagnostic performance of contrast-enhanced spectral mammography: Systematic review and meta-analysis. *The Breast.* 2016;28:13-19. doi:10.1016/j.breast.2016.04.008.
- [30] Patel BK, Garza SA, Eversman S, Lopez-Alvarez Y, Kosiorek H, Pockaj BA. Assessing tumor extent on contrast-enhanced spectral mammography versus full-field digital mammography and ultrasound. *Clinical Imaging.* 2017;46:78-84. doi:10.1016/j.clinimag.2017.07.001.
- [31] Lee-Felker SA, Tekchandani L, Thomas M, i in. Newly Diagnosed Breast Cancer: Comparison of Contrast-enhanced Spectral Mammography and Breast MR Imaging in the Evaluation of Extent of Disease. *Radiology.* 2017;285(2):389-400. doi:10.1148/radiol.2017161592.
- [32] Fallenberg EM, Schmitzberger FF, Amer H, i in. Contrast-enhanced spectral mammography vs. mammography and MRI – clinical performance in a multi-reader evaluation. *Eur Radiol.* 2016;27(7):2752-2764. doi:10.1007/s00330-016-4650-6.

- [33] Sung JS, Lebron L, Keating D, i in. Performance of Dual-Energy Contrast-enhanced Digital Mammography for Screening Women at Increased Risk of Breast Cancer. *Radiology*. 2019;293(1):81-88. doi:10.1148/radiol.2019182660.
- [34] Sorin V, Yagil Y, Yosepovich A, i in. Contrast-Enhanced Spectral Mammography in Women With Intermediate Breast Cancer Risk and Dense Breasts. *American Journal of Roentgenology*. 2018;211(5):W267-W274. doi:10.2214/ajr.17.19355.
- [35] Modiri A, Goudreau S, Rahimi A, Kiasaleh K. Review of breast screening: Toward clinical realization of microwave imaging. *Med Phys*. 2017;44(12):e446-e458. doi:10.1002/mp.12611.
- [36] Ohuchi N, Suzuki A, Sobue T, i in. Sensitivity and specificity of mammography and adjunctive ultrasonography to screen for breast cancer in the Japan Strategic Anti-cancer Randomized Trial (J-START): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016;387(10016):341-348. doi:10.1016/s0140-6736(15)00774-6.
- [37] Weigert JM. The Connecticut Experiment; The Third Installment: 4 Years of Screening Women with Dense Breasts with Bilateral Ultrasound. *Breast J*. 2016;23(1):34-39. doi:10.1111/tbj.12678.
- [38] Rella R, Belli P, Giuliani M, i in. Automated Breast Ultrasonography (ABUS) in the Screening and Diagnostic Setting. *Academic Radiology*. 2018;25(11):1457-1470. doi:10.1016/j.acra.2018.02.014.
- [39] Giuliano V, Giuliano C. Improved breast cancer detection in asymptomatic women using 3D-automated breast ultrasound in mammographically dense breasts. *Clinical Imaging*. 2013;37(3):480-486. doi:10.1016/j.clinimag.2012.09.018.
- [40] Brem RF, Tabár L, Duffy SW, i in. Assessing Improvement in Detection of Breast Cancer with Three-dimensional Automated Breast US in Women with Dense Breast Tissue: The SomoInsight Study. *Radiology*. 2015;274(3):663-673. doi:10.1148/radiol.14132832.
- [41] Butler RS. Invited Commentary: Handheld or Automated—Staying Focused on the Goals of Screening US, with Response from Drs van Zelst and Mann. *RadioGraphics*. 2018;38(3):683-687. doi:10.1148/rg.2018180033.

- [42] Mann RM, Cho N, Moy L. Breast MRI: State of the Art. *Radiology*. 2019;292(3):520-536. doi:10.1148/radiol.2019182947.
- [43] Vaughan CL. Novel imaging approaches to screen for breast cancer: Recent advances and future prospects. *Medical Engineering & Physics*. 2019;72:27-37. doi:10.1016/j.medengphy.2019.09.001.
- [44] Tabár L, Dean PB. A New Era in the Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *The Breast Journal*. 2010;16:S2-S4. doi:10.1111/j.1524-4741.2010.00992.x.
- [45] Wymagania programu akredytacji rezonansu magnetycznego piersi (MRI). American College of Radiology. <https://www.acr.org/modalities/breast-mri>.
- [46] Kuhl CK, Schrading S, Strobel K, Schild HH, Hilgers RD, Bieling HB. Abbreviated Breast Magnetic Resonance Imaging (MRI): First Postcontrast Subtracted Images and Maximum-Intensity Projection—A Novel Approach to Breast Cancer Screening With MRI. *JCO*. 2014;32(22):2304-2310. doi:10.1200/jco.2013.52.5386/.
- [47] Iima M, Honda M, Sigmund EE, Ohno Kishimoto A, Kataoka M, Togashi K. Diffusion MRI of the breast: Current status and future directions. *J Magn Reson Imaging*. 2019;52(1):70-90. doi:10.1002/jmri.26908.
- [48] Baltzer P, Mann RM, i in. Diffusion-weighted imaging of the breast—a consensus and mission statement from the EUSOBI International Breast Diffusion-Weighted Imaging working group. *Eur Radiol*. 2019;30(3):1436-1450. doi:10.1007/s00330-019-06510-3.
- [49] Padhani AR, Liu G, Mu-Koh D, i in. Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging as a Cancer Biomarker: Consensus and Recommendations. *Neoplasia*. 2009;11(2):102-125. doi:10.1593/neo.81328.
- [50] Partridge SC, Amornsiripanitch N. DWI in the Assessment of Breast Lesions. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 2017;26(5):201-209. doi:10.1097/rmr.000000000000137.
- [51] Surov A, Meyer HJ, Wienke A. Correlation between apparent diffusion coefficient (ADC) and cellularity is different in several tumors: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(35):59492-59499. doi:10.18632/oncotarget.17752.

- [52] Bailey C, Siow B, Panagiotaki E, i in. Microstructural models for diffusion MRI in breast cancer and surrounding stroma: an ex vivo study. *NMR Biomed.* 2016;30(2):e3679. doi:10.1002/nbm.3679.
- [53] Parsian S, Giannakopoulos NV, Rahbar H, Rendi MH, Chai X, Partridge SC. Diffusion-weighted imaging reflects variable cellularity and stromal density present in breast fibroadenomas. *Clinical Imaging.* 2016;40(5):1047-1054. doi:10.1016/j.clinimag.2016.06.002.
- [54] Woodhams R, Kakita S, Hata H, i in. Diffusion-Weighted Imaging of Mucinous Carcinoma of the Breast: Evaluation of Apparent Diffusion Coefficient and Signal Intensity in Correlation With Histologic Findings. *American Journal of Roentgenology.* 2009;193(1):260-266. doi:10.2214/ajr.08.1670.
- [55] Jiang R, Ma Z, Dong H, Sun S, Zeng X, Li X. Diffusion tensor imaging of breast lesions: evaluation of apparent diffusion coefficient and fractional anisotropy and tissue cellularity. *BJR.* 2016;89(1064):20160076. doi:10.1259/bjr.20160076.
- [56] Onishi N, Kanao S, Kataoka M, i in. Apparent diffusion coefficient as a potential surrogate marker for Ki-67 index in mucinous breast carcinoma. *J Magn Reson Imaging.* 2014;41(3):610-615. doi:10.1002/jmri.24615.

Rak tarczycy - przegląd aktualnych standardów oraz rola imprintingu genomowego w diagnostyce

Szymon Mikler, Kamila Meca, Łukasz Czogalik, Oliwia Pluta, Jakub Słota

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: W ostatnich latach zaobserwowano wzrost liczby zachorowań na raka tarczycy. Diagnostyka guzów tarczycy wciąż stanowi wyzwanie dla lekarzy. Aktualne wytyczne wymieniają biopsję aspiracyjną cienkoigłową (BACC) i klasyfikację Bethesda jako narzędzia najbardziej przydatne do postawienia rozpoznania. Mają one jednak pewne ograniczenia, które mogą przyczynić się do błędów w diagnostyce oraz obrania niewłaściwej ścieżki terapeutycznej. Kluczowe wydaje się poszukiwanie nowych metod diagnostyki guzów tarczycy pozwalających lekarzowi stawiać rozpoznania w sposób jak najbardziej precyzyjny, co skutkowałoby możliwością uniknięcia przez pacjentów zbędnego leczenia operacyjnego i związanych z nim powikłań. Jedną z nowych metodą mogących przysłużyć się diagnostyce raka tarczycy jest identyfikacja imprintowanych genów w komórkach pochodzących z BACC. Zgodnie z opublikowanym w ostatnim czasie badaniem, metoda ta cechuje się czułością 100% i swoistością 91,5%, co stanowi obiecujący krok w procesie doskonalenia postępowania diagnostycznego.

Słowa kluczowe: rak tarczycy, imprinting genomowy, klasyfikacja Bethesda, biopsja aspiracyjna cienkoigłowa

Abstract: In recent years, an increase in the incidence of thyroid cancer has been observed. Thyroid tumor diagnosis is still a challenge for doctors. Current guidelines list fine-needle aspiration biopsy (BACC) and Bethesda classification as the highest quality tools for diagnosis. However, they have certain characteristics that can cause errors in diagnosis or treatment of thyroid cancer. It seems to be important to search for new, more precise methods of thyroid tumor diagnosis. It would result in a reduction in the frequency of unnecessary surgical procedures and related complications. One of the new methods that may be useful in cancer diagnosis is the identification of imprinted genes in cells derived from BACC. According to a recently published study, this method is characterized by 100% diagnostic sensitivity and a 91,5% specificity and may be a promising step in the process of improving diagnostic procedures.

Keywords: thyroid cancer, genomic imprinting, Bethesda classification, fine needle aspiration biopsy

1. Wstęp

Rak tarczycy (łac. thyroid carcinoma TC) stanowi mniej niż 1% wszystkich diagnozowanych nowotworów złośliwych. Częściej chorują kobiety, a szansa na zachorowanie wzrasta wraz z liczbą przebytych ciąż, natomiast średni wiek zachorowania oscyluje między IV a V dekadą życia. Wśród czynników ryzyka zachorowania wymienia się między innymi płeć żeńską, obecność guzków tarczycy oraz ekspozycję na promieniowanie jonizujące. Korelacja z ostatnim wydaje się mieć najistotniejsze znaczenie, jeżeli ekspozycja miała miejsce w pierwszych dwóch dekadach życia – radioterapia okolic szyi u dzieci pociąga za sobą ryzyko rozwinięcia raka tarczycy w ciągu 10-20 lat. Zmniejszona dostępność jodu w diecie koreluje z kolei z ryzykiem zachorowania na raka pęcherzykowatego tarczycy ^[1, 2]. W proces kancerogenezy zaangażowane są również liczne szlaki genetyczne. Udowodniono istotny wpływ nasilonej aktywacji szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAP) - reguluje ona wzrost i proliferację komórek. Nadmierna aktywność tej ścieżki istotnie pogarsza rokowanie w przypadku raka brodawkowego ze współistniejącą mutacją BRAF (60% przypadków raka brodawkowego) – wspomniany gen koduje kinazę serynowo/treoninową odpowiedzialną za przekazywanie sygnału na ścieżkę MAPK/Erk. Również białka z rodziny RAS, kodowane przez geny NRAS, KRAS, HRAS pełnią funkcję w procesie aktywacji ścieżek sygnałowych i przekazywania sygnału. Mutacje wspomnianych genów poprzez aktywujące działanie na szlaki sygnałowe predysponują do rozwoju nie tylko raka tarczycy, ale również raka jelita grubego, trzustki czy płuc. Mutacja somatyczna w genie białka RET spotykana jest w około 50% przypadków raka rdzeniastego tarczycy. W przypadku raka brodawkowego rearanżacja w obrębie genu RET(RET/PTC) prowadzi do powstania białka fuzyjnego, odpowiedzialnego za deregulację szlaków sygnałowych MAPK oraz PI3K-PTEN-AKT. Wiąże się to z większym ryzykiem zachorowania na raka brodawkowego w młodszym wieku. Około ¼ przypadków raka rdzeniastego to nowotwory dziedziczne związane z mutacją protoonkogenu RET w linii zarodkowej ^[3, 4, 5].

Rak tarczycy może przebiegać bezobjawowo, a rozpoznanie stawiane jest często na podstawie biopsji guzka przypadkowo wykrytego w USG. Szacuje się jednak, że aż 5 do 7% przypadków wykrywanych jest na podstawie samego badania fizykalnego – guzek jest twardy, nieruchomy, jego obecności może towarzyszyć powiększenie szyjnych węzłów chłonnych. Zaawansowanie nowotworu może skutkować pojawieniem się następujących objawów: chrypka,

duszność, dysfagia, zespół objawów wynikający z ucisku naczyń krwionośnych na szyi oraz ból szyi. Gwałtowny wzrost, chrypka czy silny ból i duszność są objawami charakterystycznymi dla raka nieodróżnionego [6, 7].

Zdecydowana większość, bo, aż 90% tych zmian, to łagodne gruczolaki tarczycy wywodzące się z komórek nabłonkowych pęcherzyków, zmiany torbielowate lub ogniskowe zmiany zapalne [3, 4]. Nowotwór gruczołu tarczowego jest najczęstszym nowotworem złośliwym gruczołów wydzielania wewnętrznego. Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci zaobserwowano stopniowy wzrost zapadalności na ten rodzaj nowotworu. Zanotowany wzrost zachorowalności na nowotwory tarczycy osiągnął wartość 300% na przestrzeni ostatnich 3 dekad, co było przyczyną rozwinięcia się dyskusji odnośnie tego, czy wspomniany trend spowodowany jest rzeczywistym wzrostem zachorowalności czy nadmiernie częstym rozpoznawaniem TC. Badania amerykańskie, analizujące wzrost zachorowalności na TC przy względnie stałym poziomie śmiertelności na przestrzeni ostatnich 30 lat, wskazują istotny wpływ: dostępności leczenia, przypadkowego stwierdzenia guzów w badaniach obrazowych, częstości wykonywania biopsji i operacji oraz zmian w kryteriach diagnostyki patologicznej na korzyść częstszego rozpoznawania TC [8, 9]. Obecne dane populacyjne pozwalają stwierdzić, że wspomniana zależność spowodowana jest zarówno wzrostem zachorowalności na raka brodawkowego, jak i polepszeniem standardów i możliwości diagnostycznych [1].

Nowotwory endokrynne i neuroendokrynne zostały po raz piąty sklasyfikowane przez WHO w 2022. Nowa klasyfikacja podzieliła nowotwory tarczycy w następujący sposób (tabela 1) [10].

Tabela 1. WHO - klasyfikacja nowotworów tarczycy [10].

Zaburzenia rozwojowe
1. Torbiel przewodu tarczowo-językowego
2. Inne wrodzone wady tarczycy
Nowotwory wywodzące się z komórek pęcherzykowych
1. Nowotwory łagodne
A. Choroba guzkowa pęcherzyków tarczycy
B. Gruczolak pęcherzykowy
C. Gruczolak pęcherzykowy o architekturze brodawkowej
D. Gruczolak onkocytarny tarczycy
2. Nowotwory niskiego ryzyka
A. Nieinwazyjny grudkowy nowotwór tarczycy z brodawkowatymi cechami jądrowymi
B. Guzy tarczycy o niepewnym potencjale złośliwości

C. Hialinizujący guz beleczkowaty
3. Nowotwory złośliwe
A. Rak pęcherzykowy tarczycy
B. Inwazyjny kapsułkowany rak brodawkowy pęcherzykowy
C. Rak brodawkowy tarczycy
D. Rak onkocytny tarczycy
mi. Raki pochodzenia pęcherzykowego, o wysokim stopniu złośliwości
I. Zróżnicowany rak tarczycy o wysokim stopniu złośliwości
II. Nisko zróżnicowany rak tarczycy
F. Rak tarczycy wywodzący się z anaplastycznych komórek pęcherzykowych
Rak wywodzący się z komórek C tarczycy
1. Rak rdzeniasty tarczycy
Mieszane raki pochodzące z komórek rdzeniastych i pęcherzykowych
Raki gruczołów ślinowych tarczycy
1. Rak śluzowo-naskórkowy tarczycy
2. Rak wydzielniczy typu śliniankowego
Guzy tarczycy o niepewnej histogenezie
1. Stwardniający rak śluzowo-naskórkowy z eozynofilią
2. Rak morularny tarczycy
Guzy grasicy w obrębie tarczycy
1. Rodzina grasiczaków
2. Wrzecionowaty guz nabłonkowy z elementami grasicopodobnymi
3. Rodzina raka grasicy
Nowotwory zarodkowe tarczycy
1. Tyreoblastoma

W klasyfikacji uwzględniono pochodzenie komórkowe nowotworów, stopień złośliwości oraz cechy histologiczne i cytologiczne. Zwrócono również uwagę na przebieg choroby, jak i markery molekularne. Wywodzące się z komórek pęcherzykowych raki zróżnicowane (rak brodawkowy i rak pęcherzykowy) to najczęściej rozpoznawana grupa nowotworów tarczycy. Przyjmuje się, że stanowią powyżej 85% przypadków TC, a najczęściej diagnozowany jest rak brodawkowy tarczycy. Raki niezróżnicowane (rak anaplastyczny) oraz nowotwory neuroendokrynne (rak rdzeniasty tarczycy z komórek C) stanowią odpowiednio po 5% przypadków. Nowotwory takie jak chłoniaki, nowotwory przytarczyc, czy wywodzące się z grasicy należą do rzadkości, jednak wciąż należy mieć je na uwadze [4, 10].

W Polsce w celu klasyfikacji raka tarczycy stosuje się klasyczną klasyfikację zaawansowania nowotworu (TNM) (tabela 2).

Tabela 2. Klasyfikacja TNM [opracowanie własne] ^[11].

T (tumor) – ocena wielkości guza pierwotnego (skala 0-4)	
T_x – nie można ocenić guza pierwotnego T₀ – nie stwierdza się guza pierwotnego T_{is} – rak przedinwazyjnt T₁ – guz nie większy niż 2 cm, ograniczony do tarczycy T_{1a} – guz nie większy niż 1 cm, ograniczony do tarczycy T_{1b} – guz większy niż 1 cm i nie większy niż 2 cm, ograniczony do tarczycy T₂ – guz większy niż 2 cm i nie większy niż 4 cm, ograniczony do tarczycy T₃ – guz większy niż 4 cm, ograniczony do tarczycy lub guz z naciekaniami poza gruczoł na mięsień mostkowo-gnykowy, mostkowo-tarczowy lub łopatkowo-gnykowy T_{3a} – guz większy niż 4 cm, ograniczony do tarczycy T_{3b} – guz każdej wielkości z naciekaniami poza gruczoł na mięsień mostkowo-gnykowy, mostkowo-tarczowy lub łopatkowo-gnykowy T_{4a} – guz wychodzący poza torebkę gruczołu tarczowego i naciekający jedną ze struktur: tkanka podskórna, krtań, tchawica, przełyk, nerw krtaniowy wsteczny T_{4b} – guz naciekający powięź przedkręgową, naczynia śródpiersiowe lub zajęcie tętnicy szyjnej	
N (nodus) – ocena stopnia rozprzestrzenienia się nowotworu do regionalnych węzłów chłonnych (skala 0-3)	
N_x - nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych N₀ - brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych N₁ - przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych N_{1a} - przerzuty do węzłów Grupy VI lub węzłów śródpiersiowych górnych N_{1b} - przerzuty do innych węzłów szyjnych po stronie guza, po stronie przeciwnej lub obustronnych (Grupa I, II, III, IV lub V) lub przerzuty do węzłów zagardłowych	
M (metastasis) – ocena braku lub obecności przerzutów odległych (skala 0-1)	
M₀ - nie stwierdza się obecności przerzutów odległych M₁ - stwierdza się przerzuty odległe	

Na podstawie ustaleń wynikających z oceny nowotworu na podstawie powyższej tabeli (tabela 2), określa się stopień zaawansowania nowotworu (tabela 3).

Tabela 3. Klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworów tarczycy [opracowanie własne] ^[11].

Stopień	T	N	M
Rak brodawkowaty, pęcherzykowy, oksyfilny i niskozróżnicowany; pacjent poniżej 55 roku życia			
I	Każde T	Każde N	M ₀
II	Każde T	Każde N	M ₁
Rak brodawkowaty, pęcherzykowy, oksyfilny i niskozróżnicowany; pacjent od 55 roku życia			

RAK TARCZYCY - PRZEGLĄD AKTUALNYCH STANDARDÓW...

I	T1a, T1b, T2	N0	M0
II	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
III	T4a	Każde N	M0
IVA	T4b	Każde N	M0
IVB	Każde T	Każde N	M1
Rak rdzeniasty			
I	T1a, T1b	N0	M0
II	T2, T3	N0	M0
III	T1, T2, T3	N1a	M0
IVA	T1, T2, T3	N1b	M0
	T4a	Każde N	M0
IVB		Każde N	M0
IVC		Każde N	M1
Rak niezróżnicowany (anaplastyczny)			
IVA	T1, T2, T3	N0	M0
IVB	T1, T2, T3	N1	M0
	T3b, T4a, T4b	Każde N	M0
IVC	Każde T	Każde N	M1

Obraz kliniczny raka tarczycy nie jest charakterystyczny i zależy od podtypu histologicznego. Zmiany zauważone w badaniach obrazowych nie pozwalają na jednoznaczne określenie, czy guzek z jakim mamy do czynienia jest zmianą łagodną, czy złośliwą. Celem wczesnego rozpoznania zaleca się wykonanie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (BAC), jednak metoda ta również niesie za sobą ryzyko nieprecyzyjnego rozpoznania.

Rokowanie w przypadku raków zróżnicowanych jest pomyślne. Szacuje się, że przeżycie 5-letnie w przypadkach zmian miejscowych sięga do 100%. Szanse te spadają, gdy rozpoznanie stawiane jest w momencie wystąpienia przerzutów odległych, osiągają one odpowiednio 75% dla raka brodawkowego i 63% dla raka pęcherzykowego. Rokowanie w przypadku raka anaplastycznego jest wysoce niekorzystne. Nowotwór ten, z uwagi na szybki wzrost i naciekanie okolicznych tkanek, w bardzo krótkim czasie doprowadza do śmierci chorego. W przypadku miejscowego wzrostu 5 lat przeżywa 34% chorych, natomiast w przypadku wystąpienia przerzutów odległych szanse te spadają do około 4% [4, 12].

2. Standardy postępowania przy podejrzeniu raka tarczycy

Badanie ultrasonograficzne (USG) jest badaniem z wyboru przy diagnoście wielu chorób tarczycy (tabela 4). Technikami stosowanymi w diagnostyce gruczołu tarczowego są: obrazowanie w skali szarości (B-mode), metoda kolorowy Doppler lub power Doppler (służące do oceny przepływu naczyniowego) oraz sonoelastografia USG zmiany ogniskowej. Prawidłowy opis badania ultrasonograficznego powinien zawierać podstawowe informacje, czyli między innymi: położenie gruczołu, jego budowa, wymiary, opis mięszu tarczycy oraz ewentualny opis zmiany ogniskowej. Podczas oceny guza tarczycy bierzemy pod uwagę cechy jego obrazu tj.: budowa, kształt, wygląd brzegów, orientację zmiany, „halo”, echogeniczność w odniesieniu do prawidłowego mięszu tarczycy (lub ślinianki podżuchwowej w przypadku hipoechogenicznego mięszu tarczycy), zwapnienia, zagęszczenia koloidu, ekspansję pozatarczycową, unaczynienie, odkształcalność ^[13].

Tabela 4. Wskazania do badania ultrasonograficznego tarczycy ^[14].

Wskazania do USG tarczycy:
wole guzowate lub wyczuwalny palpacyjnie guzek w rejonie tarczycy
powiększenie tarczycy bez wyczuwalnego guzka
Zmiana ogniskowa tarczycy wykryta w USG wykonanym z innych wskazań lub w innym badaniu obrazowym
Podejrzenie innej choroby tarczycy
Nosicielstwo mutacji RET i/lub stężenie kalcytoniny powyżej normy
Ekspozycja szyi na promieniowanie jonizujące w wywiadzie
Powiększenie węzłów chłonnych szyjnych, które nie wiąże się z infekcją

Ultrasonograficzne cechy złośliwości zostały przedstawione w tabeli (tabela 5), jest to tzw. Klasyfikacja EU-TIRADS-PL, na podstawie której, pacjenci kwalifikowani są do biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej. Sama klasyfikacja guzów tarczycy w skali EU-TIRADS-PL ≥ 4 pozwala wykryć guzki złośliwe z czułością 91,67% i swoistością 52,8% ^[12]. Korelacja między ilością zmian guzowatych a ryzykiem złośliwości jest znikoma. Diagnostyka ultrasonograficzna w przypadku mnogich zmian powinna polegać na dokładnej ocenie każdego z guzków wg. skali EU-TIRADS-PL. Do BACC kierowane powinny być te zmiany, które wykazują najwyższe ryzyko złośliwości. Na szczególną uwagę zasługuje wystąpienie jednej z cech kategorii 5: głęboka hipoechogeniczność, nieregularny kształt, orientacja nierównoległa, nierówne brzegi,

obecność mikrozwapnień i ekspansja pozatarczycowa. Kryterium wielkości guzka należy pominąć w przypadku stwierdzenia przerzutów raka tarczycy do węzłów chłonnych lub węzłów odległych oraz w przypadku podwyższonego stężenia kalcytoniny i nosicielstwa genu RET, co jest przesłanką do ukierunkowania diagnostyki w stronę raka rdzeniastego tarczycy [13, 15].

W ostatnich latach poświęca się uwagę technikom opartym na elastografii. Są to metody do nieinwazyjnej oceny właściwości mechanicznych tkanek zmienionych chorobowo. Pomiar uzyskiwane są w specjalnych trybach obrazowania, które mogą wykryć sztywność tkanki w odpowiedzi na przyłożoną siłę mechaniczną (ściskanie, fala ścinająca). Istnieje kilka technik elastografii ultrasonograficznej, które oceniają właściwości fizyczne guza, wykorzystując mierzalne wielkości fizyczne. Wyróżniamy technikę bazującą na obrazowaniu odkształcenia (sonoelastografia statyczna), która wykorzystuje mechaniczną kompresję tkanek oraz techniki obrazowania fali ścinającej (sonoelastografia dynamiczna). Badanie polega na przyłożeniu do tkanek urządzenia wibracyjnego lub generującego falę akustyczną. W metodzie statycznej w ocenie półjakościowej rekomenduje się użycie skali Asteria, natomiast do oceny półilościowej stosuje się wskaźnik SR. W elastografii dynamicznej ocena ilościowa jest wyrażana jako wartość średnia modułu Younga [13, 16].

Tabela 5. Klasyfikacja EU-TIRADS-PL [13].

Kategoria EU-TIRADS-PL	Rodzaj zmiany	Ryzyko złośliwości	Wskazania do wykonania biopsji i/lub dalszego monitorowania w USG
1	Bez zmian ogniskowych	Bliskie 0%	Kontrola USG w zależności od czynników ryzyka klinicznego
2	Zmiany ogniskowe bezechowe (płynowe) Zmiany o strukturze gąbczastej	Bliskie 0%	BACC niezalecana (wyjątek: biopsja terapeutyczna u chorych objawowych, np. Opróżnienie torbieli); kontrola USG w zależności od czynników ryzyka klinicznego
3	Normo-/izoechogeniczne lub hiperechogeniczne Kształt owalny lub okrągły Równe brzegi/ granice Bez cech kategorii 5	2-4%	BACC ≥ 20mm

4	Hiperechogeniczne Kształt owalny lub okrągły Równe brzegi/granice Bez cech kategorii 5	6-17%	BACC \geq 15
5	Obecność co najmniej jednej z cech poniżej wymienionych: <ul style="list-style-type: none"> • głęboka hipoechogeniczność • kształt nieregularny • orientacja nierównoległa • nierówne brzegi/ granice • mikrozwapnienia • ekspansja pozatarczycowa 	>26%	BACC \geq 5mm

Wśród badań dodatkowych pomocnych w diagnostyce TC wymienia się oznaczenie TSH. Przy nieprawidłowej wartości oznaczenia ocenie należy poddać wolną tyroksynę (fT4) lub wolną trijodotyroninę (fT3). Oznaczenie kalcytoniny nie jest zalecane jako rutynowe badanie, jednak znajduje zastosowanie przy klinicznym podejrzeniu raka rdzeniastego tarczycy oraz w przypadku nosicielstwa mutacji RET.

Scyntygrafia tarczycy u osób z wolem guzowatym brana powinna być pod uwagę, jeżeli wartości TSH są bliskie dolnej granicy normy lub poniżej wartości referencyjnej. Wspomniane badanie pozwala na ocenę obszarów autonomicznych w wolu guzkowym i odróżnienie ich od zmian nowotworowych. Scyntygrafia szyi, jak i całego ciała, służy również do oceny doszczętności operacji i jodochwytności guza, oraz znalazła zastosowanie w poszukiwaniu jodochwytnych przerzutów. Izotopem wykorzystywanym w scyntygrafii, ze względu na fakt, iż nie wbudowuje się on w hormony tarczycy, jest izotop technetu (^{99m}Tc). Inne badania z zakresu diagnostyki obrazowej tj. tomografia komputerowa (TK), rezonans magnetyczny (MRI), czy badanie pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) z użyciem 18-fluorodeoksyglukozy (18FDG), nie są rutynowo zalecane przy diagnostyce raka tarczycy.

Zmiany złośliwe rozpoznaje się na podstawie cech klinicznych i ultrasonograficznych. Do cech klinicznych zwiększonego ryzyka złośliwości zaliczamy: obecność przerzutów zarówno do węzłów chłonnych, jak i przerzutów odległych, narażenie na promieniowanie okolicy szyi w wywiadzie oraz rodzinny rak rdzeniasty w wywiadzie. Szybki wzrost nie jest jednoznaczny ze złośliwym charakterem zmiany, jednak podejrzenie raka anaplastycznego jest na tyle poważne, że pilna konsultacja endokrynologiczna jest w tym przypadku wskazana. Do cech złośliwości klinicznej zaliczamy również: obecność

guzka twardego, nieruchomego, o średnicy powyżej 4 cm. Wiek jest kolejnym czynnikiem prognostycznym, albowiem rozpoznanie guzka tarczycy przed 14 r.ż. lub po 70 r.ż. zaliczamy do niekorzystnych czynników predykcyjnych.

BACC jest narzędziem diagnostycznym, będącym podstawą rozpoznania i klasyfikowania nowotworów tarczycy. System Bethesda (tabela 6) zyskał popularność na całym świecie, jego czułość mieści się w przedziale od 65% do 99%, swoistość z kolei jest szacowana pomiędzy 72% a 100% ^[17]. Ta niespójność w wynikach badań nad wartością swoistości i czułości pokazuje, że nie jest to jednak metoda idealna. Biorąc po uwagę, że leczenie chirurgiczne jest leczeniem preferowanym w guzach tarczycy, należy dołożyć wszelkich starań, aby prawdopodobieństwo postawienia niedokładnej diagnozy było jak najmniejsze. Odsetek wyników fałszywie dodatnich sięga 10% z kolei wyników fałszywie ujemnych rozpoznaje się do 14% ^[18]. Tak dość duża rozbieżność w wynikach badań powoduje, że rozpoznania postawionego za pomocą tej techniki coraz częściej nie uznaje się jako pewnego. Zakwalifikowanie zmiany do kategorii III wg. Bethesda pozwala klinicyście na rozważenie operacji jako metody leczenia pod warunkiem, że istnieją czynniki ryzyka zarówno kliniczne jak i ultrasonograficzne. Problemem diagnostycznym pozostaje nowotwór pęcherzykowy, którego rozpoznanie opiera się na kryteriach histologicznych. Wprowadzenie do terminologii nazwy wariantu pęcherzykowego raka brodawkowego (FVPC), czyli terminu „nieinwazyjnego nowotworu pęcherzykowego tarczycy o jądrach komórkowych przypominających raka brodawkowego (NIFTP)” oraz uwzględnienie gruczolaka pęcherzykowego w diagnostyce różnicowej niesie za sobą pewne trudności. Cechy cytologiczne i sporadyczne cechy jądrowe niejednokrotnie nie pozwalają na odróżnienie nowotworu pęcherzykowego od FVPC czy NIFTP, a rozpoznanie stawiane jest zwykle po operacji i uwzględnia cechy takie jak naciekanie torebki guza czy naczyń ^[4, 19, 20]. Słabo zróżnicowane nowotwory tarczycy, które wywodzą się z komórek pęcherzykowych, również nie mogą być rozpoznane ze 100% pewnością w badaniu przedoperacyjnym. Cechy wysokiej jakości, tj. martwica i mitozy, oczywiście można rozpoznać w BACC, jednak inne cechy cytologiczne tracą tu na znaczeniu ^[21]. Stanowi to przesłankę do poszukiwania bardziej swoistego markera różnicującego poszczególne typy nowotworów tarczycy, co pozwoliłoby na zmniejszenie odsetka fałszywie dodatnich rozpoznań i uniknięcie niepotrzebnych interwencji chirurgicznych.

Tabela 6. Proponowana terminologia rozpoznaw w biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC) oparta na 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology

Kategoria według Bethesda	Rekomendowana terminologia według Bethesda	Ryzyko raka, uwzględniające NIFTP w rozpoznaniach pooperacyjnych	Ryzyko raka u polskich chorych	Rozpoznanie wchodzące w skład kategorii i inne uwagi
I	Biopsja niediagnostyczna lub niesatysfakcjonująca	5-10%	5-10%	Należy uwzględnić kontekst kliniczny
II	Zmiana łagodna	0-3%	<1%	Wole guzowate, zapalenie tarczycy, w tym przewlekłe guzki hiperplastyczne w wolu (guzek rozrostowy), guzek koloidowy (jeżeli jest dużo koloidu i wystarczająca liczba komórek) Obraz sugeruje guzek koloidowy (jeżeli jest duża ilość koloidu bez wystarczającej liczby komórek) Torbiel tarczycy
III	Atypia o nieokreślonym znaczeniu/zmiana pęcherzykowa bliżej nieokreślona (AUS/FLUS) wraz z podaniem szczegółowego podtypu	6-18%	2,4-5,2%	Ta kategoria powinna być używana tylko w rzadkich przypadkach, kiedy nie jest możliwe uściślenie rozpoznania cytologicznego
IV	Nowotwór pęcherzykowy lub podejrzenie nowotworu pęcherzykowego	10-40%	19%	Co najmniej 25% zmian w tej kategorii nie okazuje się rozpoznaniem nowotworowym (guzki hiperplastyczne). Kategoria nie jest stosowana, jeżeli są widoczne cechy charakterystyczne dla jąder raka brodawkowatego

V	Podjęcie złośliwości	45-60%	75%	Rozpoznanie obejmuje podejrzenie: <ul style="list-style-type: none"> ▪ raka brodawkowego ▪ raka rdzeniastego ▪ chłoniaka ▪ przerzutu do tarczycy, ▪ raka anaplastycznego/ mięsaka naczyniowego ze względu na obecność martwych tkanek ▪ guza beczkowego szklawicy
VI	Nowotwór złośliwy	94-96%	95-100%	Rozpoznanie obejmuje: <ul style="list-style-type: none"> ▪ raka brodawkowego ▪ raka rdzeniastego, ▪ chłoniaka ▪ przerzuty do tarczycy ▪ raka anaplastycznego/ mięsaka naczyniowego

3. Imprinting genomowy w diagnostyce raka tarczycy

Helen Crouse wraz z zespołem opisał eliminację chromosomu X ojcowskiego u much. Był on pierwszą osobą posługującą się terminem „imprinting”. Nie podlega wątpliwości, że cechy fenotypowe i genomowe poszczególnych jednostek potomstwa dziedziczy po rodzicach. Każdy osobnik łączy materiał genetyczny obojga rodziców, jednak fenotyp jaki jest prezentowany nie zawiera wszystkich cech jednego lub drugiego z rodziców. Procesy jakie odpowiadają za w.w. zjawisko noszą nazwę imprintingu genomowego i należą do mechanizmów regulacji epigenetycznej u ssaków. Wykazano, iż są one niezbędne zarówno do rozwoju zarodkowego jak i pozazarodkowego. Badania koncentrujące się na odkryciu mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko zobrazowały, iż w tym samym jądrze występowały allele wykazujące i niewykazujące ekspresji. Mimo iż działały na nie te same czynniki transkrypcyjne, zachowywały się one inaczej. Wiele z imprintowanych genów bierze udział we wzroście i rozwoju płodu. Odgrywają one również kluczową rolę w rozwoju wielu chorób. Zaburzenia metylacji allelicznego DNA w ICR (imprinting control regions) są związane z wystąpieniem chorób takich jak zespół Beckwitha-Wiedemanna i zespół Silvera-Russella. Również schorzenia, w których dochodzi do zaburzeń neurorozwojowych (tj. zespół Pradera-Wiliego i zespół Angelmana), mają swoją etiologię w zaburzeniach regulacji epigenetycznej. Do procesów, jakie wpływają na ekspresję określonych matczyńskich lub ojcowskich genów,

oprócz wspomnianej metylacji, należy chociażby kowalencyjna modyfikacja histonów i białek niehistonowych. Mechanizmy epigentyczne pozwalają na zrozumienie wielu procesów fizjologicznych i rozwojowych. Pozwalają nam odkryć ważne implikacje dla chorób nie tylko genetycznych, ale również nowotworowych [22, 23, 24].

W chorobach nowotworowych zaobserwowano zjawisko utraty imprintingu (LOI). Skutkuje ono ekspresją obu alleli w danej komórce. Opracowano metodę pozwalającą na znakowanie i wizualizację miejsc transkrypcji imprintingowanych i nieimprintingowanych przy pomocy hybrydyzacji *in situ*. Huixiong Xu i wsp. przy pomocy tej metody identyfikowali geny potencjalnie przydatne w diagnostyce raka: białko wiążące nukleotyd guaniny, locus kompleksu alfa-stymulującego (GNAS), białko związane z receptorem czynnika wzrostu (GRB10) i polipeptyd B małej jądrowej rubonukleoproteiny (SNRPN) oraz antygen zgodności tkankowej (HM13). Przeprowadzili oni badanie, w którym wykorzystano 394 próbki pochodzące z BACC, posiadające już rozpoznane histopatologiczne pooperacyjne. Do zbadania wartości diagnostycznej ekspresji w. w. genów posłużono się techniką ilościowej chromogennej hybrydyzacji *in situ* z imprintowanym genem (QCIGISH). Każda z badanych próbek była poddana analizie cytologicznej, jak i przy pomocy testu QCIGISH zaślepionego na rozpoznanie histopatologiczne i cytologiczne. Test ten obejmował pomiar ekspresji biallelicznej (BAE), ekspresji multiallelicznej (MAE) i całkowitej ekspresji (TE) panelu imprintowanych genów. Analizowano zarówno utrwalone skrawki pooperacyjne, jak i materiał pochodzący z BACC. Analiza ta polegała na liczeniu jąder wykazujących miejsca z lokalizacją badanych genów w mikroskopie świetlnym, ręcznie lub przy pomocy programu komputerowego. Zdefiniowano, że geny SNRPN i HM13, które wykazują imprinting, są najskuteczniejszym biomarkerem raka tarczycy. Przydatność kliniczna modelu QCIGISH w niezależnym zaślepionym prospektywnym badaniu 394 guzów tarczycy została określona na ogólną czułość diagnostyczną 100% i swoistość 91,5%. Ogólna dokładność diagnostyczna wynosiła 97,5% [25].

4. Podsumowanie

Biopsja aspiracyjna cienkoigłowa jest aktualnie złotym standardem diagnostycznym w przypadku podejrzenia raka tarczycy. Jest jednak badaniem posiadającym pewne ograniczenia, dlatego należy intensywnie poszukiwać metody diagnostyki raka tarczycy pozwalającej w sposób pewny postawić

rozpoznanie. Jedną z aktualnie badanych metod jest ilościowa chromogenna hybrydyzacja in situ z imprintowanym genem, czyli „QCIGISH”. Najnowsze dane sugerują, iż wspomniany test cechuje się zarówno wysoką swoistością, jak i czułością. Konieczne jest jednak przeprowadzanie dalszych badań nad skutecznością wspomnianej metody, aby określić jej przydatność w diagnoście raka tarczycy.

Referencje

- [1] Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019;48(1):23-35. doi:10.1016/j.ecl.2018.10.002.
- [2] Nowotwór tarczycy. Krajowy Rejestr Nowotworów. Published September 23, 2021. Accessed March 22, 2023. <https://onkologia.org.pl/pl/nowotwor-tarczycy-czynniki-ryzyka#page-main-image>.
- [3] Vinay Kumar, Abbas AK, Aster JC, et al. *Robbins Patologia*. 10th ed. Edra Urban & Partner, © Copyright; 2019.
- [4] Andrzej Szczeklik, Gajewski P. *Interna Szczeklika 2022.*; 2022.
- [5] Wróblewska J, Marszałek A. Genetyczne podłoże nowotworów tarczycy – wybrane zagadnienia. *Letters in Oncology Science.* 2019;16(1):22-28.
- [6] Zamora EA, Khare S, Cassaro S. Thyroid Nodule. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; September 5, 2022.
- [7] 1.Nowotwór tarczycy. Krajowy Rejestr Nowotworów. Published September 23, 2021. Accessed March 22, 2023. <https://onkologia.org.pl/pl/nowotwor-tarczycy-objawy>.
- [8] Davies L, Morris LG, Haymart M, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY DISEASE STATE CLINICAL REVIEW: THE INCREASING INCIDENCE OF THYROID CANCER. *Endocr Pract.* 2015;21(6):686-696. doi:10.4158/EP14466.DSCR.
- [9] Roman BR, Morris LG, Davies L. The thyroid cancer epidemic, 2017 perspective. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24(5):332-336. doi:10.1097/MED.0000000000003595.

- [10] Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocrine Pathology*. 2022;33(1):27-63. doi:<https://doi.org/10.1007/s12022-022-09707-3>.
- [11] Pawłowski, W. (2020). Czynniki prognostyczne chorób nowotworowych tarczycy u pacjentów operowanych z powodu chorób tarczycy [Rozprawa doktorska niepublikowana].
- [12] Rak tarczycy. Rak.org. Opublikowano w 2018 r. <https://www.cancer.org/cancer/third-cancer.html>.
- [13] Jarzab B, Dedecjus M, Lewiński A, et al. Diagnosis and treatment of thyroid cancer in adult patients — Recommendations of Polish Scientific Societies and the National Oncological Strategy. 2022 Update [Diagnostyka i leczenie raka tarczycy u chorych dorosłych — Rekomendacje Polskich Towarzystw Naukowych oraz Narodowej Strategii Onkologicznej. Aktualizacja na rok 2022]. *Endokrynologia Polska*. 2022;73(2):173-300. doi:<https://doi.org/10.5603/EP.a2022.0028>.
- [14] Nie W, Zhu L, Yan P, Sun J. Thyroid nodule ultrasound accuracy in predicting thyroid malignancy based on TIRADS system. *Adv Clin Exp Med*. 2022;31(6):597-606. doi:10.17219/acem/146776.
- [15] Yeste Fernández D, Vega Amenabar E, Coma Muñoz A, et al. Ultrasound criteria (EU-TIRADS) to identify thyroid nodule malignancy risk in adolescents. Correlation with cyto-histological findings [published online ahead of print, 2021 Apr 19]. Criterios ecográficos (EU-TIRADS) para identificar el riesgo de malignidad de los nódulos tiroideos en adolescentes. Correlación con los hallazgos cito-histológicos [published online ahead of print, 2021 Apr 19]. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*. 2021;S2530-0164(21)00078-1. doi:10.1016/j.endinu.2020.11.009.
- [16] Sigrist RMS, Liao J, Kaffas AE, Chammas MC, Willmann JK. Ultrasound Elastography: Review of Techniques and Clinical Applications. *Theranostics*. 2017;7(5):1303-1329. Published 2017 Mar 7. doi:10.7150/thno.18650.

- [17] Poller DN, Cochand-Priollet B, Trimboli P. Thyroid FNA terminology: The case for a single unified international system for thyroid FNA reporting. *Cytopathology*. 2021;32(6):714-717. doi:<https://doi.org/10.1111/cyt.13017>.
- [18] Malheiros DC, Canberk S, Poller DN, Schmitt F. Thyroid FNAC: Causes of false-positive results. *Cytopathology*. 2018;29(5):407-417. doi:<https://doi.org/10.1111/cyt.12575>.
- [19] Kapur U, Wojcik EM. Follicular neoplasm of the thyroid—vanishing cytologic diagnosis? *Diagnostic Cytopathology*. 2007;35(8):525-528. doi:<https://doi.org/10.1002/dc.20676>.
- [20] Bennett J. ClinicalKey. *Clinicalkey.com*. Published 2020. <https://www.clinicalkey.com/#>.
- [21] Saglietti C, Onenerk AM, Faquin WC, Sykietis GP, Ziadi S, Bongiovanni M. FNA diagnosis of poorly differentiated thyroid carcinoma. A review of the recent literature. *Cytopathology*. 2017;28(6):467-474. doi:10.1111/cyt.12497.
- [22] Tucci V, Isles AR, Kelsey G, et al. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell*. 2019;176(5):952-965. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.043>.
- [23] Bartolomei MS, Oakey RJ, Wutz A. Genomic imprinting: An epigenetic regulatory system. *PLOS Genetics*. 2020;16(8):e1008970. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008970>.
- [24] Keverne EB. Genomic imprinting, action, and interaction of maternal and fetal genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(22):6834-6840. doi:10.1073/pnas.1411253111.
- [25] Xu H, Zhang Y, Wu H, et al. High Diagnostic Accuracy of Epigenetic Imprinting Biomarkers in Thyroid Nodules. *J Clin Oncol*. 2023;41(6):1296-1306. doi:10.1200/JCO.22.00232.

Mikrogravitacja jako możliwość terapii chorób nowotworowych na przykładzie raka płuca

Paweł Krupa¹, Natalia Krauzowicz¹, Zuzanna Kolanko¹,
Julia Konieczny², Kinga Krzywonos¹, Kinga Krasoń¹

1. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
2. Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Opisowej i Topograficznej, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Rak płuca jest obecnie najczęstszą nowotworową przyczyną śmierci oraz drugą najczęściej wykrywaną złośliwą chorobą nowotworową zaraz po nowotworze piersi. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization WHO), w 2020 roku rak płuca przyczynił się do 1.8 miliona zgonów na świecie. Liczba ta jest dwukrotnością liczby zgonów spowodowanych rakiem jelita grubego i odbytu (916 000 zgonów), który w powyższej klasyfikacji zajmuje miejsce drugie. Mikrogravitacja jako metoda oddziaływania na komórki nowotworowe płuca przedstawia szereg zależności, które mogą być wykorzystane w kreowaniu przyszłych terapii raka płuca. Celem tej pracy jest zwrócenie uwagi na badania przedstawiające wpływ mikrogravitacji na zmiany w proliferacji, apoptozie oraz migracji komórek nowotworowych, przedstawienie wpływu mikrogravitacji na organizm człowieka oraz wykorzystywanych urządzeń stosowanych do stworzenia warunków symulowanej mikrogravitacji.

Słowa kluczowe: symulowana mikrogravitacja, rak płuca, gruczolakorak, rak kolczystokomórkowy

Abstract: Lung cancer is the most common cause of cancer deaths and the second most frequently diagnosed malignant cancer disease after breast cancer. According to the World Health Organization (WHO), in 2020 lung cancer was the cause of 1.8 million deaths, which is double the second place, which is colon and rectum cancer (916,000 deaths). Microgravity as a method of influencing lung cancer cells presents a number of effects that can be used in the creation of future therapies for lung cancer. The aim of this work is to draw attention to research showing the impact of microgravity on changes in the proliferation, apoptosis and migration of cancer cells, to present the impact of microgravity on the human body and the devices used to create simulated microgravity conditions.

Keywords: simulated microgravity, lung cancer, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma

1. Wstęp

Nowotwory złośliwe są jedną z głównych przyczyn zgonów ludzi na świecie. Nowotwory płuca, krtani i oskrzeli w latach od 2000 do 2019 szczególnie zwiększyły swój udział jako przyczyna zgonów z 1.2 miliona do 1.8 miliona wśród populacji światowej oraz są klasyfikowane jako 6 najczęstsza przyczyna śmierci na świecie ^[1]. Rak płuca jest drugim najczęściej występującym nowotworem wśród mężczyzn w Polsce. W tej populacji stanowi również dominującą nowotworową przyczynę zgonów wynoszącą ok. 26%. Statystyki dla kobiet przedstawiają się podobnie, gdzie rak płuca jest drugim najczęściej występującym nowotworem oraz najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworu złośliwego, wynosząc 17,6% wśród kobiet w Polsce ^[2]. Trendy w populacji polskiej odzwierciedlają trendy w populacji światowej, gdzie rak płuca stanowi 18% wszystkich zgonów spowodowanych nowotworami, a u osób powyżej 65 roku życia wynosi aż 65% [3,4,5]. Histologicznie nowotwory płuca, są dzielone na dwa główne typy: drobnokomórkowy rak płuca (ang. small cell lung cancer SCLC) oraz niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. non-small cell lung cancer NSCLC). Przypadki SCLC, są rzadsze stanowiąc 12-15% zachorowań. Jest on jednak agresywniejszy oraz szybciej rozprzestrzenia się na sąsiednie tkanki poprzez metastazę, w porównaniu do NSCLC stanowiącego aż do 85% wszystkich nowotworów płuca [4,6]. NSCLC można grupować na trzy podtypy: gruczolakorak (adenocarcinoma) stanowiący 50% NSCLC, rak kolczystokomórkowy (squamous cell carcinoma) - (30%) oraz rak wielkokomórkowy (arge cell carcinoma) 10% ^[3,7]. Biorąc pod uwagę powszechność nowotworów płuca konieczne jest ciągłe poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych, a jednym z nich wydaje się być medycyna kosmiczna, a uściślając zastosowanie jej w terapii mikrograwitacji. W tej pracy przedstawione zostaną powyższe zagadnienia. Niezbędne, są jednak dalsze badania, które pozwolą szczegółowo zaplanować innowacyjną formę leczenia i uniknąć ewentualnych negatywnych skutków.

2. Obecne metody leczenia raka płuc

Obecnie stosowane metody leczenia raka płuca są zależne od jego typu oraz stopnia zaawansowania. W przypadku NSCLC w pierwszym lub drugim stadium, jeśli pacjent spełnia wymogi, proponowany jest zabieg chirurgiczny w celu usunięcia zmiany. Gdy pacjent nie kwalifikuje się do przeprowadzenia operacji, wykonuje się stereotaktyczną radioterapię lub inne metody lokalnej

terapii ablacyjnej (celowe uszkodzenie tkanek częstotliwościami radiowymi; krioterapia) [8]. W sytuacji, gdy nie ma przeciwwskazań standardem jest stosowanie chemioterapii adjuwantowej w stadium drugim po całkowitym usunięciu nowotworu. Stadium trzecie zazwyczaj wymaga chemioterapii lub chemioradioterapii razem z usunięciem operacyjnych nowotworów. Jeśli stan pacjenta na to pozwala, zabiegi te preferencyjnie przeprowadzane są jednocześnie. Terapie przerzutów NSCLC obejmują szeroki zakres metod leczenia takich jak chemioterapia, immunoterapia oraz ukierunkowane leki molekularne. Leczenie SCLC opiera się głównie na chemioradioterapii, czasem możliwe jest również przeprowadzenie zabiegu chirurgicznego usunięcia zmiany nowotworowej. Przerzuty cechują się wysoką zjadliwością SCLC oraz szybką metastazą. Leczone są poprzez chemioterapię, która może być wzbogacona o immunoterapię lub radioterapię [6,7].

3. Medycyna kosmiczna

Fascynacja kosmosem towarzyszy ludzkości od wieków. Jednak na samej fascynacji powiązanie człowieka z przestrzenią pozaziemską się nie skończyło, a wraz z rozwojem technologii, realna stała się możliwość lotów kosmicznych.

4 października 1957 roku, a więc 66 lat temu, Rosja zdecydowała się na wystrzelenie pierwszego sztucznego satelity w kosmos (Sputnik-1). Lot pierwszej żywej istoty, jaką był pies Łajka, przypadł na 3 listopada 1957 roku. Natomiast pierwszym człowiekiem w kosmosie został Yuri Alekseyevich Gagarin (1934–1968), którego wyniesiono na niską orbitę okołozemską 12 kwietnia 1961 roku przy użyciu rakiety R-7. Za sprawą powyższego wydarzenia możliwe stało się postawienie pierwszego kroku na Księżycu w 1969 roku przez Neila Armstronga [9,10].

Obecnie Narodowa Agencja Aeronautyki i Przestrzeni Kosmicznej (ang. National Aeronautics and Space Administration NASA) stara się sprostać wyzwaniom związanym z życiem w warunkach pozaziemskich. Opracowanie skutecznych systemów wspierania potrzeb życia człowieka, usuwania śmieci czy też wykorzystywania określonych zasobów pozwoli m.in. na rozwinięcie stałego pobytu ludzi na Księżycu. Na skutek skolonizowania naturalnego satelity Ziemi, zrodzą się nowe możliwości zarówno ekonomiczne, jak i naukowe, a ludzkość będzie mogła przygotować się do eksploracji Marsa, testując innowacyjne technologie w warunkach panujących na Księżycu [11,12].

Na pojęcie medycyny kosmicznej składają się wszelkie zachowania pozwalające na zapobieganie chorobom w trudnych warunkach pozaziemskich,

m.in. badania przesiewowe, świadczenie opieki zdrowotnej oraz utrzymanie sprawności fizycznej astronautów ^[13]. Wśród wyżej wymienionych, fundamentalną rolę pełnią badania przesiewowe, ponieważ aktualnie stanowią najskuteczniejszą metodę minimalizowania zagrożeń fizjologicznych w postaci chorób, które są trudne do opanowania w trakcie trwania długoterminowych lotów kosmicznych ^[14,15].

W związku z rozwojem inżynierii kosmicznej, a więc i wydłużeniem czasu misji kosmicznych, wzrosło zapotrzebowanie na wykonywanie czynności medycznych, dlatego konieczna staje się obecność personelu medycznego również wśród załogi. Według Międzynarodowej Stacji Kosmicznej (ang. International Space Station ISS) standardy mówią o wymogach dotyczących jednego przypisanego oficera medycznego na każdą trzy osobową załogę. Natomiast według NASA podczas trwania misji planetarnych przekraczających 210 dni wymagana jest obecność odpowiednio wyszkolonego lekarza wybranego przez rząd federalny ^[16].

4. Mikrograwitacja

Podczas pobytu w przestrzeni kosmicznej na człowieka oddziałują różnorodne czynniki, m.in. mikrograwitacja, napromieniowanie oraz dekompresja. Dlatego też podczas prowadzenia badań na ISS warunki środowiskowe są ściśle kontrolowane, a jakiegokolwiek zmiany natychmiast odnotowywane ^[10,17].

4.1. Definicja mikrograwitacji

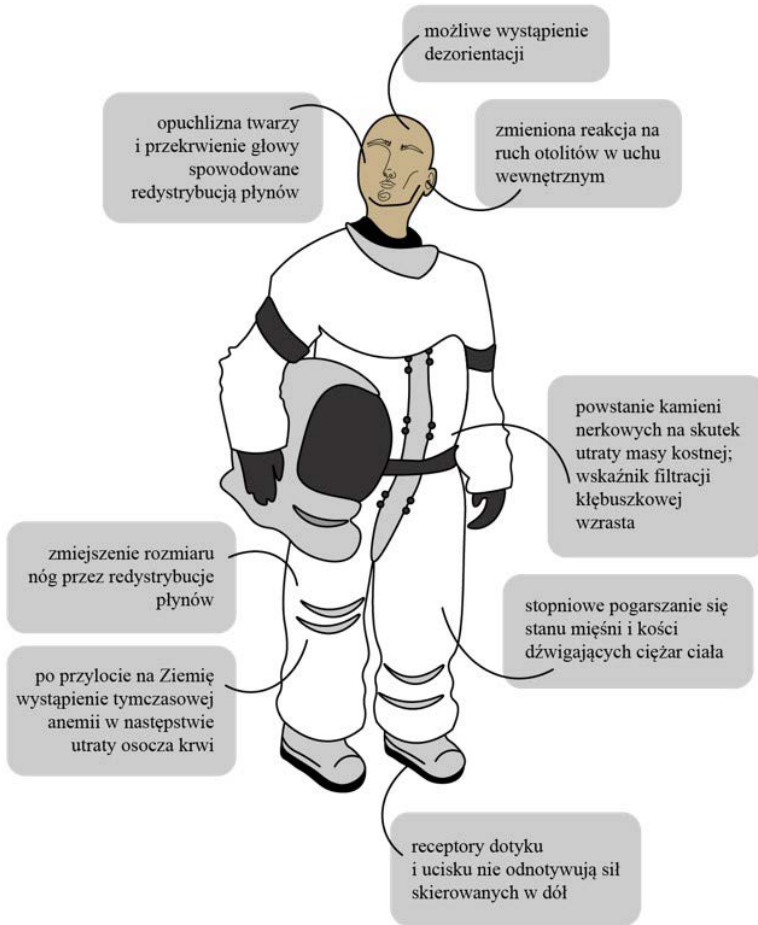
Grawitacja jest siłą, przyciągającą do siebie dwa ciała, np. człowieka i Ziemię, której wielkość warunkuje masa wymienionych ciał oraz odległość między nimi. Mianem „normalnej grawitacji” (1g) określamy przyspieszenie obiektu o wartości $9,8\text{m/s}^2$, które podyktowane jest jedynie przez grawitację w bliskiej odległości od Ziemi. Natomiast „grawitacją zerową” (0g), a uściślając mikrograwitacją (1×10^{-6} g.) jest stan nieważkości, czyli swobodnego spadania. Porównując 1g z mikrograwitacją można dojść do wniosku, iż obiekty w przypadku mikrograwitacji nie spadają w kierunku Ziemi, lecz wokół planety. Krótkotrwały stan nieważkości na Ziemi można osiągnąć np. w trakcie korzystania z kolejek górskich ^[18].

4.2. Wpływ lotów kosmicznych na organizm człowieka

Podczas obecności człowieka w przestrzeni kosmicznej oddziałuje na niego m.in. mikrograwitacja. Niesie to ze sobą szereg znaczących zmian w organizmie. Część z nich pomaga w adaptacji do środowiska, jednak niektóre są zdecydowanie niekorzystne ^[14]. Astronautów przebywających na długotrwałych misjach kosmicznych dotyczą różnorodne schorzenia (rycina 1). Mogą pojawić się zaburzenia w funkcjonowaniu narządu wzroku, np. SANS (ang. spaceflight associated neuro-ocular syndrome), który jest diagnozowany u 15% członków załogi kosmicznej, obejmuje jedno-, bądź obustronny obrzęk tarczy nerwu wzrokowego oraz spłaszczenie gałek ocznych. Występuje zwiększenie ciśnienia wewnątrzczaszkowego, problemy związane z układem sercowo-naczyniowym, mięśniowym (zaniki mięśni, w tym także mięśnia sercowego), choroba lokomocyjna, czy też problemy z orientacją. Układ odpornościowy nie reaguje odpowiednio na infekcje, co wynika m.in. ze zmienionej funkcji granulocytów oraz monocytów, zaburzenia schematów powstawania cytokin, hamowania komórek NK, sygnalizacji wewnątrzkomórkowej komórek T i reakcji nadwrażliwości. W związku z tym wzrasta ryzyko rozwoju infekcji. Astronaucci doznają także utraty masy kostnej nawet w większym stopniu, niż kobiety po przejściu menopauzy. Do możliwych skutków lotów kosmicznych należy doliczyć również zwiększone ryzyko zaćmy oraz wystąpienia raka, które, są skutkami działania promieniowania ^[19,20,21,22].

Mikrograwitacja oraz promieniowanie są czynnikami ściśle ze sobą powiązanymi, które mają bezpośredni wpływ na człowieka w trakcie przebywania w przestrzeni kosmicznej. Dowiedziono, że na poziomie molekularnym, są odpowiedzialne za negatywne oddziaływanie na integralność DNA, w wyniku którego komórki były zmuszone rozwinąć system pozwalający na naprawę uszkodzeń ^[23]. Należy pamiętać, że inne czynniki obecne w kosmosie również mogą mieć wpływ na podane zjawisko, jak np. pył mineralny znajdujący się na powierzchni ciał niebieskich, którego wdychanie podwyższa poziom reaktywnych form tlenu (RFT). Może to indukować stres oksydacyjny, stan zapalny, bądź apoptozę ^[24]. Nie wykazano jednak bezpośredniego wpływu historycznie występujących dawek promieniowania kosmicznego na wzrost śmiertelności podczas badania przeprowadzonego na amerykańskich astronautach oraz rosyjskich kosmonautach ^[25]. Natomiast przeprowadzone eksperymenty udowadniają, iż symulowana mikrograwitacja (ang. simulated microgravity SM) ma wpływ na szlaki regulujące długowieczność, takie jak insulina/IGF-1 i sygnalizacja sfingolipidowa. W trakcie badania na nicieniach

Caenorhabditis elegans zauważono obniżenie poziomu szlaku sfingolipidowego, co z kolei świadczy o prawdopodobnym wzroście długowieczności [26]. Odkrycie to daje nadzieję na przyszłość, konieczne, są jednak dalsze badania.



Rycina 1. Reakcja ludzkiego organizmu na przebywanie w przestrzeni kosmicznej w trakcie lotu [opracowanie własne]^[14].

5. Badania w środowisku mikrograwitacji

Badania w środowisku mikrograwitacji prowadzone są zarówno na ISS, jak i na Ziemi. Na ISS wymagają dużego nakładu finansowego, a co więcej w kosmosie trudno jest odróżnić skutki promieniowania od mikrograwitacji. Pozwalają jednak na długoterminową hodowlę komórek w środowisku

mikrogravitacji. Na ISS znajduje się kilka aparatów umożliwiających prowadzenie prac badawczych. Europejczycy zobowiązani są do utrzymywania „BIOLAB”, który jest obiektem znajdującym się w Europejskim Laboratorium „Columbus” oraz „KUBIK” pełniące rolę samodzielnej placówki ^[21].

Na Ziemi można wytworzyć symulowaną mikrogravitację za pomocą specjalnie do tego przystosowanych urządzeń, takich jak klinostaty 2D, klinostaty 3D czy też maszyny do losowego pozycjonowania. Jednak nie jest to idealne odwzorowanie warunków kosmicznych ^[21,27].

W Centrum Kosmicznym imienia Johna F. Kennedy’ego (Kennedy Space Center KSC) na Florydzie w Stanach Zjednoczonych znajduje się Ośrodek Wsparcia Symulacji Mikrogravitacji (ang. Microgravity Simulation Support Facility MSSF). Utworzony został on w celu prowadzenia prac badawczych z wykorzystaniem SM, których okres trwania nie przekracza zazwyczaj jednego miesiąca. KSC daje możliwość m.in. badań w warunkach kontrolowanego środowiska po umieszczeniu symulatorów grawitacji w specjalnie do tego celu przystosowanych komorach, co pozwala na sterowanie i monitorowanie parametrów takich jak wilgotność, światło, stężenie dwutlenku węgla lub temperatura ^[28,29].

5.1. Klinostaty 2D

Klinostat 2D jest urządzeniem przeznaczonym do badania mniejszych objętości i komórek, które posiada jedną oś obrotu. Rotacja wykonywana jest w sposób ciągły ze stałą prędkością i kierunkiem. Prędkość ta musi być wyśrodkowana, nie może być zbyt wolna, ani zbyt szybka. Istnieje taka konieczność, ponieważ zbyt wolna przyczynia się do zajścia zjawiska sedymentacji, a zbyt szybka jest odpowiedzialna za wirowanie. Kiedy jest ona właściwa, ruch jednostronny nie występuje, zatem nie dochodzi również do sedymentacji cząstek. W celu zminimalizowania działania przyspieszenia odśrodkowego, próbki o małych wymiarach są układane w jak najbliższej odległości od osi obrotu. W przypadku zbliżenia się do prędkości bez obecności jednokierunkowego bodźca, który oddziałuje na komórki, eksponowane systemy będą poddane działaniu mikrogravitacji ^[21].

5.2. Klinostaty 3D i maszyny do losowego pozycjonowania (ang. 3D Clinostats and Random Positioning Machines RPM)

Po dodaniu drugiej osi obrotu do klinostatu 2D w Japonii i Holandii opracowano klinostat 3D. Posiada on identyczną konstrukcję mechaniczną względem RPM oraz jest również maszyną naziemną. Cechę pozwalającą na zróżnicowanie stanowi odmienne działanie osi obrotu. Klinostat 3D charakteryzuje się obrotami ze stałym kierunkiem i prędkością, natomiast osie RPM obracają się zarówno z losowymi prędkościami, jak i kierunkami. Jest to ściśle skoordynowane z zaawansowanym programem komputerowym. Zasada działania obu urządzeń opiera się na uśrednieniu wpływu grawitacji oraz próbie zbliżenia jej działania do zera w czasie. RPM jest używany zazwyczaj do badania powolnych procesów, ponieważ rotacja ramek budujących urządzenie musi być szybsza, niż badany proces biologiczny. Wektor grawitacji zmienia wtedy ciągle swoją orientację. Skutkuje to utratą poczucia kierunku przez komórki poddane badaniu. W związku z tym, są one w stanie zbliżonym do mikrogravitacji. Wyżej wspomniana rotacja nie może być jednak za szybka, ze względu na działanie sił odśrodkowych [21,30,31]. Zarówno klinostat 3D, jak i RPM dla komórek, roślin i muszek owocowych, znacznie usprawniły prowadzenie badań naukowych oraz doświadczeń związanych z kosmosem [32].

5.3. Bioreaktory membranowe obrotowe lub obrotowy system hodowli komórkowej (ang. Rotating Wall Vessel (RWV) or Rotating Cell Culture System (RCCS) bioreactor)

RWV działa na tej samej zasadzie co klinostat 2D. Pierwsze tego typu urządzenie zostało stworzone przez NASA. Charakteryzuje się brakiem sedymentacji komórek oraz mikroorganizmów w czasie obrotu płynu, co pozwala na wykorzystanie RWV w roli naziemnego symulatora mikrogravitacji. Zbudowany jest z obracającego się prostopadle do ziemskiego wektora grawitacji cylindra, którego pierwotne wymiary średnicy wynosiły 20cm [21,33].

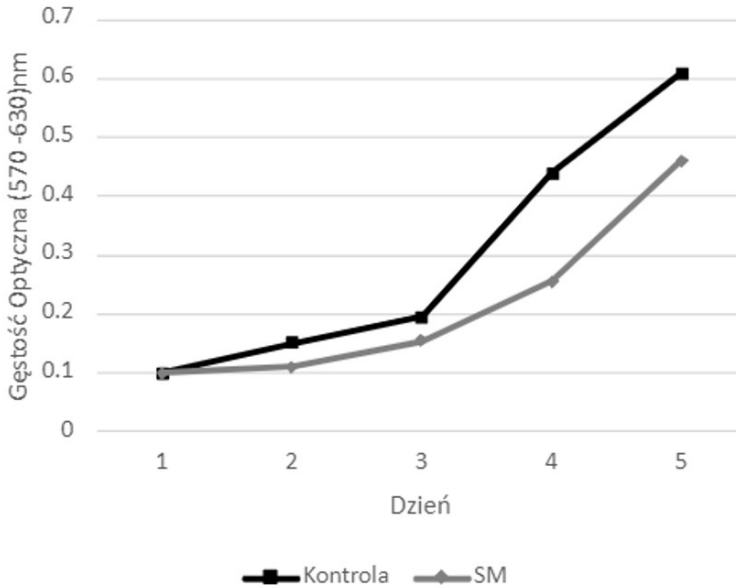
6. Wpływ mikrogravitacji na linie komórek ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc A549 oraz H1703

Jednym z głównych linii komórkowych NSCLC są komórki A549 oraz H1703. Komórki A549 są triploidalną ludzką linią komórek podstawowych nabłonka pęcherzyków płucnych. Stanowią one szeroko wykorzystywany

model badawczy gruczolakoraka (adenocarcinoma) płuca^[3]. Komórki H1703, są komórkami pochodzenia nabłonkowego raka płaskonabłonkowego płuca (squamous cell carcinoma)^[34,35]. W przytoczonych badaniach wykazano wpływ mikrogravitacji na proliferację, metastazę, cykl komórkowy, ekspresję genów, mitochondria oraz miRNA komórek A549 oraz H1703^[36].

Poziom proliferacji komórek nowotworowych w raku płuca, tak jak w każdej chorobie nowotworowej, ma znaczny wpływ na rokowania pacjenta. Badania wykonane przez De Chang'a i współ. dają obiecujące rezultaty w zmniejszaniu procesu proliferacji gruczolakoraka płuca w środowisku symulowanej mikrogravitacji. W badaniu tym wykorzystano komórki linii A549, które poddano działaniu mikrogravitacji zasymulowanej za pomocą klinostatu. Do stwierdzenia poziomu proliferacji użyto testu kolometrycznego MTT assay, a badane komórki obserwowano przez 5 dni. W rezultacie zaobserwowano znaczący spadek tempa proliferacji komórek A549 w porównaniu do próby kontrolnej (wykres 1)^[37]. Wyniki potwierdziły się w badaniach Degan i współ., gdzie zaobserwowano redukcję proliferacji komórek A549 w warunkach SM w stosunku do próby kontrolnej w odstępach czasowych 24, 36 i 48 godzin. Badanie wykazało również związek zmniejszonej proliferacji z progresywną akumulacją komórek w fazie G1 i G2 cyklu komórkowego^[3]. Redukcję w proliferacji powiązano również ze zwiększoną aktywnością genów CDKN2A, PTEN, RB1 oraz SOX2, które pełnią ważną rolę w cyklu komórkowym, procesie apoptozy oraz różnicowaniu NSCLC^[38]. W przypadku tych badań największą różnicę w potencjale proliferacyjnym zaobserwowano w 48 i 72 godzinie badania^[39]. Jednocześnie pomimo zanotowanego spadku w liczbie komórek rakowych w warunkach SM^[40], niektórzy badacze nie wiążą tego bezpośrednio z wpływem zmian w grawitacji na proliferację komórek. Łączą to jednak z pogorszeniem w zdolnościach adhezyjnych komórek nowotworu. Do takiego wniosku doszli Ahn i współ., którzy w badaniu z wykorzystaniem RPM, obserwowali proliferację komórek linii A549 i H1703 po 24 i 48 godzinach. W badaniu tym zanotowano różnicę w liczbie komórek testowanych w warunkach SM w porównaniu do warunków kontrolnych. Liczba komórek A549 i H1703 w SM była niższa. Jednocześnie, porównując obie linie komórek, odnotowano zwiększoną zdolność proliferacyjną w przypadku linii A549 w stosunku do linii H1703 zarówno w próbie badanej jak i w próbie kontrolnej^[41]. Natomiast wg. Badań Chung i współ. mikrogravitacja zasymulowana przy wykorzystaniu klinostatu nie wpływa na proliferację w przypadku linii A549 (2.267 ± 0.010) w porównaniu do próby kontrolnej (2.271 ± 0.020), jednak znaczący spadek w proliferacji zaobserwowano tylko

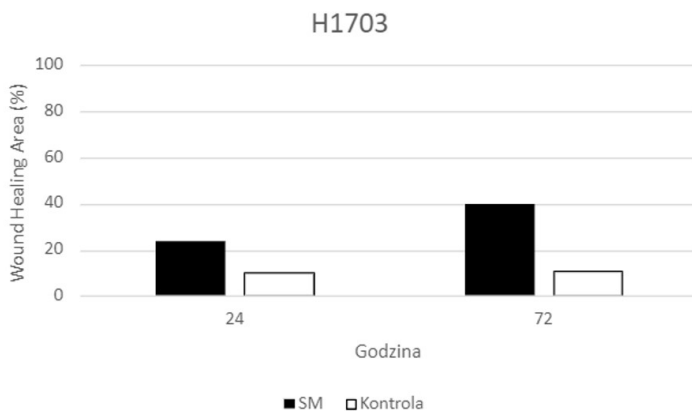
w linii H1703 gdzie dla próby badanej wynosił (0.534 ± 0.021) a w próbie kontrolnej (1.082 ± 0.021) [42].



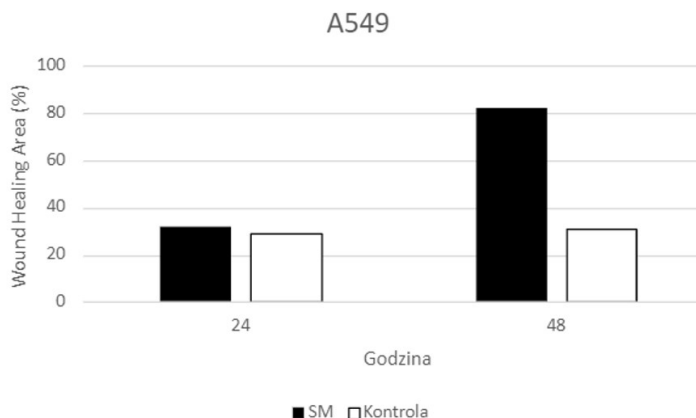
Wykres 1. Wpływ SM na aktywność żelatynolityczną i proliferację w Komórki A549, przy wykorzystaniu żelatynolitycznego zestawu do oznaczania aktywności MMP [opracowanie własne] [37].

Regulacja metastazy, czyli zdolności do tworzenia przerzutów poprzez migrację komórek nowotworowych, jest jednym z głównych indykatorów złośliwości nowotworu. Zdolność metastazy jest powiązana ze zdolnościami do proliferacji [43] oraz jest kolejną cechą komórek nowotworowych raka płuca badaną w metodach z wykorzystaniem mikrograwitacji. Jedną z metod badania zdolności do tworzenia przerzutów oraz migracji komórek nowotworowych jest badanie zdolności leczenia rany (wound healing assay). Pozwala ono porównać szybkość rozprzestrzeniania się badanych komórek w stosunku do próby kontrolnej [44]. W badaniu Changa i współ. przy użyciu tej metody, wzbogaconej o zmienną w postaci obecności mikrograwitacji, zaobserwowano zmniejszenie zdolności metastazy oraz migracji komórek linii A549. Wnioski wskazujące na zmniejszenie metastazy potwierdzono badając migrację komórek przy wykorzystaniu metody komory Boydena. Opis tego eksperymentu możemy znaleźć w pracy Dietza i współ., którzy w swoim badaniu nad wpływem mikrograwitacji na raka płuca zaobserwowali zwiększenie ekspresji genu TP53, który z kolei wpływa na integrynę $\alpha 5\beta 1$ oddziałującą na zdolność

do metastazy nowotworu [39]. Następne badania również potwierdzają wnioski Changa i współ., jednak jako przyczynę podają zwiększenie ekspresji nabłonkowej E-kadheryny oraz zmniejszenie ekspresji mezenchymatycznej N-kadheryny w komórkach linii A549 [45]. Taką zmianę w ekspresji powiązano z zahamowaniem przejścia komórek z niemigracyjnego fenotypu epitelialnego do migracyjnego i inwazyjnego fenotypu mezenchymalnego [46]. Inne badania wykazały, że SM, w przeciwieństwie do przytoczonych wcześniej badań, promuje metastazę poprzez zwiększoną migrację. Zjawisko to powiązano z nasiloną ekspresją metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP) - MMP-2 i MMP-9, oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz TIMP-1 i TIMP-2, których regulacja wpływa na stopień inwazyjności nowotworu płuca [47]. Ahn i współ. dla linii komórek A549 oraz H1703 w badaniu scratch assay wykazali zmniejszenie zagęszczenia komórek w porównaniu z próbą kontrolną. Natomiast pole wolne od komórek (ang. wound healing area) w próbie kontrolnej było mniejsze o ok. 10% po 24 godzinach oraz o ok. 62% mniejsze po 48 godzinach w porównaniu do próby z linią komórek A549. Dla linii H1703 wartości te wynosiły ok. 58% po 24 godzinach oraz ok. 72,5% mniejszego zaobserwowanego pola w porównaniu z próbą kontrolną (wykres 2 i 3) [41]. Podobne wyniki otrzymano w badaniu Chung i współ., gdzie dla komórek linii 549 wykonano badanie scratch assay. Pole wolne od komórek w próbie kontrolnej po 36 godzinach było o 42,3% większe, niż w próbie badanej. Natomiast w przypadku linii H1703 zaobserwowano zwiększenie się o 58,8% strefy wolnej od komórek w próbie kontrolnej w stosunku do próby badanej po 36 godzinach [42]. Eksperymenty te stanowią podstawę do dalszych badań nad migracją komórek nowotworowych oraz powstawaniem przerzutów.



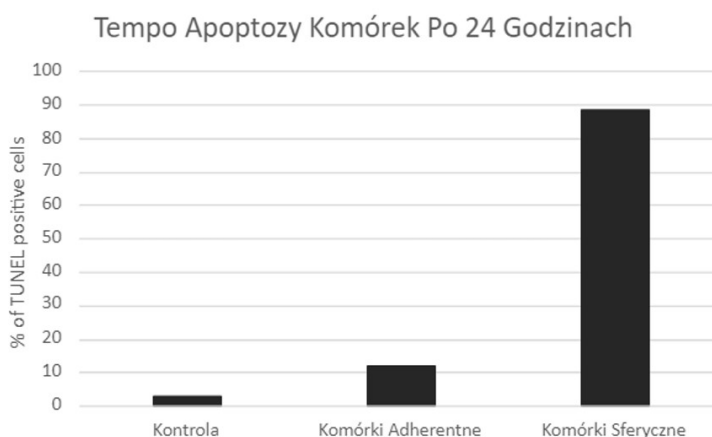
Wykres 2. Analiza Wound Healing Assay komórek A549 w warunkach kontrolnych oraz SM [opracowanie własne] [41].



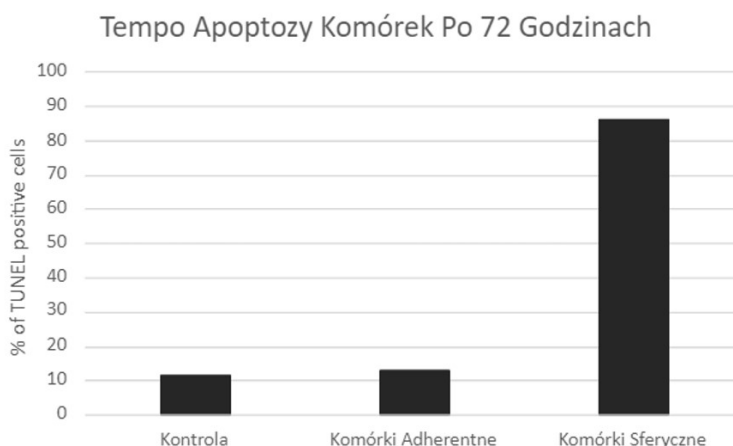
Wykres 3. Analiza Wound Healing Assay komórek H1703 w warunkach kontrolnych oraz SM [opracowanie własne] ^[41].

Wzmożenie apoptozy jest kolejną zmianą zaobserwowaną podczas badań wpływu mikrogravitacji na komórki nowotworowe płuca. W linii komórek H460 NSCLC po poddaniu działaniu SM wytworzonej przy pomocy RPM zaobserwowano wzrost w tempie apoptozy po 24 godzinach do $145.95 \pm 37.2\%$ w porównaniu do próby kontrolnej. Badanie to wykazało również, że komórki macierzyste tej linii komórek nowotworowych tracą swoją zdolność różnicowania po ekspozycji na SM. Zjawisko to zbadano przy wykorzystaniu pomiarów w aktywności ALDH – markeru w badaniach komórek macierzystych nowotworów ^[48]. Wyniki wykazały spadek w aktywności ALDH - $44.8 \pm 8.4\%$ po 24 godzinach oraz $45.3 \pm 5.6\%$ po 48 godzinach. Wnioski eksperymentu potwierdzono wykorzystując badanie ekspresji genów Oct-4 i Nanog, które wykorzystuje się jako markery w badaniach nad nowotworami ^[49]. Jednocześnie zaobserwowano, że efekty wywołane przez ekspozycję na SM na linii komórek H460 utrzymały się po zakończeniu badań i po powrocie komórek do warunków normalnych ^[50,51]. Kolejne badania nad komórkami NSCLC raka płuca poddanymi działaniu SM wskazują podobne wnioski zwiększenia intensywności apoptozy. W podanym badaniu wykorzystano dwa sposoby hodowania kultur komórek - hodowane w sposób konwencjonalny, dwuwymiarowy uzyskując w ten sposób kolonie adherentne komórek oraz hodowane na mikronośnikach, w sposób trójwymiarowy. W związku z tym uzyskano kolonie sferoidalne komórek. W przeprowadzonym teście TUNEL-assay, który jest badaniem używanym do wykrywania oraz zliczania komórek apoptycznych, po 24 godzinach działania SM

zaobserwowano wzrost intensywności apoptozy (% of TUNEL positive cells). Dla komórek adhezyjnych wynosiła 12%, a w sferycznych 88.6%. W próbie kontrolnej odnotowano tylko 2.8%. (wykres 4) Po 72 godzinach dane przedstawiły się następująco: zaobserwowany proces apoptozy wynosił 13.1% komórek adhezyjnych, 86.4% komórek sferoidalnych, a w próbie badane 11.4% komórek. (wykres 5) Wyniki te powiązano z odnotowaną podczas badań zwiększoną ekspresją nowotworowych genów supresorowych TP53, CDKN2A, PTEN oraz RB1. Kolejnym zjawiskiem mogącym mieć wpływ na zwiększenie apoptozy w środowisku symulowanej mikrogravitacji jest zaobserwowana alteracja w aranżacji filamentów aktynowych cytoszkieletu z formy podłużnej do formy sferycznej ^[39,51].



Wykres 4. Analiza badania TUNEL assay wykazującego tempo apoptozy po 24 godzinach [opracowanie własne] ^[39].



Wykres 5. Analiza badania TUNEL assay wykazującego tempo apoptozy po 72 godzinach [opracowanie własne] ^[39].

7. Dyskusje

Medycyna kosmiczna to innowacyjna oraz prężnie postępująca dziedzina nauki. Za sprawą jej rozwoju znacznie poszerza się zakres wiedzy współczesnej medycyny na tematy wykraczające poza granice naszej planety.

Czynniki pozaziemskie, a w szczególności grawitacja i jej zminimalizowany efekt doświadczany pod postacią mikrogravitacji wpływają na fizjologię komórek człowieka. Oddziaływanie dotyczy zarówno prawidłowych jak i nowotworowych komórek w organizmie ludzkim. Wyniki badań wskazują istotny wpływ mikrogravitacji na komórki raka płuca w postaci m.in. zmniejszenia proliferacji, zwiększenia apoptozy oraz zwiększenia ekspresji genów supresorowych nowotworu. Pozwala to na nadzieję, iż wpływ mikrogravitacji umożliwi zahamowanie wzrostu nowotworu płuca, bądź nawet doprowadzi do jego regresji, a w konsekwencji możliwe będzie wprowadzenie terapii z użyciem SM do użytku codziennego. Istnieje jednak konieczność dalszego prowadzenia badań nad mikrogravitacją, aby móc dalej rozwijać wiedzę na jej temat oraz uniknąć możliwych negatywnych efektów jej działania. Szczególnie ważne jest szczegółowe określenie wpływu SM na nowotwory.

Referencje

- [1] World Health Organisation. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Opublikowano: 09.12.2020. Dostęp: 20.02.2023.
- [2] Urszula Wojciechowska, Klaudia Barańska, Irmina Michałek, Paweł Olasek, Marta Miklewska, Joanna A. Didkowska; Nowotwory Złośliwe W Polsce W 2020 Roku; Krajowy Rejestr Nowotworów Warszawa 2022.
- [3] Degan P, Cortese K, Pulliero A, et al. Simulated Microgravity Effects on Human Adenocarcinoma Alveolar Epithelial Cells: Characterization of Morphological, Functional, and Epigenetic Parameters. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6951. Published 2021 Jun 28. doi:10.3390/ijms22136951.
- [4] Berghmans T, Lievens Y, Aapro M, et al. European Cancer Organisation Essential Requirements for Quality Cancer Care (ERQCC): Lung cancer. *Lung Cancer.* 2020;150:221-239. doi:10.1016/j.lungcan.2020.08.017.

- [5] Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;25(3):439-445. doi:10.1016/j.soc.2016.02.001.
- [6] Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Lung Cancer. *Med Clin North Am*. 2019;103(3):463-473. doi:10.1016/j.mcna.2018.12.006.
- [7] Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol*. 2018 Oct;52(Pt 1):103-109. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.019. Epub 2017 Nov 26.
- [8] Bednarski J, Pawlicka M, Bałabuszek K, Mroczek A. Postępy w diagnostyce medycznej. Metody ablacji i ich znaczenie we współczesnej medycynie. <http://ipkn.edu.pl/wp-content/uploads/2020/09/Post%C4%99py-w-diagnostyce-medycznej.pdf#page=41> Dostęp: 08.04.2023.
- [9] West JB, Historical aspects of the early Soviet/Russian manned space program. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(4):1501-1511. doi:10.1152/jappl.2001.91.4.1501.
- [10] Korczmar E, Belter A, Naskręt-Barciszewska MZ, Jurga S, Barciszewski J. Epigenetyka na Ziemi i w kosmosie [Epigenetic on Earth and in Space]. *Postepy Biochem*. 2022;68(2):169-178. Published 2022 May 24. doi:10.18388/pb.2021_437.
- [11] NASA. Moon to Mars Overview. <https://www.nasa.gov/topics/moon-to-mars/overview> . Opublikowano: 08.07.2021. Dostęp: 25.02.2023.
- [12] NASA. How Investing in the Moon Prepares NASA for First Human Mission to Mars. <https://www.nasa.gov/sites/default/files/atoms/files/moon-investments-prepare-us-for-mars.pdf>. Dostęp: 25.02.2023.
- [13] Pool SL, Davis JR. Space medicine roots: a historical perspective for the current direction. *Aviat Space Environ Med*. 2007;78(4 Suppl):A3-A4.

- [14] Hodkinson PD, Anderton RA, Posselt BN, Fong KJ. An overview of space medicine. *Br J Anaesth.* 2017;119(suppl_1):i143-i153. doi:10.1093/bja/aex336.
- [15] Johnston SL, Blue RS, Jennings RT, Tarver WJ, Gray GW. Astronaut medical selection during the shuttle era: 1981-2011. *Aviat Space Environ Med.* 2014;85(8):823-827. doi:10.3357/ASEM.3968.2014
- [16] NASA. Evidence Report:Risk of Adverse Health Outcomes and Decrements in Performance due to In-Flight Medical Conditions. Human Research Program. Exploration Medical Capabilities Element. Opublikowano: 08.05.2017. Dostęp: 25.02.2023.
- [17] Kim H, Shin Y, Kim DH. Mechanobiological Implications of Cancer Progression in Space. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:740009. Published 2021 Dec 8. doi:10.3389/fcell.2021.740009.
- [18] NASA. What is Microgravity? <https://www.nasa.gov/centers/glenn/shuttlestation/station/microgex.html>. Opublikowano: 13.02.2009. Dostęp: 25.02.2023.
- [19] Seedhouse E. *Microgravity and Vision Impairments in Astronauts (SpringerBriefs in Space Development)*. 2015.
- [20] Farkas Á, Farkas G. Effects of Spaceflight on Human Skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 2021;34(5):239-245. doi:10.1159/000515963.
- [21] Grimm D, Schulz H, Krüger M, et al. The Fight against Cancer by Microgravity: The Multicellular Spheroid as a Metastasis Model. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3073. Published 2022 Mar 12. doi:10.3390/ijms23063073.
- [22] Bateman GA, Bateman AR. A perspective on spaceflight associated neuro-ocular syndrome causation secondary to elevated venous sinus pressure. *NPJ Microgravity.* 2022;8(1):3. Published 2022 Feb 15. doi:10.1038/s41526-022-00188-6.
- [23] Moreno-Villanueva M, Wong M, Lu T, Zhang Y, Wu H. Interplay of space radiation and microgravity in DNA damage and DNA damage response. *NPJ Microgravity.* 2017;3:14. Published 2017 May 10. doi:10.1038/s41526-017-0019-7.

- [24] Kaur J, Rickman D, Schoonen MA. (2016). Reactive Oxygen Species (ROS) generation by lunar simulants. *Acta Astronautica*, 122, 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2016.02.002>.
- [25] Reynolds RJ, Bukhtiyarov IV, Tikhonova GI, Day SM, Ushakov IB, Gorchakova TYU. Contrapositive logic suggests space radiation not having a strong impact on mortality of US astronauts and Soviet and Russian cosmonauts. *Sci Rep*. 2019;9(1):8583. Published 2019 Jul 4. doi:10.1038/s41598-019-44858-0.
- [26] Çelen İ, Jayasinghe A, Doh JH, Sabanayagam CR. Transcriptomic Signature of the Simulated Microgravity Response in *Caenorhabditis elegans* and Comparison to Spaceflight Experiments. *Cells*. 2023;12(2):270. Published 2023 Jan 10. doi:10.3390/cells12020270.
- [27] Topal U, Zamur C. Microgravity, Stem Cells, and Cancer: A New Hope for Cancer Treatment. *Stem Cells Int*. 2021;2021:5566872. Published 2021 Apr 29. doi:10.1155/2021/5566872.
- [28] NASA. MSSF. Microgravity Simulation Support Facility. https://www.nasa.gov/sites/default/files/atoms/files/microgravity_simulation_support_facility_mssf_one_pager.pdf. Opublikowano: 2017. Dostęp:26.02.2023.
- [29] Zhang Y, Richards JT, Hellein JL, et al. NASA's Ground-Based Microgravity Simulation Facility. *Methods Mol Biol*. 2022;2368:281-299. doi:10.1007/978-1-0716-1677-2_18.
- [30] Herranz R, Anken R, Boonstra J, et al. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*. 2013;13(1):1-17. doi:10.1089/ast.2012.0876.
- [31] Wuest SL, Richard S, Kopp S, Grimm D, Egli M. Simulated microgravity: critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture. *Biomed Res Int*. 2015;2015:971474. doi:10.1155/2015/971474.
- [32] Zhang H, Wang Y, Zhang Z, et al. Alterations in the activity and sleep of *Drosophila melanogaster* under simulated microgravity. *NPJ Microgravity*. 2021;7(1):27. Published 2021 Jul 22. doi:10.1038/s41526-021-00157-5.

- [33] Vashi A, Sreejith KR, Nguyen NT. Lab-on-a-Chip Technologies for Microgravity Simulation and Space Applications. *Micromachines* (Basel). 2022;14(1):116. Published 2022 Dec 31. doi:10.3390/mi14010116.
- [34] Library of Integrated Network-based Cellular Signatures. NCI-H1703 - Cell Line (ID:50034). <https://lincs.hms.harvard.edu/db/cells/50034/>. Opublikowano: 25.04.2012. Dostęp: 23.02.2023.
- [35] Library of Integrated Network-based Cellular Signatures. NCI-H1703 - Cell Line (ID:50034). <https://lincs.hms.harvard.edu/db/cells/50034/>. Opublikowano: 25.04.2012. Dostęp: 23.02.2023.
- [36] Fanini F, Bandini E, Plousiou M, et al. MicroRNA-16 Restores Sensitivity to Tyrosine Kinase Inhibitors and Outperforms MEK Inhibitors in KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13357. Published 2021 Dec 12. doi:10.3390/ijms222413357.
- [37] Chang D, Xu H, Guo Y, et al. Simulated microgravity alters the metastatic potential of a human lung adenocarcinoma cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2013;49(3):170-177. doi:10.1007/s11626-013-9581-9.
- [38] Niu Z, Jin R, Zhang Y, Li H. Signaling pathways and targeted therapies in lung squamous cell carcinoma: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):353. Published 2022 Oct 5. doi:10.1038/s41392-022-01200-x.
- [39] Dietz C, Infanger M, Romswinkel A, Strube F, Kraus A. Apoptosis Induction and Alteration of Cell Adherence in Human Lung Cancer Cells under Simulated Microgravity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14):3601. Published 2019 Jul 23. doi:10.3390/ijms20143601.
- [40] Randal K. Gregg, Chapter Three - Implications of microgravity-induced cell signaling alterations upon cancer cell growth, invasiveness, metastatic potential, and control by host immunity, *International Review of Cell and Molecular Biology*, Academic Press, Volume 361, 2021.

- [41] Ahn CB, Lee JH, Han DG, et al. Simulated microgravity with floating environment promotes migration of non-small cell lung cancers. *Sci Rep.* 2019;9(1):14553. Published 2019 Oct 10. doi:10.1038/s41598-019-50736-6.
- [42] Chung JH, Ahn CB, Son KH, Yi E, Son HS, Kim H-S, Lee SH. Simulated microgravity effects on nonsmall cell lung cancer cell proliferation and migration. *Aerosp Med Hum Perform.* 2017; 88(2):82–89.
- [43] Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [published correction appears in *Ann Oncol.* 2019 May;30(5):863-870]. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237. doi:10.1093/annonc/mdy275.
- [44] Arnold KM, Opdenaker LM, Flynn D, Sims-Mourtada J. Wound Healing and Cancer Stem Cells: Inflammation as a Driver of Treatment Resistance in Breast Cancer. *Cancer Growth and Metastasis.* 2015;8. doi:10.4137/CGM.S11286.
- [45] Baghoum H, Alahmed H, Hachim M, Senok A, Jaleddine N, Al Heialy S. Simulated Microgravity Influences Immunity-Related Biomarkers in Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;24(1):155. Published 2022 Dec 21. doi:10.3390/ijms24010155.
- [46] Grzesik K, Hoja-Łukowicz D. Rola glikanów w rozwoju i progresji nowotworu. *Zastosowania kliniczne [The role of glycans in cancer development and progression. Clinical applications]. Postepy Biochem.* 2021;67(2):104-116. Published 2021 May 25. doi:10.18388/pb.2021_385.
- [47] Iniesta P, Morán A, De Juan C, et al. Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2007;17(1):217-223.
- [48] Toledo-Guzmán E. Mariel , Hernández Ibañez Miguel , Gómez-Gallegos A. Ángel and Ortiz-Sánchez Elizabeth*, ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors, *Current Stem Cell Research & Therapy* 2019; 14(5). <https://dx.doi.org/10.2174/1574888X13666180810120012>.

- [49] Yin, X., Zhang, BH., Zheng, SS. et al. Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. *J Hematol Oncol* 8, 23 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0119-3>.
- [50] Pisanu ME, Noto A, De Vitis C, et al. Lung cancer stem cell lose their stemness default state after exposure to microgravity. *Biomed Res Int.* 2014;2014:470253. doi:10.1155/2014/470253.
- [51] Grimm D, Wehland M, Corydon TJ, Richter P, Prasad B, Bauer J, Egli M, Kopp S, Lebert M, Krüger M. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2020 Aug;9(8):882-894. doi: 10.1002/sctm.20-0084.

Potencjalne wykorzystanie bakterii jelitowych w diagnostyce raka jelita grubego

Natalia Przytocka

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Rak jelita grubego według danych Światowej Organizacji Zdrowia zajmuje trzecie miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów, zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Wartość wskaźnika 5-letniego przeżycia spada wraz ze stopniem zaawansowania w momencie diagnozy. Z tego powodu ważny jest rozwój skutecznych metod diagnostycznych. Obecnie, preferowanym badaniem w diagnostyce tego nowotworu jest kolonoskopia, należąca do metod inwazyjnych. Z kolei, najpopularniejsze metody nieinwazyjne to immunochemiczny oraz gwajakowy test na krew utajoną w kale. W ostatnich latach, dużo uwagi poświęca się badaniu udziału mikrobiomu jelita grubego w patogenezie raka i potencjalnemu wykorzystaniu tej wiedzy w poszukiwaniach nowych biomarkerów. Celem poniższej pracy jest przedstawienie informacji na temat dysbiozy mikrobiomu w raku jelita grubego oraz prób zastosowania jej w nieinwazyjnych metodach diagnostycznych. Przytoczone w rozdziale badania, dotyczyć będą wyłącznie bakterii, ponieważ to właśnie na nich opiera się główny rozwój badań w tym obszarze. Praca ma charakter przeglądowy i oparta jest między innymi na badaniach kohortowych i metaanalizach dostępnych w bazie PubMed. Wnioski zawarte w pracy mówią o dużym potencjale wykorzystania bakterii jako biomarkerów raka jelita grubego, jednak zwracają uwagę na brak wystandaryzowanej metody oraz ograniczenia wynikające między innymi z dużej różnorodności międzyosobniczej w składzie mikroflory jelita grubego.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, biomarkery, mikrobiota

Abstract: Colorectal cancer, according to data from the World Health Organization is the third most common cancer in both men and woman. The 5-year survival rate decreases with the degree of advancement at the time of diagnosis. Therefore, the development of effective diagnostic methods is important. Currently, the preferred diagnostic examination for this cancer is colonoscopy, which is unfortunately invasive method. On the other hand, the most popular non-invasive methods are the immunochemical and guaiac-based tests for occult blood in the stool. In recent years, a lot of attention has been paid to study the role of the gut microbiome in the pathogenesis of cancer and the potential use of this knowledge in the search for new biomarkers. The aim of this study is to present information about the dysbiosis in colorectal cancer and attempts to use it as a non-invasive diagnostic method. The studies cited in the chapter will focus exclusively on bacteria, as they are the main topic of research in this area. This work is a review, based, among other things, on cohort studies and meta-analyses available in the

PubMed database. The conclusions speak to the great potential for using bacteria as biomarkers and the limitations of it, that arise from the high interpersonal variability in the composition of the gut microbiota.

Keywords: colorectal cancer, biomarkers, microbiota

1. Wstęp

Rak jelita grubego (CRC) to nowotwór występujący w obrębie okrężnicy, zagięcia esiczo-odbytniczego i odbytnicy. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2020, stanowi on trzecią, najczęściej występującą chorobę nowotworową, zarówno u kobiet jak i u mężczyzn (odpowiednio 9,4% i 10,6%). Zajmuje również drugie miejsce w kategorii śmiertelności zaraz po raku płuca (bez uwzględniania płci) ^[1]. Wśród populacji polskiej, na podstawie publikacji z 2020, również był trzecim najczęściej rejestrowanym nowotworem, zarówno wśród kobiet, jak i mężczyzn (odpowiednio 12,4% i 9,6%). W kategorii zgonów z powodu nowotworów złośliwych znajduje się na drugim miejscu u mężczyzn (13,2%) i na trzecim miejscu u kobiet (11,7%). Warto dodać, że pojawia się głównie u osób po 45 roku życia, a rak okrężnicy jest powszechniejszy od raka odbytu ^[2]. Objawy tej choroby zależne są od dokładnej lokalizacji, a w początkowych stadiach są niespecyficzne. Mowa tutaj między innymi o bólu brzucha, ogólnym osłabieniu czy wzdęciach. Nie dziwi więc, że około jedna piąta raków jelita grubego diagnozowana jest na etapie rozsiewu nowotworowego ^[3]. Zarówno skuteczność terapii, jak i rokowania zależne są od stopnia zaawansowania raka w momencie jego wykrycia. Według aktualnych danych, odsetek 5-letniego przeżycia wynosi średnio 50-60% ^[4]. Ze względu na opisaną epidemiologię ważne są metody diagnostyczne, które pozwalają na czułe i specyficzne wykrywanie CRC. W ostatnich latach dzięki rozwojowi badań molekularnych zaczęto szukać związku między dysbiozą mikrobioty jelita grubego, a ryzykiem rozwoju raka tego narządu. Ze względu na to, że bakterie stanowią znaczną część flory jelitowej, to właśnie one są głównym przedmiotem badań w poszukiwaniu nowych biomarkerów nowotworowych. Celem poniższej pracy jest przedstawienie informacji na temat wykorzystania mikrobioty bakteryjnej jelita grubego jako innowacyjnej, nieinwazyjnej metody w wykrywaniu raka tego narządu. Praca ma charakter przeglądowy i oparta jest między innymi na badaniach kohortowych i metaanalizach dostępnych w bazie PubMed.

2. Metody diagnostyczne stosowane w wykrywaniu raka jelita grubego

Metody diagnostyczne stosowane w wykrywaniu raka jelita grubego możemy podzielić na metody inwazyjne i nieinwazyjne. Obecnie najpopularniejszą metodą diagnostyczną o dużej czułości i swoistości jest kolonoskopia, która poza zaawansowanymi zmianami pozwala także na wykrycie stanów przedrakowych ^[5]. Jest jednak badaniem inwazyjnym, którego dodatkową wadą jest ograniczone wykrywanie małych zmian. Z kolei, do popularnych badań nieinwazyjnych należą: test na krew utajoną w kale metodą immunochemiczną (*FIT - Faecal Immunochemical Test*) i gwajakową (*FOBT - Faecal Occult Blood Test*). Niestety, obie metody są ograniczone przez rozkład hemoglobiny oraz fakt, że krwawienie z powodu zmian nie musi występować przewlekle. Przekłada się to na zwiększoną ilość testów fałszywie ujemnych ^[6]. Co więcej, nie charakteryzują się one wysoką czułością w wykrywaniu zmian początkowych. Jeśli chcielibyśmy porównać te dwie metody ze sobą, badanie FIT jest lepszym wyborem, ponieważ wykorzystuje specyficzne przeciwciała przeciw hemoglobinie, zamiast reakcji z peroksydazą hemoglobiny ^[7]. Test FIT nie jest także obciążony ograniczeniami dietetycznymi. W przeciwieństwie do niego, w teście gwajakowym przyczyną fałszywie dodatniego wyniku może być obecność peroksydaz z owoców, warzyw lub krwi innych gatunków oraz przyjmowanie dużych ilości niesteroidowych leków przeciwzapalnych ^[8]. Test gwajakowy obciążony jest także ryzykiem wyniku fałszywie ujemnego przy spożywaniu dużych dawek witaminy C. Ponadto wymagane są trzy próbki kału, w przeciwieństwie do testu FIT, gdzie wystarczy tylko jedna ^[8]. Nie umożliwia on także różnicowania z którego odcinka jelita doszło do krwawień ^[8]. Warto jednak nadmienić, że według obecnych zaleceń w przypadku stwierdzenia nieprawidłowości w badaniu FIT, zawsze powinno się przeprowadzić pełną endoskopię. Poza wymienionymi metodami istnieją również takie, które według polskich standardów powinny być przeprowadzane tylko wtedy, gdy wykonanie kolonoskopii lub FIT jest niemożliwe. Należą do nich: sigmoidoskopia, endoskopia kapsułkowa, wielocelowe testy DNA stolca i kolonoskopia wirtualna ^[4]. W Polsce istnieje Program Badań Przesiewowych raka jelita grubego z którego mogą skorzystać osoby od 50 do 65 roku życia lub od 40 do 49 roku życia, jeśli nowotwór ten był rozpoznany w najbliższej rodzinie ^[9]. Z powodu powagi epidemiologicznej prezentowanej choroby, od wielu lat trwają badania nad poszukiwaniem nowych, optymalnych metod diagnostycznych. Doniesienia naukowe, sugerujące udział bakterii flory jelita grubego w patogenezie i postępowaniu raka jelita grubego ukierunkowały

badaczy na to, że zarówno cechy dysbiozy jelitowej, jak i bakteryjne produkty przemiany materii mogą być wykorzystywane jako potencjalne biomarkery.

3. Czynniki zwiększające ryzyko raka jelita grubego oraz ich wpływ na mikrobiotę jelita grubego

Patogeneza raka jelita grubego jest bardzo złożona i grają w niej rolę zarówno czynniki środowiskowe, jak i genetyczne. Nowotwór ten może rozwinąć się ze stanów przedrakowych, do których należą: pojedyncze gruczolaki, zespoły polipowatości rodzinnej i nieswoiste choroby zapalne jelit [4]. Uważa się, że większość przypadków tego raka musi przejść następujące stadia: normalny nabłonek błony śluzowej jelita, polipy hiperplastyczne (adenomatycznie niepostępujące), polipy adenomatyczne postępujące, wczesny rak jelita grubego, rak jelita grubego [10]. Zaburzenia genetyczne mogące prowadzić do rozwinięcia się raka jelita grubego, dotyczą w głównej mierze genów: *MMR*, *APC* oraz *MUTYH*. Geny z grupy *MMR* (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) odpowiedzialne są za kodowanie produktów, biorących udział w naprawie błędów DNA w czasie replikacji. Mutacje prowadzą do powstawania zarówno nieprawidłowych komórek, niestabilności mikrosatelitarnej (*MSI - microsatellite instability*) [11], jak i rozwinięcia się zespołu Lyncha, najczęstszej genetycznie uwarunkowanej przyczyny raka jelita grubego [4]. Z kolei, gen *APC* odpowiedzialny jest za kodowanie białka *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), które działa supresorowo w szlaku sygnałowym *WNT* (*Wingless Signaling Transduction*). Szlak *WNT* odgrywa rolę w embriogenezie, różnicowaniu, przeżywalności i proliferacji komórek, w tym komórek jelita grubego. Utrata funkcji białka prowadzi do rozrostu nabłonka gruczolowego, a następnie pobudzenia onkogenów *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* [4]. Zbadano, że mutacja uczestniczy w patogenezie rodzinnej polipowatości gruczolakowatej jelita (*FAP - Familial Adenomatous Polyposis*), która może przekształcić się w raka jelita grubego należącego do nowotworów wykazujących niestabilność chromosomów [11,12]. Do czynników socjoekonomicznych i środowiskowych, które mają wpływ na ryzyko rozwinięcia nowotworu należą: niska aktywność fizyczna, nieodpowiednia dieta, palenie papierosów oraz otyłość. W przypadku diety, szczególne znaczenie ma duże spożycie tłuszczów, zwłaszcza zwierzęcych, czerwonego mięsa oraz soli, przy jednoczesnym niskim spożyciu warzyw i owoców [13]. Wszystkie z wymienionych czynników środowiskowych wpływają na funkcjonowanie mikrobioty jelita grubego, mogąc prowadzić do jej dysbiozy, a ta potencjalnie może brać czynnikiem patofizjologicznym raka.

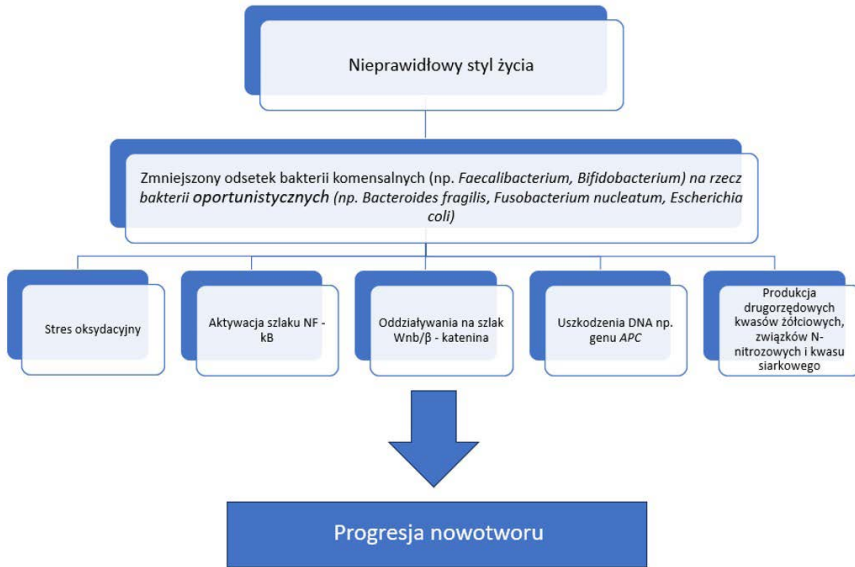
4. Charakterystyka mikrobiomu raka jelita grubego, jej dysbioza i udział w patogenezie raka jelita grubego

Jelito grube jest odcinkiem przewodu pokarmowego z najliczniejszym i najbardziej aktywnym zespołem mikroorganizmów. Mikrobiota jelita grubego niezbędna jest do przeprowadzania procesów metabolicznych, proliferacyjnych oraz immunologicznych. W skład flory jelitowej wchodzi głównie bakterie (bezwzględnie beztlenowe, tlenowe i względnie tlenowe), ale też wirusy, archeony oraz organizmy eukariotyczne [14]. Mikrobiota jelitowa produkuje wiele substancji chroniących nas przed rozwinięciem choroby. Są to między innymi: kwas mlekowy, nadtlenuk wodoru, kwas masłowy [14]. Fizjologicznie, w opisywanym narządzie dominują bakterie probiotyczne, jednak wymienione w powyższym podrozdziale czynniki środowiskowe mogą oddziaływać negatywnie na naszą mikroflorę, doprowadzając do jej dysbiozy. Bakterie zasiedlające jelito grube mogą brać udział w rozwoju i progresji raka jelita grubego poprzez reakcje zapalne, uszkodzenia DNA oraz produkcję metabolitów wpływających zarówno pozytywnie, jak i negatywnie na progresję nowotworu [15]. Badania [6,10,15] sugerują, że analiza różnorodności i występowania poszczególnych gatunków ma potencjał jako metoda diagnostyczna, między innymi ze względu na to, że obserwowane są różnice w składzie mikroflory jelitowej pomiędzy osobami chorymi na raka, a osobami zdrowymi. Niewątpliwie jednym z ograniczeń tej metody jest fakt, że mikrobiom jelita grubego charakteryzuje się dużą zmiennością międzyosobniczą. Najczęściej stosowanym materiałem w analizie składu mikrobioty jest kał, jednak niektórzy wykorzystują także śluz pobierany ze światła jelita. Sánchez-Alcoholado et al., przytaczając wyniki uzyskane przez innych, piszą, że u pacjentów z CRC obserwuje się zmniejszoną różnorodność organizmów oraz ich dysbiozę. Zmniejszony jest także odsetek bakterii komensalnych produkujących kwas masłowy na rzecz oportunistycznych bakterii prozapalnych [15,16,17]. Obserwuje się zwiększoną liczebność szczepów: *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Streptococcus gallolyticus* i zmniejszoną: *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* i *Roseburia* [15]. Inne badanie, również zauważa korelację pomiędzy występowaniem CRC, a dysbiozą szczepów: *Streptococcus bovis*, *Bacteroides fragilis* i *Fusobacterium nucleatum* [18]. Villéger et al. również przytaczają wyniki badań wskazujące na występowanie dysbiozy. Zwiększona była w nich obfitość rodzaju: *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Gemella* i *Leptotrichia* (zwłaszcza w początkowym stadium) oraz *Escherichia coli* i *Pseudomonas veronii* [19]. Ten sam autor

zwraca uwagę na różnice występujące w charakterze dysbiozy w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu oraz jego lokalizacji. Zaobserwowali to również Corredoira et al. w badaniu z 2017 roku porównującym CRC przy zakażeniu *Clostridium septicum* (CS) oraz *Streptococcus gallolyticus* (SGG), którego wyniki wskazywały na to, że rak jelita grubego kojarzony z SGG zlokalizowany jest zazwyczaj w jelicie dystalnym i odbytnicy, natomiast rak kojarzony z CS znajduje się w prawym jelicie. Ponadto, zwiększona ilość SGG wykrywana była we wczesnym stadium raka. Charakterystyka dysbiozy może być inna również w zależności od fenotypu raka lub obecnych zmian molekularnych. Dla przykładu bakteria *E.coli* produkująca kolibaktynę jest bardziej charakterystyczna dla pacjentów ze stabilnymi mikrosatelitami, natomiast *F. nucleatum* i *E.coli* nie produkująca kolibaktyny dla raka z niestabilnością mikrosatelitarną [19]. Z uwagi na zauważone różnice w składzie mikrobioty jelitowej zaczęto szukać związku między dysbiozą, a patogenezą raka jelita grubego. Jedną z teorii mówi o tym, że przewlekły stan zapalny jelita może powodować ekspansję mikroflory jelitowej, która z kolei może potęgować stan zapalny, co wpływa na indukcję onkogenezy [21]. Dodatkowo uważa się, że bakterie jelita grubego mogą być zaangażowane w nowotworzenie poprzez aktywację szlaku NF- κ B, IL-17A, oddziaływanie na E-katherynę i co się z tym łączy, szlak Wn β /katenina. Przykładami takich organizmów są *F.nucleatum* oraz *B.fragilis*, które pobudzają szlak Wn β /katenina lub wpływają na NF- κ B zwiększając produkcję cytokin. *F.nucleatum* dokonuje tego za pomocą cząsteczki FadA [22], natomiast *B. fragilis* przy wykorzystaniu toksyny metaloproteasowej BFT [20]. Dodatkowo *F.nucleatum* ma zdolność hamowania komórek NK [16,17]. Bakterie mogą też produkować endotoksyny, przykładem jest *E.coli*, która poprzez wpływ na produkcję kolibaktyny uszkadza gen *APC* [17].

Opracowane zostały również modele hipotetyczne tłumaczące rolę drobnoustrojów w patogenezie CRC. Najpopularniejsze z nich to model "Alpha-Bug" i "driver-passenger". Model "Alpha-Bug" zakłada istnienie bakterii, które biorą udział w rozwoju raka bezpośrednio, jak i pośrednio poprzez indukcję śluzowej obrony immunologicznej i komórek nabłonka, co przyczynia się do onkogenezy oraz wypychania ze środowiska organizmów obronnych [16]. Do organizmów z opisywanej grupy można zaliczyć *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis* i *Escherichia coli* [16,20]. Drugi z wymienionych modeli został zaproponowany przez Tjalsma et al. Opiera się na istnieniu "kierowcy" - organizmu, który występuje lokalnie w jelicie grubym oraz "pasażera", którym zazwyczaj jest bakteria oportunistyczna. Rolą "kierowcy" (np. *Enterococcus faecalis* [24]) jest produkcja substancji uszkadzającej materiał

genetyczny oraz indukcja proliferacji “pasażera” (np. *Streptococcus gallolyticus*^[20], *Fusobacterium spp.*^[22]), który pośredniczy w onkogenezie^[16].



Rycina 1. Dysbioza jelita grubego i jej wpływ na rozwój raka jelita grubego [opracowanie własne].

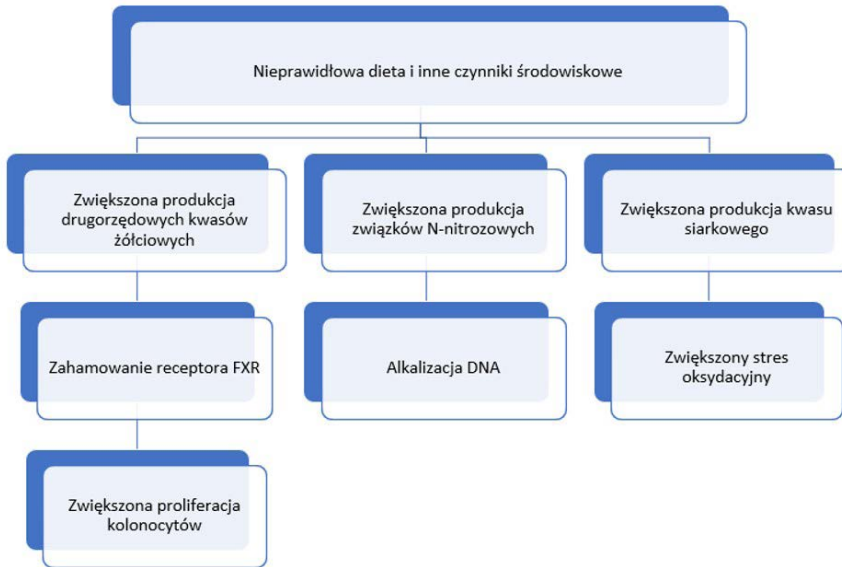
5. Różne podejścia w wykorzystaniu dysbiozy jelitowej w wykrywaniu raka jelita grubego

Obecnie nie ma sprecyzowanego kierunku rozwoju badań nad biomarkerami bakteryjnymi. Można się spotkać z kilkoma podejściami, które przedstawione zostaną w dalszej części pracy. Są to np. łączenie testu FIT z analizą mikrobioty oraz analiza stosunków lub ilości DNA danych mikroorganizmów. Brakuje także wystandaryzowanej metody pobierania materiału oraz oznaczania potencjalnych biomarkerów. Do badań wykorzystuje się głównie stolec, śluz jelitowy, krew oraz fragmenty tkanek. Z kolei oznaczanie markerów bakteryjnych odbywa się zazwyczaj za pomocą sekwencjonowania 16S rRNA, które uważane jest za złoty standard ze względu na swoją uniwersalność i niezmienną pełnioną funkcję^[25]. Metoda ta nie jest jednak w stanie ocenić całego mikrobiomu oraz ma ograniczenia w ocenie interakcji molekularnych między gospodarzem, a drobnoustrojem oraz pomiędzy dwoma drobnoustrojami^[24]. W badaniach można wykorzystywać także metagenomikę, która pozwala na taksonomiczną klasyfikację wszystkich mikroorganizmów

obecnych w danej próbce i w zakresie dostarczania informacji dotyczących ekosystemu przewyższa sekwencjonowanie 16S rRNA [24]. Popularna jest także technika PCR. Mimo braku ujednoczenia, wykonane do tej pory badania dały nadzieję na przyszłość. W jednej z prac w której połączono metodę FIT z oceną składu mikroflory przy wykorzystaniu modelu losowego lasu, wykrywalność nowotworu wzrosła z 75% (dla samego FIT) do 91,7%. Zwiększoną skuteczność zaobserwowano również w przypadku gruczolaków, gdzie wyniki prezentowały się odpowiednio: 15,7% i 45,5%. Wynika z tego, że połączenie tych dwóch badań może być pomocne w wykrywaniu początkowych stadiów onkogenezy. Należy jednak nadmienić, że zwiększona czułość modelu wykorzystującego mikroorganizmy wiązała się ze zmniejszoną swoistością w porównaniu do FIT, odpowiednio 90,1% i 97,1%. Zastosowanie algorytmu losowego lasu pozwoliło na identyfikację populacji bakteryjnych pomocnych w rozróżnieniu osoby zdrowej od chorej. Zauważono zwiększoną ilość patogenów należących do *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Gemella*, *Parvimonas*, i *Prevotella*. Autorzy podkreślili także, że ze względu na dużą różnorodność międzyosobniczą i polibakteryjną etiologię choroby pojedynczy mikroorganizm nie będzie w stanie pełnić roli biomarkera. Inne podejście zaprezentowali Eklöf et al. którzy stosując metodę *real-time* PCR w badaniu kohortowym skupili się na *E.coli* produkującej kolibaktynę, adhezyjnej *E.coli* (DAEC) oraz *F.nucleatum*. Uważa się, że *F.nucleatum* z uwagi na działanie wspomniane we wcześniejszej części pracy, może brać udział w przekształcaniu gruczolaków w raki [18]. Z kolei zwiększona obecność *E.coli* może obciążyć wątrobę i indukować komórki do procesu kancerogenezy [28], a produkowana przez nie genotoksyna, czyli kolibaktyna, powodowała pęknięcia podwójnej helisy DNA w komórkach nabłonka jelit prowadząc do częstszych mutacji genowych [29]. Wyniki badania pokazały, że gen *clbA* wykorzystywany do wykrycia szczepu *E.coli* produkującego kolibaktynę może być potencjalnym markerem dla zmian wczesnych, a jego czułość wynosi 56,4%. Czułość dla *F.nucleatum* wynosiła 69,2%, natomiast wyniki dla genu *afaC* służącego do identyfikacji DAEC nie były statystycznie istotne. Wykonano również próbę, nazwaną testem CAMA (*Cancer Associated Microbial Alterations*), która łączyła zmiany *clbA* oraz *F.nucleatum*. Czułość testu wynosiła 84,6% i zwiększyła się jeszcze bardziej (do 89,7%) przy dodatkowym połączeniu z badaniem na krew utajoną. Autorzy sugerują także, że analiza mikrobioty może przyczynić się do identyfikacji osób stanowiących grupę zwiększonego ryzyka rozwinięcia CRC [29]. Nie jest to jedyna praca, w której wykrywanie obecności kilku drobnoustrojów na raz cechowało się zwiększoną czułością

i swoistością. Inny model zakładał połączenie pięciu markerów: *Peptostreptococcus stomatis*, *Clostridium symbiosum*, *Hungatella hathewayi*, *Parvimonas micra* i *Gemella morbillorum*. Czulość i swoistość wynosiły odpowiednio 0.97 i 0.93 dla populacji chińskiej [30]. Dobre wyniki obserwowano również dla połączenia *Parvimonas micra* z *F.nucleatum* i *E.coli* produkującej kolibakteryję [31]. Kolejne podejście z jakim możemy się spotkać w aktualnej literaturze to badania stosunków między bakteriami “dobrymi”, a “szkodliwymi”. W badaniu kohortowym przeprowadzonym przez Guo et al. zbadano stosunek *F.nucleatum* do bakterii probiotycznych z rodzaju *Faecalibacterium prausnitizii*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* wykorzystując sekwencjonowanie 16S rRNA oraz *real-time* PCR. Grupy, dla których wykonano próby to: osoby zdrowe, pacjenci z nowotworem nie pochodzącym z przewodu pokarmowego, pacjenci z łagodnymi chorobami jelita grubego oraz pacjenci z rakiem jelita grubego. Ilość *F.prausnitizii* i *Bifidobacterium* była zmniejszona u pacjentów z CRC oraz u pacjentów z łagodnymi zmianami w porównaniu do grupy osób zdrowych i z nowotworami nie pochodzącymi z przewodu pokarmowego. W przypadku *Lactobacillus* nie zauważono różnicy pomiędzy CRC, a pozostałymi grupami. Stosunek *F.nucleatum* do *F.prausnitizii* był wyższy u pacjentów ze zmianami łagodnymi i CRC, natomiast stosunek *F.nucleatum* do *Bifidobacterium* w CRC był zwiększony w porównaniu do wszystkich pozostałych grup. Autorzy wywnioskowali, że stosunek *F.nucleatum* do bakterii probiotycznych ma dobre właściwości diagnostyczne, dokładniej mówiąc połączenie stosunków *F.nucleatum* do *F.prausnitizii* i *Bifidobacterium* może być stosowane jako wysoko czuły i swoisty marker w wykrywaniu I stadium CRC. W innym badaniu dotyczącym wartości diagnostycznej stosunków bakterii probiotycznych zasugerowano, że *Firmicutes* do *Bacteroidetes* może być markerem dysbiozy w zmianach przedrakowych [19]. Na podstawie przedstawionych informacji można zauważyć, że szczególnym zainteresowaniem wśród badaczy cieszy się bakteria powszechnie bytująca w jamie ustnej - *F. nucleatum*. Jest to związane prawdopodobnie z obserwacjami dotyczącymi zwiększenia jej udziału w mikrobiomie jelita zaatakowanego przez nowotwór w większości przypadków [30]. Ponadto niektórzy uważają, że *F. nucleatum* może być także traktowana jako negatywny wskaźnik prognostyczny [17, 33]. *B. fragilis* jest utożsamiana z podobną zależnością, natomiast jako przykład prawdopodobnego markera pozytywnego można uznać *F.prausnitizii* [19].

6. Zastosowanie metabolitów bakterii jelitowych jako biomarkerów w diagnostyce raka jelita grubego



Rycina 2. Wpływ wybranych metabolitów bakteryjnych na procesy związane z onkogenezą [opracowanie własne].

Drugą drogą w poszukiwaniu nowych nieinwazyjnych metod diagnostyki raka jelita grubego, może być wykorzystywanie metabolitów bakteryjnych, które mogą mieć wpływ zarówno pro- jak i antyonkogeny. Badanie ilościowe metabolitów bakteryjnych pozwala na określenie aktywności mikrobiologicznej oraz interakcji gospodarz-mikrobiom ^[10]. U osób z dietą zbilansowaną, podstawowymi produktami trawienia bakteryjnego są kwasy organiczne, szczególnie krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA), natomiast u osób, których dieta nie należy do zbalansowanych produkowane są również związki proonkogenne takie jak: drugorzędowe kwasy żółciowe, związki N-nitrozowe oraz kwas siarkowy ^[16]. Kwasy żółciowe hamują receptor FXR (*Farnesoid X Receptor*), co prowadzi do zwiększonej proliferacji kolonocytów. Związki N-nitrozowe mogą alkalizować DNA, a ilość bakterii, która je produkuje jest potęgowana przez spożywanie czerwonego mięsa. Z kolei kwas siarkowy może hamować oksydację maślanu i wywoływać stres oksydacyjny ^[16]. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się SCFA, w których widzi się potencjał biomarkerowy. SCFA uważane są za związki antyonkogenne, dzięki swoim właściwościom chroniącym błonę jelitową. Szczególnie ważny jest kwas masłowy, który

dotatkowo indukuje IL-18 i obniża pH kału, dzięki czemu hamuje proliferację patogenów i komórek nowotworowych oraz pobudza apoptozę. Uważa się, że zmniejszona ilość SCFA powiązana jest ze zwiększonym ryzykiem raka jelita grubego ^[15]. Kolejnym potencjalnym biomarkerem są lokalne lotne związki organiczne, nazywane również VOC (*Volatile Organic Compound*), które są produkowane podczas fermentacji, a następnie dostają się do moczu i kału ^[24].

7. Wnioski

Celem pracy było przedstawienie informacji na temat wykorzystywania bakterii kolonizujących jelito grube jako potencjalnych biomarkerów raka jelita grubego. Ponieważ jest to tematyka stosunkowo nowa, proponowane są różne podejścia zawierające w sobie między innymi połączenie analizy mikrobiologicznej z istniejącymi już metodami nieinwazyjnymi, traktowanie raka jelita grubego jako choroby polibakteryjnej, czy też sprawdzanie stosunku pomiędzy bakteriami probiotycznymi, a tymi, które uważa się za „szkodliwe”. W skrócie omówiono również inny kierunek badań, czyli potencjalne wykorzystanie metabolitów bakteryjnych w diagnostyce. Przedstawione w pracy analizy dają nadzieję na opracowanie nowej metody nieinwazyjnej, jednak zanim do tego dojdzie, pewne ograniczenia powinny być pokonane. Pierwszym z nich jest brak wspólnego typu i sposobu pobierania próbki oraz jej ilości. Kolejnym problemem jest brak wystandaryzowanej metody badania próbek. W opisanych pracach wykorzystywano najczęściej sekwencjonowanie 16S rRNA, ale także badania PCR. O tym, dlaczego ujednolicona metoda analizy jest ważna świadczy fakt, że jeden z autorów nadmienił, że zawartość procentowa DNA patogenów była różna dla próbki badanej ilościowym PCR i PCR w czasie rzeczywistym ^[22]. Ograniczeniem jest także międzyosobnicze zróżnicowanie mikroflory bakteryjnej, której skład zależy od płci, wieku, diety, stylu życia, stosowanych leków oraz pochodzenia etnicznego i geograficznego. Z tego powodu badania zajmujące się analizą ilościową poszczególnych gatunków u osób zdrowych i chorych często dawały inne wyniki. Istnieje ryzyko, że takie różnice wpłyną na nieprawidłowe doszukiwanie się korelacji pomiędzy mechanizmem działania danego patogenu, a jego możliwego wpływu na powstawanie i rozwój raka jelita grubego. Dodatkowo, ciężko będzie przez to znaleźć jeden uniwersalny marker i potencjalnie wymagane będzie opracowanie osobnych standardów dla poszczególnych populacji. Podsumowując, mikrobiota jelita grubego oraz związki przez nią produkowane mogą zostać

potencjalnymi biomarkerami dla raka jelita grubego, lub stanów przedrakowych, ale wymaga to jeszcze wielu badań i ustandaryzowanej metodologii.

Referencje

- [1] Colorectal Cancer. World Health Organisation; 2020. Accessed March 24, 2023. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf.
- [2] Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, Olasek P, Miklewska M, Didkowska JA. Nowotwory Złośliwe W Polsce W 2020 Roku. Krajowy Rejestr Nowotworów; 2020. Accessed March 24, 2023. https://onkologia.org.pl/sites/default/files/publications/2023-01/nowotwory_2020.pdf.
- [3] Gośliński J. Rak jelita grubego - objawy i badania. Zwrotnikraka.pl. Published July 15, 2019. Accessed March 24, 2023. <https://www.zwrotnikraka.pl/objawy-raka-jelita-grubego/>.
- [4] Gajewski P, ed. Interna Szczeklika 2022. Medycyna Praktyczna; 2022.
- [5] Gośliński J. Kolonoskopia - badanie jelita grubego. Zwrotnikraka.pl. Published January 15, 2022. Accessed March 24, 2023. <https://www.zwrotnikraka.pl/badanie-jelita-grubego/>.
- [6] Li N, Bai C, Zhao L, Ge Y, Li X. Characterization of the fecal microbiota in gastrointestinal cancer patients and healthy people. *Clinical and Translational Oncology*. 2022;24(6):1134-1147. doi:<https://doi.org/10.1007/s12094-021-02754-y>.
- [7] Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2022;19(8):521-531. doi:<https://doi.org/10.1038/s41575-022-00612-y>.
- [8] Hongha TV, Burke CA. Advances in Colorectal Cancer Screening. *Current Gastroenterology Reports* 2009. 2009;11:406-412. Accessed March 24, 2023. https://podyplomie.pl/publish/system/articles/pdfarticles/000/011/187/original/Strony_od_MpD_2010_04-8.pdf?1467892160.

- [9] Program badań przesiewowych raka jelita grubego / Programy profilaktyczne / Dla Pacjenta / Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) – finansujemy zdrowie Polaków. Published 2023. Accessed March 24, 2023. <https://www.nfz.gov.pl/dla-pacjenta/programy-profilaktyczne/program-badan-przesiewowych-raka-jelita-grubego/>.
- [10] Zhou P, Yang D, Sun D, Zhou Y. Gut microbiome: New biomarkers in early screening of colorectal cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022;36(5). doi:<https://doi.org/10.1002/jcla.24359>.
- [11] Martínez-Roca A, Giner-Calabuig M, Murcia O, et al. Lynch-like Syndrome: Potential Mechanisms and Management. *Cancers*. 2022;14(5):1115. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers14051115>.
- [12] Feng F, Sun H, Zhao Z, et al. Identification of APC Mutation as a Potential Predictor for Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Journal of Oncology*. 2022;2022:6567998. doi:<https://doi.org/10.1155/2022/6567998>.
- [13] Lewandowska A, Rudzki G, Lewandowski T, Strykowska-Góra A, Rudzki S. Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Cancer Control*. 2022;29:1073274821105666. doi:<https://doi.org/10.1177/10732748211056692>.
- [14] Gałęcka M, Basińska AM, Bartnicka A. Znaczenie mikrobioty jelitowej w kształtowaniu zdrowia człowieka — implikacje w praktyce lekarza rodzinnego. *Forum Medycyny Rodzinnej*. 2018;12(2):50-59. Accessed March 24, 2023. https://journals.viamedica.pl/forum_medycyny_rodzinnej/article/view/58042.
- [15] Sánchez-Alcoholado L, Ramos-Molina B, Otero A, et al. The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer Development and Therapy Response. *Cancers*. 2020;12(6):1406. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers12061406>.
- [16] Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.615056>.
- [17] Koziński K, Dobrzyń A. Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki. *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2013;67:1098-1108. Accessed March 24, 2023. <https://phmd.pl/api/files/view/29379.pdf>.

- [18] Dokht Khosravi A, Seyed-Mohammadi S, Teimoori A, Asarehza-degan Dezfuli A. The role of microbiota in colorectal cancer. *Folia Microbiologica*. 2023;67(5):683-691. doi:<https://doi.org/10.1007/s12223-022-00978-1>.
- [19] Villéger R, Lopès A, Veziat J, et al. Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24(22):2327-2347. doi:<https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i22.2327>.
- [20] Corredoira J, Grau I, Garcia-Rodriguez JF, et al. Colorectal neoplasm in cases of *Clostridium septicum* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bacteraemia. *European Journal of Internal Medicine*. 2017;41:68-73. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.02.009>.
- [21] Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science*. 2012;338(6103):120-123. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1224820>.
- [22] Pasquereau-Kotula E, Martins M, Aymeric L, Dramsi S. Significance of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Association With Colorectal Cancer. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00614>.
- [23] Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(8):575-582. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>.
- [24] Alrahawy M, Javed S, Atif H, Elsanhoury K, Mekhaeil K, Eskander G. Microbiome and Colorectal Cancer Management. *Cureus*. 2022;14(10). doi:<https://doi.org/10.7759/cureus.30720>.
- [25] Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(9):2761-2764. doi:<https://doi.org/10.1128/jcm.01228-07>.

- [26] Baxter NT, Ruffin MT, Rogers MAM, Schloss PD. Microbiota-based model improves the sensitivity of fecal immunochemical test for detecting colonic lesions. *Genome Medicine*. 2016;8. doi:<https://doi.org/10.1186/s13073-016-0290-3>.
- [27] Eklöf V, Löfgren-Burström A, Zingmark C, et al. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *International Journal of Cancer*. 2017;141(12):2528-2536. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.31011>.
- [28] Gałęcka M, Bartnicka A, Szewc M, Mazela J. Optimal development of infantile gut microbiota secure longterm health. *Standardy Medyczne/Pediatrics*. Published online 2016:359-367. Accessed March 24, 2023. <https://instytut-mikroekologii.pl/wp-content/uploads/2017/12/Kszaltowanie-sie-mikrobioty.pdf>.
- [29] Juszczyk S. Mikroflora jelitowa (mikrobiom) w profilaktyce raka. *Zwrotnikraka.pl*. Published July 31, 2019. <https://www.zwrotnikraka.pl/mikroflora-jelitowa-mikrobiom-profilaktyka-raka/>.
- [30] Zhang J, He Y, Xia L, et al. Expansion of Colorectal Cancer Biomarkers Based on Gut Bacteria and Viruses. *Cancers*. 2022;14(19):4662. doi:<https://doi.org/10.3390/cancers14194662>.
- [31] Löwenmark T, Löfgren-Burström A, Zingmark C, et al. Parvimonas micra as a putative non-invasive faecal biomarker for colorectal cancer. *Scientific reports*. 2020;10(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72132-1>.
- [32] Guo S, Li L, Xu B, et al. A Simple and Novel Fecal Biomarker for Colorectal Cancer: Ratio of Fusobacterium Nucleatum to Probiotics Populations, Based on Their Antagonistic Effect. *Clinical Chemistry*. 2018;64(9):1327-1337. doi:<https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.289728>.
- [33] Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*. 2016;65(12):1973-1980. doi:<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310101>.

Sylimaryna w leczeniu i zapobieganiu raka wątrobowokomórkowego

Wojciech Dobczyński, Eliza Barczyk, Joanna Bączyk,
Katarzyna Grudnik, Anna Krakowczyk, Dariusz Kucias

Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biofizyki im. prof. Zbigniewa Religi,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Abstrakt: Rak wątrobowokomórkowy jest jednym z najczęściej rokujących w przebiegu nowotworów pierwotnych, a pięcioletnia przeżywalność szacowana jest na mniej niż 20%. Wywodzący się z hepatocytów nowotwór stanowi większość nowotworów złośliwych wątroby. Ostropest plamisty był wykorzystywany już w czasach starożytnych w celach zdrowotnych, a najnowsze badania z zakresu medycyny i dietetyki potwierdzają pozytywne działanie leków i ekstraktów bazujących na wyciągu z tej rośliny. Dzisiaj wykorzystuje się właściwości tej rośliny do leczenia chorób wątroby takich jak: przewlekłe i wirusowe zapalenie wątroby, marskość wątroby, czy uszkodzenia spowodowane toksynami. Pozytywny wpływ na kondycję wątroby chroniący przed włóknieniem potencjalnie zapobiega uszkodzeniom, co minimalizuje szanse na wystąpienie marskości wątroby lub raka wątrobowokomórkowego. Sylimaryna wykazuje właściwości pożądane do leczenia nowotworowego, wpływa na białka proapoptotyczne, szlaki apoptotyczne i zapobieganie przerzutom nowotworowym. Użycie sylimaryny z innymi lekami przeciwnowotworowymi jak np.: sorafenib, lenwatinib, karwedylol, doksorubicyna zmniejsza toksyczność terapii, a także zwiększa skuteczność terapii.

Słowa kluczowe: ostropest plamisty, rak wątrobowokomórkowy, sylimaryna, sylibina, włóknienie

Abstract: Hepatocellular carcinoma is one of the bad prognostic primary cancers and the five-year survival rate is estimated at less than 20%. Hepatocyte-derived tumors account for the majority of liver malignancies. Milk thistle has been used in ancient times for health purposes and the latest research in the field of medicine and dietetics confirms the positive effects of drugs and extracts based on the extract of this plant. Today, the properties of this plant are used to treat liver diseases such as chronic and viral hepatitis, cirrhosis or damage caused by toxins. The positive effect on the condition of the liver protecting against fibrosis, potentially prevents damage, which minimizes the chances of cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Silymarin has properties desirable for cancer treatment, affects pro-apoptotic proteins, apoptotic pathways and prevents cancer metastasis. The use of silymarin with other anticancer drugs, such as: sorafenib, lenvatinib, carvedilol, doxorubicin reduces the toxicity of therapy and increases the effectiveness of therapy.

Keywords: milk thistle, hepatocellular carcinoma, silymarin, silybin, fibrosis.

1. Wstęp

Rak wątrobowokomórkowy (ang. *hepatocellular carcinoma*) (HCC) jest najczęściej występującym nowotworem wątroby. Jest także jednym z najczęściej występującym nowotworem i drugą najczęstszą przyczyną zgonów związanych z rakiem na świecie ^[1]. Nowotwór ten podlega leczeniu przez chirurgiczną resekcję, przeszczepę, terapię ukierunkowaną na wątrobę lub ogólnoustrojową. Najskuteczniejszą metodą jest leczenie chirurgiczne, jednak tylko 15% pacjentów kwalifikuje się do tego typu leczenia ^[2]. Do najczęstszych czynników ryzyka występowania należą: WZW B, WZW C, marskość wątroby, stłuszczenie wątroby, cukrzyca, uzależnienie od alkoholu, niealkoholowe stłuszczenie wątroby oraz narażenie na związki zawarte w pożywieniu: aflatoksyny i kwas arystocholowy ^[3]. Innymi czynnikami mogą być przewlekłe choroby wątroby, takie jak: przewlekła choroba dróg żółciowych, genetyczne lub metaboliczne choroby wątroby. Jednak szacuje się, że tylko od 5 do 10% przypadków HCC jest przez nie spowodowana ^[4]. Uważa się, że HCC różni się od innych pierwotnych nowotworów złośliwych, ponieważ na rokowanie ma wpływ również stan i podstawowe czynności wątroby. Wyniki leczenia zależą od anatomii, stopnia zaawansowania marskości wątroby i ogólnej kondycji wątroby, a pięcioletnie przeżycie pacjenta szacuje się na mniej niż 20% ^[5].

Udokumentowane zastosowanie owoców *Silybum marianum* w medycynie nazywanego ostropestem plamistym pochodzą z czasów IV wieku p. n. e., kiedy były stosowane w leczeniu skutków po ukąszeniu węża ^[6]. W okresie renesansu nastąpiło ponowne zastosowanie tej rośliny w celu leczenia chorób układu pokarmowego ^[7]. Sylimaryna to standaryzowany ekstrakt otrzymywany z suszonych owoców ostropestu plamistego zawierających od około 70% do 80% kompleksów sylimaryny, a resztę stanowią nieokreślone frakcje, zawierające głównie inne związki polifenolowe. Ta inwazyjna roślina jednoroczna pierwotnie występowała w basenie Morza Śródziemnego, ale obecnie występuje na wszystkich kontynentach – przez to jest szeroko dostępna ^[8].

2. Sylimaryna

Odkrycie w 1968 roku funkcji antytoksycznych i ochronnych dla wątroby rozpoczęło stosowanie wyciągów z ostropestu plamistego. Z początku uważano, że jest jedynym głównym związkiem aktywnym, jednak przeciętny skład ekstraktu z tej rośliny zawiera m.in.: sylibinę, izosylibinę, sylidianinę, sylikrystynę, izosylikrystynę, taksyfolinę oraz inne flawonidy.

Tabela 1. Przedstawia udział procentowy związków wchodzących w skład sylimaryny [opracowanie własne]^[8].

Nazwa związku	Udział procentowy [%]
Sylibina	60-70
Sylikrystyna	20
Sylidianina	10
Izosylibina	5
Taksyfolina	1

Grupa związków posiada właściwości przeciwzwłóknieniowe, przeciwzapalne i hepatoprotekcyjne, co jest szczególnie ważne zarówno w zapobieganiu występowania HCC jak i w potencjalnym leczeniu ^[9]. Ze względu na powyższe właściwości

Ekstrakt sylimaryny otrzymuje się w wyniku sprasowania owoców, w trakcie którego dochodzi do pozbycia się lipidów. Następnie główny składnik zostaje wyekstrahowany przy użyciu rozpuszczalników organicznych, głównie: acetonu, metanolu, etanolu lub octanu etylu i następuje druga ekstrakcja lipidów i zanieczyszczeń, czego efektem końcowym jest otrzymanie sylimaryny ^[10].

3. Zapobieganie HCC

Przewlekłe choroby wątroby CLD (ang. chronic liver disease) są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności mogące przejść w marskość wątroby lub raka wątrobowokomórkowego ^[11]. Zdolność do obniżenia: podwyższonego stężenia enzymów wątrobowych (aminotransferaza alaninowa ALT i aminotransferaza asparaginianowa AST), stresu oksydacyjnego, zapobiegania aktywacji komórek gwiazdzistych wątroby i aktywacji komórek Kupffera zmniejsza uszkodzenia oksydacyjne, zwłóknienie i stany zapalne. W warunkach *in vitro* sylibinina jest silnym zmiataczem reaktywnych form tlenu takich jak: aniony hydroksylowe, nadtlenowe oraz kwas podchlorawy w różnych układach modelowych jak: mikrosomy wątroby szczura, ludzkie płytki krwi, leukocyty, komórki śródbłonna, erytrocyty i fibroblasty. Sylimaryna hamuje peroksydację lipidów, co zmniejsza ilość powstających wolnych rodników, a także stymuluje syntezę białek i fosfolipidów w hepatocytach. Te właściwości chronią komórki wątroby przed uszkodzeniami poprzez stabilizację błony komórkowej oraz zmniejszenie jej przepuszczalności ^[12], a synteza białek hepatoprotekcyjnych zmniejsza syntezę zapalnych prostaglandyn

i leukotrienów [13]. Korzystny wpływ sylimaryny na stałość błon komórkowych pozwala na utrzymanie optymalnego stężenia glutationu, które jest spotęgowane poprzez zwiększenie dostępności cysteiny niezbędnej do jego syntezy [14]. Aby uzyskać efekt przeciwwłóknieniowy należy stosować sylimarynę w dawce 140 mg trzy razy dziennie przez 6-12 miesięcy [11].

4. Leczenie HCC

W ocenie skuteczności potencjalnej terapii przeciwko HCC mierzy się poziom proliferacji linii komórkowej HepG2 (linia komórkowa ludzkiego raka wątroby). Test MTT (metoda kolorymetryczna) przy podaży sylimaryny w dawkach: 50, 75, 100 i 200 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] wskazywał na wzrost hamowania populacji komórek HepG2. Zwiększenie dawki do 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ warunkowało około 80% stagnację proliferacji. W komórkach HepG2 traktowanych dawkami 50 i 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ następowała indukcja apoptozy odpowiednio 14% i 42%, a odsetek jąder apoptycznych wyniósł dla prób kolejno 22% i 59%. Sylimaryna wykazuje wpływ na regulację cyklu komórkowego komórek HepG2, o czym świadczy znacząco zwiększony odsetek komórek z obniżoną wartością DNA po 24 godzinnej inkubacji z porcjami 50 i 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Względem próby kontrolnej dla 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ był to wzrost o 40,78%, a dla 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ było to 61,06% [15].

Cytochrom C jest jednym z głównych czynników apoptotycznych. Istnieje korelacja między potencjałem błony mitochondrialnej, a możliwością przeniknięcia cytochromu do cytozolu i rozpoczęcia apoptozy [15, 16]. Sylimaryna depolaryzuje potencjał błony mitochondrialnej, przez co zwiększa uwalnianie cytochromu C. Sylimaryna zwiększa ekspresję białek proapoptotycznych: p53, Bax i kaspazę-3, z jednoczesnym zmniejszeniem poziomów białek antyapoptotycznych: Bcl-2 i surwiwiny [15]. Badania sugerują przeciwprzerzutowe właściwości sylimaryny poprzez hamowanie ekspresji białka CXCR-4 i modulację poziomu białka Slit-2/Robo-1 w zależności od dawki. Receptor CXCR-4 jest najczęstszym receptorem chemokin, wykazujący wysoki poziom ekspresji w wielu typach nowotworów odgrywając szczególnie ważną rolę w neowaskularyzacji biorąc udział w inwazji raka, progresji i przerzutach [17].

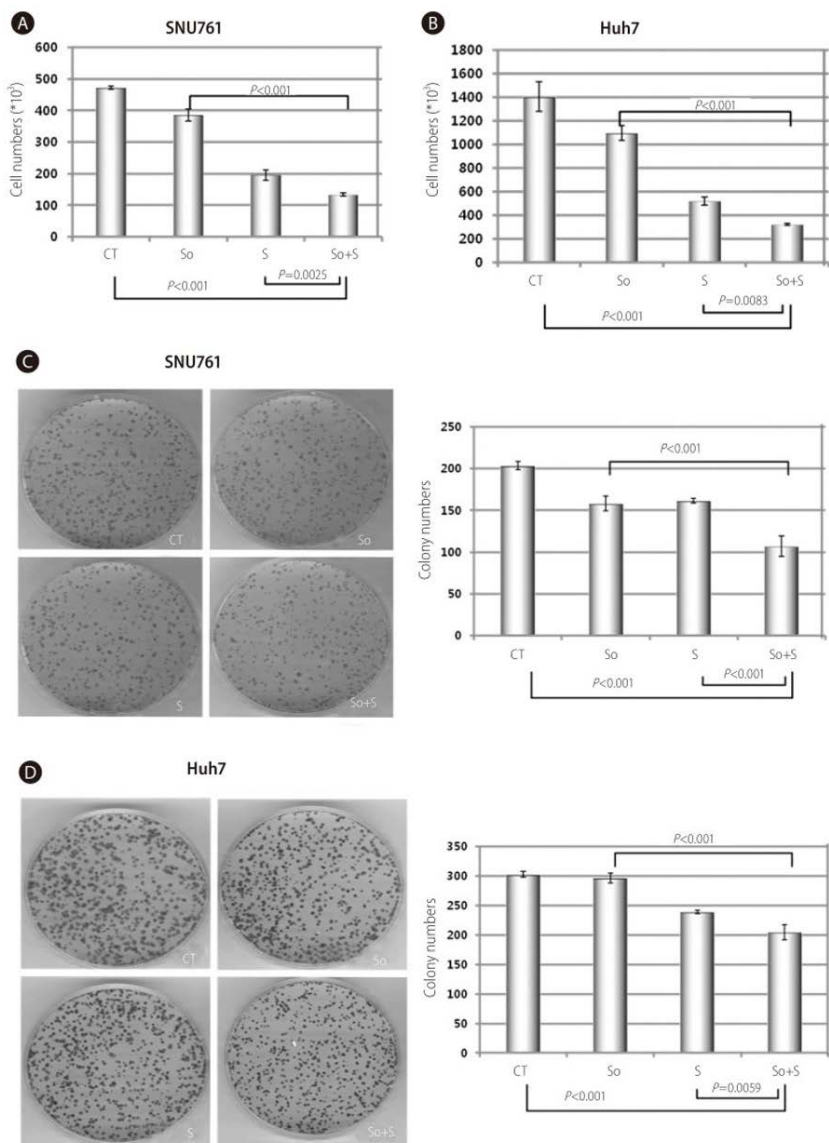
Inną linią komórkową HCC jest Huh7, a jak dowiedli Yassin i współpracownicy niezależnie czy komórki zostały poddane ekstraktowi z Silybum marianum, sylimaryny czy sylibiny dochodziło do znacznego spadku wzrostu komórek Huh7. Możliwość regulacji zarówno linii HepG2 oraz Huh7 wskazuje na szerokie spektrum działania sylimaryny [18].

HCC wykazuje oporność na apoptozę, w której pośredniczy receptor DR5 [19]. W szlaku TRAIL dochodzi do jednej lub większej liczby zmian w obrębie receptora DR5, przez co proces ten nie jest aktywny. Traktowanie komórek HCC sylibiną znacznie zwiększyło liczbę transkryptów DR5 i TRAIL, w tym przypadku zwiększając aktywność kaspazy-3 i kaspazy-8, co potwierdziło aktywację zewnętrznego szlaku apoptozy. Na mysim modelu podaż sylibiny, w dawce 700 mg/kg masy ciała, podawana przez 5 dni w tygodniu (w 4 tygodniowym cyklu), poskutkowała trzykrotnym zmniejszeniem względnej wielkości guza względem zwierząt nieleczonych. Podczas autopsji odnotowano również trzykrotne zmniejszenie masy i objętości guza [20].

Badanie in-vivo na szczurach wykazało, że podawanie sylimaryny zwierzętom znacznie zmniejszyło ilość i wielkość guzów wątroby względem nieleczonych chorych osobników. Dodatkowo zwierzęta poddane terapii odnotowały znaczny wzrost aktywności SOD i CAT i GSH co potwierdza hepatoprotekcyjne działanie sylimaryny nawet w przypadku choroby nowotworowej. W badaniu histopatologicznym wątroba osobników chorych ulegała zmianom strukturalnym. Zmiany naciekały na naczynia wątroby, a same komórki były zróżnicowane. W grupie traktowanej sylimaryną, wykazano niewielką ilość transformowanych nowotworowo komórek i hepatocytów, które były bardziej zbliżone morfologicznie do komórek zdrowych [21].

5. Sylimaryna i sorafenib

Sorafenib jest jednym z leków zatwierdzonych m.in. przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków do leczenia pacjentów z zaawansowanym HCC [22]. Lek ten jest inhibitorem wielu kinaz, który działa na szlaki RAF i VEGD poprzez hamowanie proliferacji i angiogenezy w kilku modelach nowotworów [23]. Pomimo posiadania właściwości przeciwnowotworowych, terapia tym lekiem jest daleka od skutecznej. Sylibina z sorafenibem jest wysoce synergistycznym połączeniem hamującym proliferacją komórek HCC. Sylibina wzmacnia przeciwnowotworowe działania sorafenibu i zmniejsza jego toksyczność [22]. Leczenie skojarzone sylibiną (200 μ M) i sorafenibem (10 μ M) spowodowało apoptozę 56,3% wszystkich komórek HCC, w przypadku, gdy osobne traktowanie sylibiną 18,4%, a sorafenibem 27,4%. Analiza Western Blot ukazała, iż dodatkowo zmniejszył się poziom stężenia białek antyapoptycznych, w tym Mcl-1 i Bcl-2. Podczas badania, na mysim modelu mierzono masę ciała myszy i objętość guza w dniach: 3, 7, 10, 14. Połączenie podawania sylibiny (200mg/kg) i sorafenibu (200 mg/kg) spowodowało 67% regresję



Rycina 1. Na rycinie przedstawiono hamujące wzrost działanie gefitynibu lub sylibiny w komórkach raka wątrobowokomórkowego (HCC). A i B: linie komórkowe Huh7, Huh-BAT, HepG2, SNU475 i SNU761 HCC hodowano w pożywce zawierającej 5% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i traktowano gefitynibem (A, po lewej), sylibininą (A, po prawej) lub dwa w połączeniu (B) przez 72 godz. Otrzymaną żywotność komórek określono stosując test z bromkiem 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowym (MTT). C i D: Połączone działanie gefitynibu (1 μ M) i sylibiny (100 μ M) w komórkach SNU761 (C) i Huh-BAT (D) mierzono za pomocą testu MTT. Wartości CI <1, 1 i >1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. G, gefitynib; S, sylibinina; G+S, gefitynib+silibinina [25].

guza, kiedy dla leczenia osobnego w przypadku sylibininy wyniosła ona 25%, a dla sorafenibu 35%. Do potwierdzenia mechanizmu hamowania rozrostu nowotworu, przeanalizowano fosforylację białek antyapoptotycznych. Hamowanie fosforylacji STAT3, Mcl-1, Bcl-2, a także ekspresji KLF4 i SOX2 w tkankach nowotworowych wykazało większą skuteczność względem monoterapii [24]. Sorafenib w połączeniu z sylibiną wykazuje wzmocniony efekt hamowania linii komórkowych SNU716, Huh7, PLC/PRF i Huh-BAT co ukazuje, iż sorafenib jest w stanie wpływać na ekspresję każdej linii HCC przy jednoczesnym synergizmie z sylibiną [25].

6. Sylimaryna i doksorubicyna

Doksorubicyna (DOX) jest stosowana jako chemioterapeutyk w leczeniu HCC [26]. Zakłóca on syntezę DNA, RNA, hamuje topoiizomerazę II powoduje powstawanie ROS uszkadzających komórki [26, 27]. Połączone stosowanie DOX z sylimaryną wobec komórek HepG2 przez 24 i 48 godzin znacznie zwiększyło apoptozę i martwicę w porównaniu z komórkami kontrolnymi [26]. Sylibinina silnie współdziała z DOX hamując wzrost HEPG2, uszkadzając DNA w miejscu G2-M [28]. Leczenie skojarzone powoduje 41% procentowy wzrost apoptotycznej śmierci komórek, która jest 3-krotnie wyższa, niż w przypadku leczenia pojedynczego [29]. Na szczurzym modelu leczenie sylibinina-doksorubicyna zmniejsza wzrost guza o około 30% przy prawie 2-krotnie niższych dawkach poszczególnych leków [28]. Kompleks DOX z sylibiną w liposomalnej otoczce zmodyfikowanej glikolem polietylenowym zwiększa działanie cytotoksyczne i posiada wyższe działanie indukujące apoptozę komórek Hep2 względem oddzielnej terapii. Zwiększa komórkowy wychwyty DOX i zmniejsza skutki hepato- oraz kardiotoksyczne związane z leczeniem DOX [29]. Przy podaży 1,66 mg/kg, co drugi dzień przez okres 12 dni, u szczurów leczonych DOX doszło do znacznej redukcji masy ciała. W przypadku połączenia leczenia z sylimaryną, spadek masy ciała zmniejszył się, jak również wzrost aktywności AST i CK w surowicy i pobudliwość serca u szczurów były mniejsze, niż w przypadku leczenia samym chemioterapeutykiem. W połączeniu z sylimaryną znacząco zmniejsza się aktywność prooksydacyjna DOX oraz redukują zmiany histologiczne w tkance wątroby i serca zwierząt leczonych DOX [30].

7. Podsumowanie

HCC pozostaje nadal jednym z największych problemów onkologicznych w medycynie, który atakuje miliony pacjentów na świecie. Diagnoza na zbyt późnym etapie choroby często uniemożliwia leczenie chirurgiczne, które ma największą szansę na wyleczenie pacjenta. Ostropest płamisty, wykorzystywany w leczeniu od starożytności, w dzisiejszej medycynie potwierdza swoje hepatoprotekcyjne i przeciwnowotworowe właściwości. Mogący zapobiegać, leczyć i współdziałać z innymi lekami, staje się nową możliwością w terapii przeciwko HCC oraz zapobieganiu chorobie u osób obarczonych ryzykiem, szczególnie po przebyciu WZW lub chorych na alkoholizm. Bardzo ważnym aspektem jest zmniejszanie toksyczności standardowych chemioterapii, zwiększając komfort pacjenta oraz szanse na wyleczenie. Poprzez występowanie w owocach ostropestu płamistego, szeroko przetwarzanego w przemyśle spożywczym, zwiększa się dostęp do potencjalnego leku, przy niewielkim wkładzie finansowym.

Referencje

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-E386. (Styl: Tekst Referencje).
- [2] Roxburgh P, Evans TR. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: are we making progress?. *Adv Ther*. 2008;25(11):1089-1104.
- [3] Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(10):589-604.
- [4] Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(8):448-458.
- [5] Gilles H, Garbutt T, Landrum J. Hepatocellular Carcinoma. *Critical Care Nursing Clinics of North America*. 2022;34(3):289-301.
- [6] Theodosiou E, Purchartová K, Stamatis H, Kollis F, Křen V. Bioavailability of silymarin flavonolignans: drug formulations and biotransformation. *Phytochem Rev*. 2013;13(1):1-18.

- [7] Biedermann D, Vavříková E, Cvak L, Křen V. Chemistry of silybin. *Nat Prod Rep.* 2014;31(9):1138-1157.
- [8] Koltai T, Fliegel L. Role of Silymarin in Cancer Treatment: Facts, Hypotheses, and Questions. *J Evid Based Integr Med.* 2022;27:2515690X211068826.
- [9] Gillessen A, Schmidt HH. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther.* 2020;37(4):1279-1301.
- [10] Simánek V, Křen V, Ulrichová J, Vicar J, Cvak L. Silymarin: What is in the name...? An appeal for a change of editorial policy. *Hepatology.* 2000;32(2):442-444.
- [11] Aghemo A, Alekseeva OP, Angelico F, et al. Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review. *Ann Med.* 2022;54(1):1548-1560.
- [12] Gillessen A, Schmidt HH. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther.* 2020;37(4):1279-1301.
- [13] Khodadoust M, Sharma A, Bruening R, inventors. Bionaut Pharmaceuticals Inc, assignee. Pancreatic cancer treatment using Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors. United States patent US 20070105790A1. 2007 May 10.
- [14] Kwon DY, Jung YS, Kim SJ, Kim YS, Choi DW, Kim YC. Alterations in sulfur amino acid metabolism in mice treated with silymarin: a novel mechanism of its action involved in enhancement of the antioxidant defense in liver. *Planta Med.* 2013;79(12):997-1002.
- [15] Ramakrishnan G, Lo Muzio L, Elinos-Báez CM, et al. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Prolif.* 2009;42(2):229-240.
- [16] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006;13(9):1423-1433.
- [17] Bektur Aykanat NE, Kacar S, Karakaya S, Sahinturk V. Silymarin suppresses HepG2 hepatocarcinoma cell progression through downregulation of Slit-2/Robo-1 pathway. *Pharmacol Rep.* 2020;72(1):199-207.

- [18] Yassin NYS, AbouZid SF, El-Kalaawy AM, Ali TM, Almeahmedi MM, Ahmed OM. Silybum marianum total extract, silymarin and silibinin abate hepatocarcinogenesis and hepatocellular carcinoma growth via modulation of the HGF/c-Met, Wnt/ β -catenin, and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *Biomed Pharmacother.* 2022;145:112409.
- [19] Herr I, Schemmer P, Büchler MW. On the TRAIL to therapeutic intervention in liver disease. *Hepatology.* 2007;46(1):266-274.
- [20] Bousserouel S, Bour G, Kauntz H, Gossé F, Marescaux J, Raul F. Silibinin inhibits tumor growth in a murine orthotopic hepatocarcinoma model and activates the TRAIL apoptotic signaling pathway. *Anticancer Res.* 2012;32(7):2455-2462.
- [21] Ramakrishnan G, Raghavendran HR, Vinodhkumar R, Devaki T. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol Interact.* 2006;161(2):104-114.
- [22] Zappavigna S, Vanacore D, Lama S, et al. Silybin-Induced Apoptosis Occurs in Parallel to the Increase of Ceramides Synthesis and miRNAs Secretion in Human Hepatocarcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2190. Published 2019 May 3.
- [23] McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46:249-279.
- [24] Mao J, Yang H, Cui T, et al. Combined treatment with sorafenib and silibinin synergistically targets both HCC cells and cancer stem cells by enhanced inhibition of the phosphorylation of STAT3/ERK/AKT. *Eur J Pharmacol.* 2018;832:39-49.
- [25] Gu HR, Park SC, Choi SJ, et al. Combined treatment with silibinin and either sorafenib or gefitinib enhances their growth-inhibiting effects in hepatocellular carcinoma cells. *Clin Mol Hepatol.* 2015;21(1):49-59.
- [26] Yurtcu E, İşeri Ö, Sahin F. Genotoxic and cytotoxic effects of doxorubicin and silymarin on human hepatocellular carcinoma cells. *Hum Exp Toxicol.* 2014;33(12):1269-1276.

- [27] Riddick DS, Lee C, Ramji S, et al. Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(8):1083-1096.
- [28] Li WG, Wang HQ. Inhibitory effects of Silibinin combined with doxorubicin in hepatocellular carcinoma; an in vivo study. *J BUON.* 2016;21(4):917-924.
- [29] Li Y, Yang D, Wang Y, Li Z, Zhu C. Co-delivery doxorubicin and silybin for anti-hepatoma via enhanced oral hepatic-targeted efficiency. *Int J Nanomedicine.* 2018;14:301-315. Published 2018 Dec 28.
- [30] Rašković A, Stilinović N, Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S, Mikov M. The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules.* 2011;16(10):8601-8613. Published 2011 Oct 12.

Prezentujemy Państwu drugą z serii monografii z cyklu “Nowoczesne techniki w diagnostyce i leczeniu”. Ta książka poświęcona jest chorobom onkologicznym.

Zwiększająca się długość życia, a także postępująca chemizacja środowiska sprzyjają procesom kancerogenezy. W kolejnych dekadach choroby nowotworowe stanowią coraz większe wyzwania, dlatego też niezbędne są odkrycia dotyczące z jednej strony możliwości wczesnej diagnostyki oraz z drugiej skutecznego leczenia.

Ze wstępu

ISBN: 978-83-67527-75-0

