

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

Postępy Biologii Komórki

VOL. 47, ISSUE 4/2020
(337–426)

www.pbkom.pl

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Redaguje Kolegium – Editors:

Barbara CHWIROT – *biologia komórki, biologia nowotworów botanika bchwiro@umk.pl*

Agata FILIP – *genetyka medyczna, onkologia a.filip@umlub.pl*

Grasyna HOSER – *cytometria, komórki macierzyste graho@cmpk.edu.pl*

Lilla HRYNIEWIECKA – *energetyka komórki, mitochondria lillah@amu.edu.pl*

Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – *neurobiologia, biologia molekularna bozenakk@nencki.gov.pl*

Jerzy KAWIAK – *immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów jkawiak@cmkp.edu.pl*

Wincenty KILARSKI – *mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek wincenty.kilarski@uj.edu.pl*

Andrzej K. KONONOWICZ – *komórki roślinne, regulacja ekspresji genów u Pro- i Eukaryota, inżynieria genetyczna akononow@biol.uni.lodz.pl*

Krzysztof LEWANDOWSKI – *hematologia, onkologia, komórki macierzyste krzysztof.lewandowski@skl.am.poznan.pl*

Marek MALESZEWSKI – *biologia komórki, embriologia zwierząt maleszewski@biol.uw.edu.pl*

Janusz MASZEWSKI – *komórki roślinne, regulacja cyklu komórkowego, organizacja jądra komórkowego i struktura chromatyny jmasz@biol.uni.lodz.pl*

Michał NOWICKI – *hemopoeza, nefrologia, organizacja i rozwój naczyń krwionośnych mnowicki@ump.edu.pl*

Barbara PŁYTYCZ – *immunologia barbara.plytycz@uj.edu.pl*

Zdzisław SMORAG – *klonowanie zwierząt, zwierzęta transgeniczne, regulacja płci, hodowla gamet i zarodków in vitro, sterowan rozród zwierząt zdzislaw.smorag@izoo.krakow.pl*

Maciej ZABEL – *histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek mazab@amp.edu.pl*

Jan ŻEROMSKI – *patologia, immunologia, cytometria jzeromski@amp.edu.pl*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Andrzej ŁUKASZYK – przewodniczący, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŻNICKI, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office:

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań, tel. 61 854 64 53, fax 61 854 64 40 mnowicki@ump.edu.pl

Redaktor techniczny – Zuzanna Podemska-Jedrzejczak zpodemsk@ump.edu.pl

@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – *Foundation for Cell Biology and Molecular Biology*

Indexed in: Biological Abstracts, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Journal Citation Reports/Science Edition, BIOSIS Previews, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey, AGROS.

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Poznań, 2020-12-31

AKWAPORYNY W GRUCZOLE MLEKOWYM ORAZ ICH ROLA W SYNTEZIE MLEKA

AQUAPORINS IN MAMMARY GLAND
AND THEIR ROLE IN MILK SYNTHESIS

Katarzyna MICHAŁEK, Paweł SEŃKO, Mateusz BERNACIAK,
Paulina MAŁKOWSKA, Szymon DYGUŚ,
Wojciech JANKOWSKI, Adam LEPCZYŃSKI

Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki, Wydział Biotechnologii i Hodowli
Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Streszczenie: Akwaporyny (AQPs) są rodziną małych, tetrametrycznych białek umożliwiających transport wody i innych małych cząsteczek przez błony biologiczne zarówno do wnętrza jak i na zewnątrz komórek. U ssaków zidentyfikowano 13 izoform tych białek (AQP0- AQP12), które występują w większości typów komórek organizmu. W gruczole mlekowym stwierdzono obecność 6. akwaporyn (AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7 i AQP9), których rola do dziś nie została w pełni wyjaśniona. Z przeprowadzonych do tej pory badań dotyczących zmian ekspresji akwaporyn w okresie ciąży i laktacji wynika, że AQPs pełnią kluczową rolę w procesie syntezy mleka. AQP1 obserwowano w błonie szczytowej i podstawnej śródbłonna naczyń krwionośnych oraz cytoplazmie komórek wydzielniczych. Prawdopodobnie białko to jest odpowiedzialne głównie za przepływ niezbędnej do produkcji mleka wody z naczyń włosowatych do komórek mlekotwórczych. AQP3 występuje w błonie podstawno-bocznej komórek wydzielniczych i umożliwia transport zarówno wody jak i glicerolu do ich wnętrza. Efektywny transport glicerolu do komórek mlekotwórczych jest konieczny w procesie syntezy tłuszczów mleka. W błonie szczytowej komórek nabłonka pęcherzyków mlekowych obserwowano akwaporynę 4, 5 oraz 7, które najprawdopodobniej umożliwiają przepływ wody do światła pęcherzyków mlekowych, jakkolwiek ich rola do dziś nie jest w pełni wyjaśniona. Analiza lokalizacji i ekspresji akwaporyn, szczegółowe określenie ich roli oraz poszukiwanie czynników regulujących ekspresję AQPs w gruczole mlekowym wydają się bardzo interesujące zwłaszcza w kontekście produkcji mleka i wysokiej wydajności mlecznej. Stąd w niniejszej pracy zebrano i przedyskutowano wszystkie dotychczas opublikowane informacje na ten temat i wskazano szerokie możliwości związane z badaniem akwaporyn w gruczole mlekowym.

Słowa kluczowe: kanał wodny, błonowy transport, woda, glicerol, gruczoł mlekowy

Summary: Aquaporins (AQPs) are a family of small, tetrametric proteins that allow the transport of water and other small molecules across the biological membranes both inside and outside the cells. In mammals, 13 isoforms of these proteins (AQP0-AQP12) have been identified, and they are found in most types of cells in the body. There are 6 aquaporins present in the mammary gland (AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7 and AQP9), which role hasn't been fully discovered to this day. From the studies carried out so far respecting in the expression of aquaporins during pregnancy and lactation, shows that AQPs play a key role in process of milk synthesis. AQP1 was observed in the apical and basal membranes of endothelium of blood vessels and in the cytoplasm of secretory cells. Probably, this protein is mostly responsible for the water flow necessary for milk production from capillaries to mammary epithelial cells. AQP3 is located in the basolateral membranes of secretory cells and allows the transport of both water and glycerol inside them. The effective transport of glycerol to the mammary epithelial cells is necessary to process of synthesis milk fats. Aquaporin 4, 5 and 7 were observed in the apical membrane of cells of alveolar epithelium, which most likely allow the water flow into the lumen of the alveoli, although their role has not been fully explained to this day. The analysis of the location and expression of aquaporins, the detailed definition of their role and the search for factors regulating the expression of AQPs in mammary gland seem very interesting, especially in the context of milk production and high milk yield. Hence, in this work all information for this subject which were published so far has been collected and discussed, and a wide possibility related to the study of aquaporins in mammary gland have been indicated.

Keywords: water channel, membrane transport, water, glycerol, mammary gland

WPROWADZENIE

Dwukierunkowy przepływ wody przez półprzepuszczalną, lipidową błonę komórkową zachodzi głównie na drodze dyfuzji prostej oraz przez kanały wodne – akwaporyny. Choć ten pierwszy mechanizm był znany od dawna to akwaporynę 1 (AQP1) po raz pierwszy zaobserwowano dopiero na przełomie lat 80 i 90 w błonie komórkowej erytrocytów [3]. W roku 1992 białko to wyizolowano i dostarczono bezpośrednich dowodów na to, że AQP1 znana wtedy jeszcze pod nazwą CHIP28 (ang. *Channel Forming Integral Protein 28 kDa*) jest od dawna poszukiwanym kanałem umożliwiającym dwukierunkowy, gwałtowny przepływ wody przez błony komórkowe [1, 37, 45]. Odkrycie akwaporyn i określenie ich roli, uhonorowane w 2003 roku nagrodą Nobla w dziedzinie chemii rozpoczęło nową erę w badaniach błonowego transportu wody i innych, małych cząsteczek. Do dziś przeprowadzono szereg badań, z których wynika, że akwaporyny występują właściwie u wszystkich żywych organizmów. Ich obecność potwierdzono m.in. u bakterii, drożdży, pierwotniaków, roślin, owadów i zwierząt kręgowych. U ssaków zidentyfikowano 13 izoform tych białek, zlokalizowanych w różnych typach komórek (AQP0-AQP12) [3, 5].

Akwaporyny to białka tetrametryczne, których przestrzenna budowa pojedynczego monomeru swoim kształtem przypomina klepsydre (szczegółowa budowa akwaporyn została opisana w poprzednim artykule opublikowanym na

łamacz Postępów Biologii Komórki, Tom 46, 2019) [30]. Białka te umożliwiają gwałtowny przepływ wody przez błony komórkowe, który w porównaniu do dyfuzji prostej jest ponad 100-krotnie wydajniejszy i wynosi średnio 3 miliardy cząsteczek H₂O na sekundę. Kierunek błonowego przepływu wody wyznacza różnica ciśnień osmotycznych panująca pomiędzy wnętrzem komórki, a jej środowiskiem zewnętrznym [4, 36, 44]. Wśród wszystkich znanych u ssaków akwaporyn wyróżniamy tzw. (i) akwaporyny klasyczne (ang. *classical aquaporins*), które selektywnie transportują tylko cząsteczki wody (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 i AQP5); (ii) akwagliceroporyny (ang. *aquaglyceroporins*), które poza wodą umożliwią przepływ innych małych cząsteczek tj. glicerol, amoniak czy mocznik (AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10) oraz (iii) akwaporyny niekonwencjonalne (ang. *unorthodox aquaporins*), które różnią się homologią od pozostałych białek w tej rodzinie, a ich rola transportowa do dziś nie jest w pełni wyjaśniona (AQP6, AQP8, AQP11, AQP12) [28, 29]. Odkrycie akwaporyn i wyjaśnienie nieznanego przez stulecia fundamentalnego procesu, jakim jest gwałtowny przepływ wody przez błony biologiczne, umożliwiło zrozumienie przebiegu wielu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych, w obrębie wielu układów i narządów. Ostatnie dane z tego zakresu wskazują również na istotny udział tych białek w procesie syntezy mleka w gruczole mlekowym.

Mleko to unikatowa wydzielina gruczołu mlekowego ssaków, której skład charakterystyczny dla danego gatunku skomponowany jest tak, aby jak najlepiej zaspokoić wszystkie potrzeby noworodka [27]. Wręcz imponujące ilości produkowanego w czasie laktacji mleka świadczą o niezwykłych zdolnościach tego gruczołu. Średnia życiowa wydajność laktacji hodowlanych krów mlecznych wynosi blisko 36 tysięcy litrów. Przyjmując średnią zawartości tłuszczu w mleku na poziomie 4,23 % oraz średnią zawartość białka w mleku na poziomie 3,38 %, „przeciętna” krowa dostarcza ponad 1500 kg tłuszczu i 1200 kg białka [23]. Kobiety po porodzie mogą produkować w ciągu doby średnio 445 ml mleka co daje blisko 163 jego litrów w czasie jednej laktacji [23]. Synteza charakterystycznej dla danego gatunku zarówno ilości, jak i składu mleka niewątpliwie wymaga szeregu sprawnych mechanizmów obejmujących m.in. transport substancji niezbędnych do biosyntezy poszczególnych jego składników oraz ich uwalnianie do światła przewodów mlekowych. Akwaporyny i związany z nimi transport wody oraz innych małych cząsteczek zarówno do wnętrza, jak i na zewnątrz komórek niewątpliwie odgrywają istotną rolę w tym zakresie.

BUDOWA GRUCZOŁU MLEKOWEGO I SYNTEZA MLEKA

Gruczoł mlekowy jest złożonym gruczolem pęcherzykowo-kanalikowym, którego liczba i wygląd zewnętrzny różni się u samic poszczególnych gatunków zwie-

rząt. Gruczoł mlekowy jest najczęściej wytworem parzystym o liczbie sutków (strzyków) wahającej się od 2 u kobiety, kozy i kłaczy, 4 u krowy do nawet kilkunastu u psa lub świni (zwyczajowo 12-14) [35]. Ze względu na położenie gruczołu mlekowego wyróżniamy m.in. gruczoły piersiowe u kobiety, pachwinowe u kłaczy i przeżuwaczy, brzuszne u kota, psa, myszy, szczura, królika oraz świni, a także grzbietowe u delfinów czy nutrii [35]. Struktura wewnętrzna gruczołu mlekowego jest zbliżona u wszystkich samic, niemniej jednak ulega zmianom w zależności od wieku i cyklu rozrodczego [13]. Tworzą ją liczne pęcherzyki, od których odchodzą kanaliki mlekowe, które łączą się w przewody śródpłacikowe, dalej w przewody międzypłacikowe, a te z kolei, w jeden płatowy przewód mlekowy [39]. U kobiet przewody mlekowe uchodzą na szczycie brodawki sutkowej. Bezpośrednio przed otwarciem ich na powierzchni brodawki tworzą one małe, przejściowe rozszerzenia, nazywane zatokami mlekowymi [9, 39]. U krów, gruczoł mlekowy (wymię) składa się z czterech ćwiartek. W każdej z ćwiartek znajduje się osobna tkanka gruczołowa, której przewody mleczne uchodzą do zatoki mlekowej, przechodzącej następnie w zatokę strzykową i strzyk [11]. Gruczoł mlekowy kłaczy zbudowany jest z dwóch połówek i każda z nich dzieli się na dwa płaty zakończone dwoma ujściami i jednym strzykiem [7]. U owcy oraz kozy każda połowa gruczołu mlekowego zawiera jedną parę gruczołów, zakończonych jednym strzykiem. [6].

Bogato unaczynione pęcherzyki gruczołu mlekowego wyścielone są warstwą sześciennych komórek nabłonkowych mlekotwórczych (wydzielniczych, sekrecyjnych) zwróconych błoną apikalną do ich światła. Od strony podstawnej nabłonek otoczony jest komórkami mioepitelialnymi, które stymulowane oksytocyną ulegają skurczowi i wypierają powstałe w pęcherzykach mleko do kanalików. Komórki mioepitelialne otaczają również jednowarstwowy sześcienny nabłonek wyścielający przewody i zatoki mlekowe oraz strzyki. Większe przewody mlekowe pokryte są wysokim, walcowatym nabłonkiem, który w pobliżu ujścia brodawki sutkowej czy zatoki mlekowej przechodzi w nabłonek wielowarstwowy płaski. Pęcherzyki mlekowe oraz obszerny i rozgałęziony układ przewodów otoczony jest względnie zbitą tkanką włóknistą oraz tkanką tłuszczową [15].

Mleko jest mieszaniną cukrów, lipidów, białek, witamin i składników mineralnych rozpuszczonych w wodzie, która stanowi blisko 88% jego objętości [31]. Procentowy udział składników mleka różni się u kobiet i poszczególnych gatunków zwierząt, co związane jest z indywidualnymi potrzebami noworodka. Skład mleka zmienia się również wraz z przebiegiem laktacji. Podczas jego produkcji w obrębie komórek mlekotwórczych zachodzi szereg procesów związanych m.in. z transportem i syntezą poszczególnych składników mleka z ich prekursorów pochodzących z krwi bądź płynu śródmiąższowego [26]. Docierające do błony podstawnej komórki nabłonka pęcherzyków mlekowych naczynia włosowate dostarczają wodę, składniki mineralne i wszystkie niezbędne substraty do syntezy białek (w tym immunoglobuliny i albuminy), cukrów oraz tłuszczów [39]. Ich

transport zachodzi na drodze pięciu procesów: egzocytozy, transportu błonowego, drodze wydzielania lipidów, transcytozy i wydzielania międzykomórkowego (paracelularnego) [26, 40].

AKWAPORYNY ZLOKALIZOWANE W GRUCZOLE MLEKOWYM

Do dziś w gruczole mlekowym zidentyfikowano 6 izoform akwaporyn (AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7 i AQP9), które zlokalizowane są w określonych typach komórek tworzących jego strukturę (**Tab. 1**). Rola tych białek wciąż nie jest w pełni wyjaśniona, niemniej jednak wyniki opublikowanych dotychczas badań wskazują, że AQPs mogą odgrywać kluczową rolę w syntezie mleka, a zmiany ich ekspresji mogą być istotnym czynnikiem wpływającym na jego ilość i jakość.

AQP1 zlokalizowana jest w gruczole mlekowym u szczurów, myszy i krów [18, 24, 32, 33]. Białko to występuje głównie w błonie szczytowej i podstawnej śródbłonka naczyń krwionośnych oplatających pęcherzyki mlekowe. U jałówek i krów w czasie laktacji obecność tego białka potwierdzono w komórkach mioepitelialnych otaczających nabłonek zatok mlekowych oraz strzyków [18, 32]. U szczurów AQP1 stwierdzono także w cytoplazmie komórek wydzielniczych [33]. Z przeprowadzonych do tej pory badań wiadomo, że AQP3 zlokalizowana jest przede wszystkim w błonie podstawno-bocznej nabłonka pęcherzyków mlekowych [18, 24, 32, 33]. U krów obecność tego białka potwierdzono dodatkowo w błonie podstawnej nabłonka przewodów mlekowych i zatok mlekowych, a także nabłonku i mięśniach gładkich strzyków [18, 32]. U szczurów AQP3 obserwowano również w cytoplazmie komórek nabłonka pęcherzyków, kanalików i przewodów mlekowych [17].

U szczurów i myszy potwierdzono obecność AQP4 w gruczole mlekowym, niemniej jednak jej lokalizację określono tylko u jałówek i krów laktujących [18, 24, 32]. U tych zwierząt białko to zlokalizowane jest w części szczytowej nabłonka wydzielniczego pęcherzyków oraz błonie szczytowej nabłonka zatok mlekowych i strzyków. AQP4 obserwowano również w mięśniach gładkich strzyka. AQP5 u szczurów stwierdzono w błonie szczytowej komórek nabłonka wydzielniczego oraz nabłonka wyścielającego zatoki mlekowe u krów [18, 32, 33]. Występowanie AQP7 w gruczole mlekowym potwierdzono także u zwierząt laboratoryjnych, jakkolwiek do dziś nie jest znana jej dokładna lokalizacja [24]. Przypuszczalnie jej obecność związana jest głównie z występowaniem AQP7 w adipocytach tkanki tłuszczowej gruczołu mlekowego. U bydła AQP7 stwierdzono w błonie szczytowej komórek nabłonkowych niektórych pęcherzyków mlekowych i błonie szczytowej komórek wyścielających kanał strzyków [32]. Obecność AQP9 potwierdzono zarówno u myszy, szczurów i krów [24, 32]. U laktujących krów nie stwierdzono obecności AQP9 w komórkach budujących poszczególne struktury gruczołu mlekowego, a jej lokalizacja ograniczona była do leukocytów w jego obrębie [32].

TABELA 1. Akwaporyny (AQPs) zlokalizowane w gruczole mlekowym i ich rola w syntezie mleka
TABLE 1. Aquaporins (AQPs) located in the mammary gland and their role in the milk synthesis

| Akwaporyna (Aquaporin) | Transportowane cząsteczki (Transported molecules) | Lokalizacja w gruczole (Localization in gland) | Lokalizacja komórkowa (Cellular localization) | Gatunek (Species) | Rola w syntezie mleka (Role in milk synthesis) | Literatura (References) |
|---------------------------|--|---|---|--|--|-----------------------------|
| AQP1 | Woda | Śródbłonek naczyń krwionośnych Komórki mioepitelialne otaczające nabłonek zatok mlekowych i strzyków | Błona szczytowa i podstawna ??? | Szczur, mysz, krowa Krowa | Transport wody z naczyń włosowatych --- | [18, 21, 24, 32, 33] |
| AQP3 | Woda/glicerol/ mocznik/amoniak | Nabłonek pęcherzyków mlekowych Nabłonek pęcherzyków mlekowych Nabłonek przewodów i zatok mlekowych, strzyków Nabłonek pęcherzyków, kanalików i przewodów mlekowych | Cytoplazma Błona podstawno-boczna Błona podstawna Cytoplazma | Szczur Szczur, mysz, krowa, kobieta Krowa Szczur | ??? | [2, 17, 18, 21, 24, 32, 33] |
| AQP4 | Woda | Nabłonek pęcherzyków mlekowych Nabłonek, zatok mlekowych i strzyków | Część szczytowa Błona szczytowa | Mysz [*] , szczur [*] , krowa Krowa | Transport wody do światła pęcherzyków ??? | [18, 32] |
| AQP5 | Woda | Nabłonek pęcherzyków mlekowych Nabłonek zatok mlekowych Nabłonek pęcherzyków mlekowych | Błona szczytowa Błona szczytowa Błona szczytowa | Szczur krowa ^{**} Krowa Krowa, szczur, mysz ^{**} | Transport wody do światła pęcherzyków ??? | [17, 18, 21, 32, 33] |
| AQP7 | Woda/glicerol/ amoniak/ mocznik | Nabłonek strzyków Adipocyty | Błona szczytowa Błona komórkowa | Krowa Krowa | Transport wody i glicerolu do wnętrza komórek ??? | [24, 32] |
| AQP9 | Woda/glicerol/ amoniak/ mocznik | Leukocyty w obrębie gruczołu mlekowego i naczyń krwionośnych | Błona komórkowa | Krowa, szczur ^{***} , mysz ^{***} | Uwalnianie glicerolu do krwiobiegu --- | [32, 18, 43] |

^{*}U szczurów i myszy nie określono szczegółowej lokalizacji AQP4, jakkolwiek potwierdzono obecność tego białka w gruczole mlekowym

^{**}U krów w nabłonku pęcherzyków mlekowych nie określono komórkowej lokalizacji AQP5

^{***}U szczurów i myszy nie określono szczegółowej lokalizacji AQP7, jakkolwiek potwierdzono obecność tego białka w gruczole mlekowym

^{****}U szczurów i myszy nie określono szczegółowej lokalizacji AQP9, jakkolwiek potwierdzono obecność tego białka w gruczole mlekowym

AKWAPORYNY W TRANSPORCIE WODY W OBREBIE GRUCZOŁU MLEKOWEGO

Transport wody z krwi przez śródbłonek naczyń krwionośnych i nabłonek pęcherzyków mlekowych do ich światła, to jeden z ważniejszych procesów w wytwarzaniu i sekrecji mleka. Pomimo tego, że synteza i transport wielu jego składników jest szeroko opisywany w literaturze brak jest wśród nich danych dotyczących gwałtownego przepływu wody poprzez błonowe „bariery” jakie tworzą kolejno śródbłonek naczyń krwionośnych, podstawna i szczytowa błona komórek wydzielniczych. Biorąc pod uwagę, że woda stanowi prawie 90% zawartości mleka, podczas laktacji musi być zapewniony jej stały i efektywny przepływ.

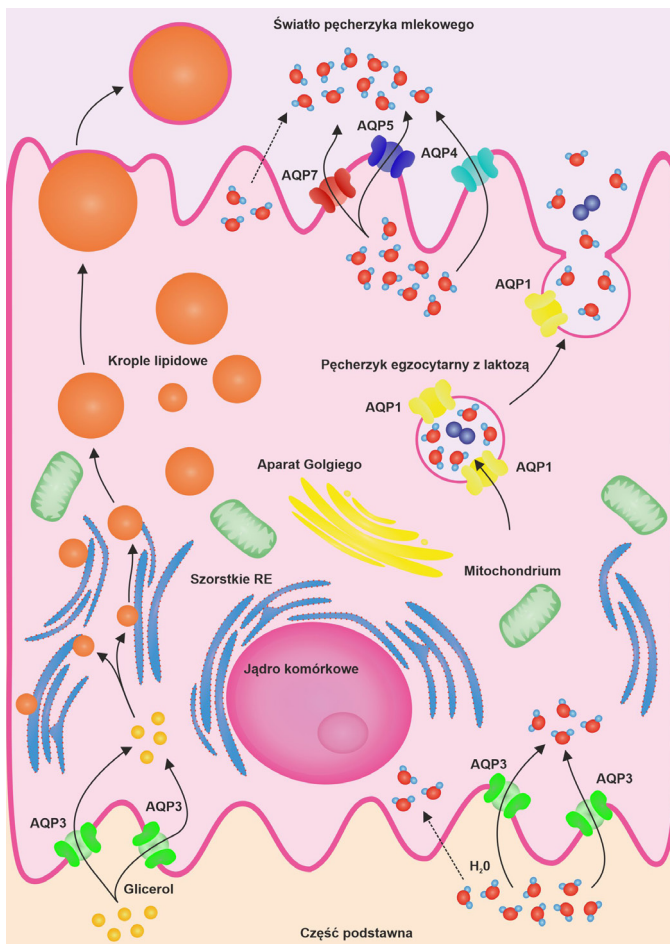
Choć niektórzy autorzy sugerowali, że gwałtowny przepływ wody nie jest niezbędny w procesie syntezy mleka, a stały jej transport na drodze dyfuzji prostej, wraz z pęcherzykami wypełnionymi laktozą oraz przy udziale transporterów tj. transportery dla glukozy (GLUT1) są wystarczające, obecnie znane fakty wydają się temu zaprzeczać [24, 40]. Lokalizacja aż 5 spośród 13 izoform akwaporyn w nabłonku poszczególnych części gruczołu mlekowego oraz zmiany ich ekspresji w czasie ciąży i laktacji jednoznacznie wskazują na istotną rolę tych białek w procesie powstawania mleka. Wydaje się, że główną drogę dla wody przepływającej z naczyń włosowatych poprzez AQP1 do komórek mlekotwórczych stanowi zlokalizowana w ich błonie podstawno-bocznej AQP3 [18, 24, 32, 33]. Wzrost ekspresji tego białka w czasie ciąży i/lub laktacji obserwowany odpowiednio u szczurów, myszy i krów potwierdza te przypuszczenia [18, 32, 33]. Interesujący jest również fakt, że w hodowli *in vitro* komórek nabłonka mlekotwórczego (ang. *mammary epithelial cells*, MECs,) ekspresja AQP3 zwiększa się pod wpływem progesteronu, który jak ogólnie wiadomo jest jednym z hormonów, przygotowujących gruczoł mlekowy do laktacji poprzez stymulację mammogenezy pęcherzykowej [17]. Woda, która wpływa do wnętrza komórki mlekotwórczej przez AQP3 opuszcza ją i trafia do światła pęcherzyka mlekowego najprawdopodobniej poprzez zlokalizowane w błonie szczytowej AQP4, AQP5 i AQP7 [18, 32, 33]. Siłą napędzającą kierunkowy przepływ wody jest panujące wewnątrz pęcherzyków mlecznych wyższe ciśnienie osmotyczne (290-320 mOsm/kg), które jest efektem wydzielanych do ich światła laktozy oraz niektórych jonów, zwłaszcza kationów sodu i anionów chlorkowych [34, 40]. Szczególnie istotną rolę w transporcie wody przez błonę szczytową komórek mlekotwórczych wydaje się odgrywać AQP5. Z przeprowadzonych bowiem ostatnich badań wynika, że białko to tuż przed porodem ulega translokacji z cytoplazmy do błony apikalnej komórek nabłonka pęcherzyków mlekowych. Wykazano również, że wzrost transportu tego białka z wewnątrzkomórkowych pęcherzyków do błony szczytowej obserwowany jest pod wpływem estrogenu i prolaktyny [17]. AQP5 należy do akwaporyn klasycznych, czyli przepuszczalna jest tylko dla cząsteczek wody [29]. Wzrost jej ekspresji w błonie szczytowej komórek mlekotwórczych wskazuje, że AQP5

może stanowić główną drogę przepływu wody do światła pęcherzyków mlekowych, jakkolwiek zagadnienie to wymaga dalszych i bardziej szczegółowych badań, bowiem niektórzy autorzy obserwowali obniżenie jej ekspresji w czasie laktacji [33, 40]. Transport wody przy udziale AQP5 prawdopodobnie wspomagany jest przez zlokalizowane w szczytowej części komórek wydzielniczych AQP4 i AQP7 [18, 24, 32]. Jakkolwiek do dziś brak jest informacji na temat zmian ich ekspresji i dystrybucji w czasie ciąży i/lub laktacji.

Poza śródbłonkiem naczyń włosowatych AQP1 obserwowano również w cytoplazmie komórek wydzielniczych gruczołu mlekowego u szczurów. Jej rola w obrębie nabłonka mlekotwórczego do dziś nie została określona, jakkolwiek wzrost ekspresji tego białka w czasie laktacji świadczy o znaczącym udziale AQP1 w syntezie mleka [33]. Być może AQP1 umożliwia napływ wody do wnętrza pęcherzyków wypełnionych laktozą, które na drodze egzocytozy uwalniane są do światła pęcherzyków mlekowych, i w ten sposób wspomaga błonowy transport wody.

AKWAPORYNY W TRANSPORCIE GLICEROLU I SYNTEZIE LIPIDÓW MLEKA

Tłuszcz jest głównym energetycznym składnikiem mleka, a jego zawartość związana z określonymi potrzebami noworodka wynosi średnio od 1,2% u kłaczy nawet do 50% u wieloryba [8, 42]. U krów średnia zawartość tłuszczu w mleku to 4,2%, u owiec 5,5%, a kobiet 3% [10, 12, 20]. Główną frakcją lipidów mleka są trójglicerydy (TG), które stanowią blisko 98% tłuszczu mleka. Pozostałe 2% stanowią fosfolipidy, cholesterol, diacyloglicerole oraz wolne kwasy tłuszczowe [12, 16]. Synteza tłuszczu zachodzi w siateczce śródplazmatycznej nabłonka pęcherzyków mlekowych. Powstające w obrębie reticulum endoplazmatycznym komórek wydzielniczych kropelki tłuszczu stopniowo przesuwane są do szczytowej ich części, skąd następnie uwalniane są do mleka w postaci obłonionej [40]. Głównym substratem niezbędnym do produkcji tłuszczu mlekowego są glicerol oraz kwasy tłuszczowe, pochodzące z procesów rozkładu i wchłaniania produktów trawienia oraz lipolizy tkanki tłuszczowej [25]. W transport glicerolu poprzez błonę podstawno-boczną do wnętrza komórek wydzielniczych wydaje się być zaangażowana AQP3, która jak wspomniano wcześniej poza wodą transportuje również inne małe cząsteczki, a wzrost jej ekspresji w gruczole mlekowym obserwowano w czasie ciąży i laktacji, a w hodowli *in vitro* MECs pod wpływem progesteronu. Interesujący jest również fakt, że pod wpływem deksametazonu czyli syntetycznego analogu glikokortykoidów, które w warunkach fizjologicznych biorą udział w inicjacji i utrzymania sekrecji mleka po porodzie, w hodowli szczurzych MECs rozporoszona w cytoplazmie AQP3 gromadzi się w błonie podstawno-bocznej [17]. Istotny udział AQP3 w transporcie glicerolu, niezbędnego do syntezy tłuszczu mlekowego potwierdzają również wyniki badań, dotyczących składu mleka w przebiegu zapalenia gruczołu mlekowego – *Mastitis*. Wykazano bowiem, że



RYCINA 1. Schemat przedstawiający udział akwaporyn w syntezie mleka. AQP1 zlokalizowana w cytoplazmie komórek, prawdopodobnie umożliwia transport wody do wnętrza pęcherzyków wypełnionych laktozą, które po fuzji z błoną szczytową uwalniane są do światła pęcherzyków mlekowych. Transport wody do wnętrza komórek wydzielniczych pęcherzyków mlekowych zachodzi na drodze dyfuzji prostej oraz poprzez AQP3 zlokalizowaną w błonie podstawnej. Glicerol, niezbędny do syntezy tłuszczów mleka, transportowany jest do wnętrza komórek również poprzez zlokalizowaną w błonie podstawnej AQP3. Woda z wnętrza komórek wydzielniczych do światła pęcherzyków mlekowych przepływa na drodze dyfuzji prostej oraz poprzez akwaporyny 4, 5 i 7 zlokalizowane w błonie szczytowej

FIGURE 1. Diagram showing the participation of aquaporins in milk synthesis. AQP1, located in the cytoplasm of cells, probably allows the transport of water into alveolus filled with lactose, which after fusion with apical membrane, are released into the lumen of alveolar epithelium. The transport of water inside the cells takes place by simple diffusion and through AQP3 located in the basal membrane. Glycerol, necessary for the synthesis of milk fats, is also transported inside cells through AQP3 located in the basal membrane. Water from the inside of secretory cells to the lumen of the alveolar epithelium flows by simple diffusion and through aquaporins 4, 5 and 7 located in the apical membrane

pod wpływem cytokin prozapalnych (IL-1 β) ekspresja AQP3 w komórkach mlekotwórczych ulega obniżeniu, czego efektem jest zmniejszenie syntezy lipidów w ich obrębie. Na uwagę zasługuje fakt, że ograniczeniu ekspresji tego białka towarzyszyło również obniżenie ekspresji transporterów dla glukozy oraz białek wiążących kwasy tłuszczowe, co dodatkowo spowodowało, redukcję zawartości trójglicerydów w produkowanym mleku, aż o 97% [2].

Niewątpliwie jednym ze źródeł substratów niezbędnych do syntezy tłuszczu mleka jest występująca w obrębie gruczołu mlekowego tkanka tłuszczowa. Podczas ciąży obserwuje się w jej adipocytach nasilenie procesów lipogenezy, a następnie stopniową lipolizę i uwalnianie zmagazynowanych substratów wraz z przebiegiem laktacji [38]. Ogólnie wiadomo, że w adipocytach żółtej tkanki tłuszczowej powstały w procesie rozkładu tłuszczu glicerol uwalniany jest do krwiobiegu poprzez zlokalizowane w ich błonach komórkowych AQP3, AQP7 i AQP9 [41]. Ekspresja i lokalizacja tych białek jest ściśle regulowana i zależna od adrenaliny, greliny i leptyny [14]. Wykazano m.in., że zlokalizowane w cytoplazmie adipocytów, w kroplach lipidowych AQP3 i AQP7 pod wpływem adrenaliny ulegają translokacji do błony komórkowej, i tym samym zwiększają uwalnianie do krwiobiegu glicerolu [19]. W adipocytach tkanki tłuszczowej gruczołu mlekowego do dziś potwierdzono obecność tylko AQP7. Brak jest informacji na temat AQP3 i AQP9 oraz ewentualnego wpływu różnych czynników, w tym hormonów na potencjalne zmiany ich ekspresji i komórkowej dystrybucji.

PODSUMOWANIE

Należy zgodzić się ze słowami Mobasheri i Berrett-Jollet [31], że pomimo ogromnego postępu wiedzy, fizjologia gruczołu mlekowego wciąż pozostaje zagadką. Jego złożona struktura, wzrost i rozwój w czasie ciąży, synteza mleka po porodzie, involucja po zakończeniu laktacji pozostają głównym przedmiotem badań wielu naukowców, którzy analizują molekularne mechanizmy zachodzące w jego obrębie w różnych aspektach. Rola akwaporyn w kontekście produkcji mleka i wysokiej wydajności mlecznej wydaje się szczególnie interesująca. Zwłaszcza możliwości związane ze wspomaganiami laktacji poprzez oddziaływanie na poszczególne AQPs zlokalizowane w gruczole mlekowym u hodowlanych zwierząt mlecznych. Ogólnie wiadomo, że właściwa dieta wraz z odpowiednimi suplementami mogą skutecznie wspomagać laktację. Z przeprowadzonych do tej pory badań wiadomo, że np. stosowanie odpowiednich mieszanek ziołowych istotnie zwiększa ekspresje AQP3 i AQP5 w gruczole mlekowym [21]. Czy stosowanie innych do tej pory nie znanych czynników może skutecznie pozwolić na zwiększenie wydajności mlecznej? Czy celowe zmiany ekspresji poszczególnych

AQPs nie będą przyczyną nowotworzenia w obrębie gruczołu mlekowego? Wiadomo bowiem, że nadekspresja AQP3 towarzyszy szeregowi procesów nowotworowych, w tym nowotworów piersi [22]. Jaką rolę pełnią akwaporyny zlokalizowane poza komórkami wydzielniczymi pęcherzyków mlecznych, w nabłonku kanalików czy zatok mlekowych? Czy ich obecność jak wskazują Mobasher i Barret-Jolley [31] świadczy o tym, że w tych odcinkach zachodzi dodatkowa modyfikacja składu mleka? Te i inne pytania wciąż pozostają bez odpowiedzi, co bez wątplenia utwierdza w przekonaniu, że należy kontynuować badania i pogłębiać wiedzę w tym zakresie.

LITERATURA

- [1] AGRE P, SABOORI AM, ASIMOS A, SMITH BL. Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J Biol Chem*, 1987; **262**(36): 17497-17503.
- [2] AL-FARHAA, HEMMATZADEH F, KHAZANDI M, HOARE A, PETROVSKI K. Evaluation of effects *Mycoplasma mastitis* on milk composition in dairy cattle from South Australia. *BMC Veterinary Research* 2017; **13**(1): 351.
- [3] BENGA G. Water transport in red blood cell membranes. *Prog. Biophys. Mol Biol.* 1988; **51**: 193-245.
- [4] BINESH AR, KAMALI R. Molecular Dynamics insights into human aquaporin 2 water channel. *Biophys Chem* 2015; **207**: 107-113.
- [5] BROWN D. The discovery of water channels (Aquaporins). *Ann Nutr Metab* 2017; **1**: 37-42.
- [6] BRUCKMAIER RM, RITTER C, SCHAMS D, BLUM JW. Machine milking of dairy goats during lactation: Udder anatomy, milking characteristics, and blood concentrations of oxytocin and prolactin. *J Dairy Res* 1994; **61**(4): 457-466.
- [7] DAMIAN A, SOCACIU A, CHIRILEAN I, STAN F, GUDEA A, CRIȘAN M, DEZROBITU C, TUNS F, POP A, AYMAN AR. Anatomical studies regarding the arterial vascular system of mammary gland in camel, cow and mare. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 2009; **66**(1): 47-53.
- [8] DANKÓW R, PIKUL J, OSTEN-SACKEN N, TEICHER J. Charakterystyka i właściwości prozdrowotne mleka kłaczy. *Nauka Przyr. Technol.* 2012; **6**(2):#16.
- [9] GEDDES DT. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. *J Midwifery Womens Health* 2007; **52**(6): 556-563.
- [10] GELASAKIS A, GIANNAKOU R, VALERGAKIS G, FORTOMARIS P, KOMINAKIS A, ARSENIOS G. Prediction of sheep milk chemical composition using milk yield, pH, electrical conductivity and refractive index. *J Dairy Res* 2018; **85**(1): 78-82.
- [11] GOŁĘBIEWSKI M, KALIŃSKA A. Budowa anatomiczna wymienia oraz mechanizmy syntezy mleka. *Farmer* 2018; **2**: 178- 181.
- [12] GROTE V, VERDUCI E, SCAGLIONI S, VECCHI F, CONTARINI G, GIOVANNINI M, KOLETZKO B, AGOSTONI C. Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. *Eur J Clin Nutr* 2016; **70**(2): 250-256.
- [13] HASSIOTOU F, GEDDES D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 2013; **26**(1): 29-48.
- [14] IENA F, LEBECK J. Implications of Aquaglyceroporin 7 in Energy Metabolism. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(1): 154.
- [15] INMAN JL, ROBERTSON C, MOTT JD, BISSEL MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *The Company of Biologists* 2015; **142**(6): 1028-1042.

- [16] JENSEN R, NEWBURG D. Bovine milk lipids. Handbook of Milk Composition. *Academic Press* 1995; 543-575.
- [17] KAIHOKO Y, TSUGAMI Y, SUZUKI N, SUZUKI T, NISHIMURA T, KOBAYASHI K. Distinct expression patterns of aquaporin 3 and 5 in ductal and alveolar epithelial cells in mouse mammary glands before and after parturition. *Cell Tissue Res.* 2020; **10.1007**.
- [18] KENDALL B, MAXWELL J, GERMAN A, MARPLES D, ROYAL M, MOBASHERI A. Immunohistochemical localisation of aquaporin water channels in the bovine mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007; **10.1017**:1.
- [19] LAFORENZA U, BOTTINO C, GASTALDI G. Mammalian aquaglyceroporin function in metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016; **1858**(1):1-11.
- [20] LINDMARK-MÄNSSON H. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res.*, 2008; **52**.
- [21] LIU H, HUA Y, LUO H, SHEN Z, TAO X, ZHU X. An herbal galactagogue mixture increases milk production and aquaporin protein expression in the mammary glands of lactating rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; **2015**: 760585.
- [22] MARLAR S, JENSEN H, LOGIN F, NEJSUM L. Aquaporin-3 in Cancer. *Int J Mol Sci* 2017; **18**(10): 2106.
- [23] MARTENS H, BANGE C. Longevity of high producing dairy cows: a case study. *Lohmann Information* 2013; **48**(1): 53-57.
- [24] MATSUZAKI T, MACHIDA N, TAJIKA Y, ABLIMIT A, SUZUKI T, AOKI T, HAGIWARA H, TAKATA K. Expression and immunolocalization of water-channel aquaporins in the rat and mouse mammary gland. *Histochem Cell Biol* 2005; **123**(4-5):501-12.
- [25] MCMANAMAN JL. Formation of milk lipids: a molecular perspective. *Clin Lipidol.* 2009; **4**(3): 391-401.
- [26] MCMANAMAN JL, NEVILLE MC. Mammary physiology and milk secretion, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; **55**(5): 629-641.
- [27] MEDINA D. 1996. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996; **1**(1): 5-19.
- [28] MICHAŁEK K. Aquaglyceroporins in the kidney: present state of knowledge and prospects. *J Physiol Pharmacol* 2016; **67**(2): 185-193.
- [29] MICHAŁEK K, GRABOWSKA M. Investigating cellular location of aquaporins in the bovine kidney. A new view on renal physiology in cattle. *Res. Vet. Sci.* 2019; **125**: 162-169.
- [30] MICHAŁEK K, MAŁKOWSKA P. Aquaporins located in the skin. A new challenge for modern dermatology and cosmetology. *Postepy Biologii Komórki* 2019; **46**(1): 3-18.
- [31] MOBASHERI A, BARRETT-JOLLEY R. Aquaporin Water Channels in the Mammary Gland: From Physiology to Pathophysiology and Neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2014; **19**(1), 91-102.
- [32] MOBASHERI A, KENDALL BH, MAXWELL JE, SAWRAN AV, GERMAN AJ, MARPLES D, LUCK MR, ROYAL MD. Cellular localization of aquaporins along the secretory pathway of the lactating bovine mammary gland: an immunohistochemical study. *Acta Histochemica* 2011; **113**(2):137-149.
- [33] NAZEMI S, RAHBEK M, PARHAMIFAR L, MOGHIMI SM, BABAMORADI H, MEHRDANA F, KLÆRKE DA, KNIGHT CH. Reciprocity in the developmental regulation of aquaporins 1, 3 and 5 during pregnancy and lactation in the rat. *PLoS One* 2014; **9**(9):e106809.
- [34] NEGERO H, HONDA K, FUKUOKA T, HIGUCHI T. Effect of rise in plasma osmotic pressure on the milk-ejection reflex in the rat. *Endocrinol Jpn.* 1983;**30**(3): 361-366.
- [35] NICKERSON SC, AKERS RM. Mammary Gland Anatomy *Ency Dairy Sci, Second Edition* 2011; **3**: 328-337.
- [36] NIELSEN S, FROKLER J, MARPLES D, KWON TH, AGRE P, KNEPPER MA. Aquaporins in kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev*, 2002; **82**(1): 205-244.

- [37] PRESTON GM, CARROLL TP, GUGGINO WP. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science (New York)* 1992; **25**: 385-387.
- [38] PUJOL E, PROENZA A, ROCA P, LLADO I. Changes in mammary fat pad composition and lipolytic capacity throughout pregnancy. *Cell Tissue Res* 2006; **323**: 505-511.
- [39] ROMASZKO E. Synteza mleka ludzkiego. *Pediatrics Polska* 2012; **87**(5): 467-471.
- [40] SHENNAN DB, PEAKER M. Transport of Milk Constituents by the Mammary Gland. *Physiological Rev.* 2000; **80**(3): 925-951.
- [41] SKOWRONSKI MT, LEBECK J, ROJEK A, PRAETORIUS J, FÜCHTBAUER EM, FRØKIAER J, NIELSEN S. AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; **292**(3):F956-65.
- [42] SZELESZCZUK O, KILAR P, NIEDBAŁA P. Zawartość tłuszczu oraz profil kwasów tłuszczowych w mleku fermowych psowatych. *Wiadomości Zootechniczne* 2017; **4**: 22-29.
- [43] TSUKAGUCHI H, SHAYAKUL C, BERGER UV, MACKENZIE B, DEVIDAS S, GUGGINO WB, VAN HOEK AN, HEDIGER MA. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem.* 1998; **273**(38):24737-43.
- [44] VERKMAN A.S. A cautionary note on cosmetics containing ingredients that increase aquaporin-3 expression. *Exp Dermatol*, 2008; **17**(10): 871-872.
- [45] ZEIDEL ML, AMBUDKAR SV, SMITH BL, AGRE P. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochem.* 1992; **33**: 7436-7440.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 09.10.2020

Przyjęto: 16.11.2020

Katarzyna Michalek

Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin

e-mail: kmichalek@zut.edu.pl

tel.: 0048 91 449 67 73

NOWOCZESNE TERAPIE CELOWANE W LECZENIU NOWOTWORÓW JAKO ALTERNATYWA DLA KONWENCJONALNEJ CHEMIOTERAPII

MODERN TARGETED THERAPIES FOR CANCER TREATMENT AS AN ALTERNATIVE FOR CONVENTIONAL CHEMOTHERAPY

Sandra CHMIELEWSKA¹, Aneta ZAMBRZYCKA³, Urszula CZYŻEWSKA²,
Magdalena CZERNIECKA², Adam TYLICKI²

¹Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet w Białymstoku

²Pracownia Cytobiochemii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii,
Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

³Argenta Sp. z o.o., Poznań

Streszczenie: Z każdym kolejnym rokiem liczba osób ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową szybko wzrasta. Z drugiej strony wiadomo, że nowotwory są jedną z głównych przyczyn zgonów ludzi na świecie. Standardowe metody leczenia nowotworów takie jak chirurgia, radioterapia czy chemioterapia nierozzerwalnie wiążą się z poważnymi skutkami ubocznymi w trakcie i po leczeniu. Wynika to z ich inwazyjności i braku wybiórczego działania. Obecne zmiany w strategii zwalczania nowotworów kierują terapię w stronę poszukiwania metod precyzyjnego dotarcia do komórek zmienionych nowotworowo, ich naprawy lub eliminacji. Taka zmiana wymusiła poszukiwanie metod, które reprezentują inne, mniej destrukcyjne dla organizmu, podejście do walki z nowotworami. Poniższa praca prezentuje metody immunoterapii, wykorzystanie zmodyfikowanych limfocytów T (projektowanych indywidualnie dla każdego pacjenta) oraz eksperymentalne próby wykorzystania interferencji RNA (pozwalającej na przywracanie prawidłowej ekspresji genów w zmienionych nowotworowo komórkach) w konfrontacji ze standardową chemioterapią. Efekty, jakie przynoszą te alternatywne w stosunku do chemioterapii metody, mimo że ich potencjał nie jest jeszcze w pełni wykorzystany, pokazują, że w niedalekiej przyszłości leczenie nowotworów ma szansę stać się bardziej skuteczne, a związane z nim skutki uboczne mogą być znacznie łagodniejsze w porównaniu z tymi występującymi w wyniku chemioterapii.

Słowa kluczowe: cytostatyki, CAR-T, immunoterapia, interferencja RNA, nanocząsteczki

Summary: In the following years, the number of people diagnosed with cancer grows rapidly. On the other hand, it is known that cancer is one of the leading causes of human death in the world. Standard cancer treatments, such as surgery, radiation therapy, and chemotherapy, are inherently associated with serious side effects during and after treatment due to their invasiveness and lack of selective action. The current changes in the strategy of fighting cancer guide the therapy towards searching for methods of precisely reaching neoplastic cells, their repair or elimination. Such change of treatment strategy has forced the search for methods that represent a different, less destructive for the patient, approach to fighting cancer. The following work presents methods of immunotherapy, the use of modified T lymphocytes (designed individually for each patient), and experimental attempts to use RNA interference (allowing the restoration of normal gene expression in cancer cells) in confrontation with standard chemotherapy. The effects of these alternative to chemotherapy methods, although their potential is not fully exploited yet, but show that in the near future cancer treatment may become more effective, and the associated side effects may be less severe in comparison with standard chemotherapy.

Keywords: cytostatics, CAR-T, immunotherapy, RNA interference, nanoparticles

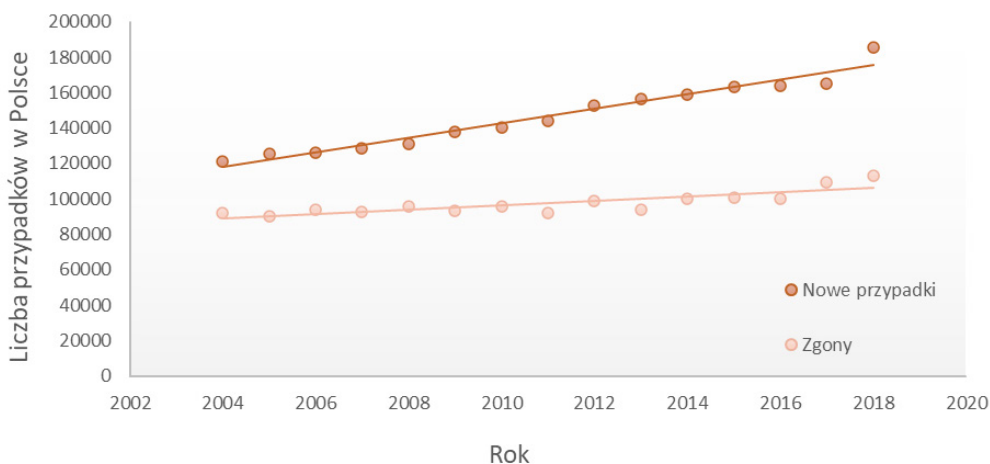
WSTĘP

Wskaźniki zachorowalności i śmiertelności na nowotwory z każdym rokiem rosną, zarówno w przypadku kobiet jak i mężczyzn, co sprawia, że obok chorób układu krążenia, jest to niezmiennie jedna z głównych przyczyn zgonów na świecie. Według ogólnoswiatowych danych statystycznych w 2018 r. zdiagnozowano nowotwór u 18,1 miliona osób, natomiast 9,6 miliona ludzi zmarło w wyniku tej choroby [4, 91]. Przyczyn takiego stanu rzeczy upatruje się we wzrastającym zanieczyszczeniu środowiska, nieprawidłowej diecie opartej o produkty wysoko przetworzone, niskiej aktywności fizycznej, a także nadużywaniu alkoholu i paleniu tytoniu przez znaczną część społeczeństwa. Ważnym czynnikiem są także niektóre patogeny takie jak wirusy (np. wirus HPV) oraz bakterie (np. *Helicobacter pylori*), które zwiększają ryzyko wystąpienia określonych typów nowotworów [15, 25, 36, 91]. Najbardziej powszechnym na świecie typem nowotworu, będącym przyczyną 1,8 mln zgonów w 2018 r., jest nowotwór płuc. Kolejne pod względem częstości zachorowań są rak prostaty, piersi, a także jelita grubego. W 2018 r. oszacowano, że u jednego na ośmiu mężczyzn i jednej na dziesięć kobiet rozwinie się nowotwór. Dane prognostyczne nie są optymistyczne. Biorąc pod uwagę aktualny trend, w 2040 r. liczba nowych stwierdzonych przypadków choroby nowotworowej będzie wynosiła 27 milionów [4, 91]. W Polsce, podobnie jak na świecie, liczba zdiagnozowanych nowotworów rocznie ciągle wzrasta. W 2010 r. stwierdzono ponad 140 tysięcy nowych przypadków, natomiast w 2018 r. już około 186 tysięcy. Optymizmem napawa fakt, że mimo tej tendencji liczba

zgonów w Polsce w wyniku tych chorób utrzymuje się od kilku lat na względnie stałym poziomie – około 100 tysięcy rocznie, nie wykazując wzrostu równoległego do nowych przypadków (**Ryc. 1**) [66, 70, 92, 93]. Z danych tych można wnioskować, że metody leczenia nowotworów dają coraz lepsze efekty. Niestety nie w każdym kraju obserwuje się taką zależność. Wynika to przede wszystkim z różnic w poziomie rozwoju i stanu opieki zdrowotnej poszczególnych państw [91].

Obecnie dokonuje się fundamentalna zmiana strategii leczenia nowotworów skutkująca wprowadzaniem nowych sposobów terapii, co w połączeniu ze wzrostem świadomości społecznej daje zauważalne efekty terapeutyczne. Wprowadzane są alternatywne w stosunku do konwencjonalnej chemioterapii, radioterapii czy chirurgii metody leczenia. Do takich metod walki z nowotworami można zaliczyć terapie celowane takie jak immunoterapia czy terapie genowe.

Za główną wadę konwencjonalnej chemioterapii uznaje się nieselektywne działanie na komórki szybko dzielące się, zarówno na te zmienione nowotworowo, jak i na zdrowe, co objawia się poważnymi skutkami ubocznymi. Zmiana strategii leczenia, z nieselektywnej na celowaną, stanowi obecnie dobre uzupełnienie terapii konwencjonalnych, a w przyszłości może je zastąpić.



RYCINA 1. Liczba nowych stwierdzonych przypadków zachorowania na nowotwór oraz liczba zgonów w wyniku tej choroby w latach 2004-2018 w Polsce [66, 70, 91, 92, 93]

FIGURE 1. The number of new diagnosed cases of cancer and the number of deaths as a result of this disease in 2004-2018 in Poland [66, 70, 91, 92, 93]

KONWENCJONALNE METODY WALKI Z NOWOTWORAMI

Aktualnie w walce z nowotworami najczęściej stosuje się trzy standardowe metody leczenia: chemioterapię, radioterapię oraz chirurgię. Najmłodszą z tych metod, czyli chemioterapię polegającą na wykorzystaniu leków cytostatycznych, opracowano w połowie XX wieku, a jej rozwój przypadł na przełom XX i XXI wieku [16, 31]. Metoda ta obecnie stanowi ważny element terapii zarówno guzów litych jak i nowotworów układu krwiotwórczego, a połączenie metod konwencjonalnych jest standardowym podejściem w leczeniu onkologicznym, dając stosunkowo dobry efekt terapeutyczny [71]. Niestety niesie to ze sobą szereg skutków ubocznych. Wypadanie włosów, nudności oraz wymioty, wiążąca się z tym utrata apetytu, czy też zaburzenia czynności szpiku kostnego to nieodłączny element większości chemioterapii. Dodatkowo mogą się rozwijać nowe jednostki chorobowe nawet na długo po zakończeniu chemioterapii, np. zwłóknienie tkanki płucnej, bezpłodność, zaburzenia rytmu serca, a także neuropatie obwodowe (**Ryc.2**) [13, 57]. Dlatego też konwencjonalne podej-

| Grupa leków cytostatycznych | Mechanizm działania | Charakterystyczne skutki uboczne | Przykłady leków |
|-----------------------------|---|--|--|
| Leki alkilujące | Przylączenie rodników alkilowych do DNA, RNA lub białek; niezależnie od fazy cyklu komórkowego | Zaburzenia funkcjonowania szpiku, zwłóknienie tkanki płucnej, neuropatia obwodowa | Cyklofosfamid, chlorambucyl, tiotepa, busulfan, temozolomid, mannosulfan, cisplatyna |
| Antymetabolity | Hamowanie enzymów uczestniczących w syntezie kwasów nukleinowych; działanie głównie na fazę S cyklu komórkowego | Zapalenie wątroby, zwłóknienie tkanki płucnej, encefalopatia, uszkodzenia nerek | Metotretksat, fluorouracyl, kladrybina |
| Inhibitory mitozy | Wpływ na poziom stabilizacji mikrotubul; oddziaływanie w fazie M podziału komórkowego | Neuropatia obwodowa, drętwienie kończyn, problemy ze słuchem, utrata masy mięśnia sercowego, arytmia | Alkaloidy Vinca, taksany (docetaksel i paklitaksel) |
| Antybiotyki cytostatyczne | Zróżnicowane oddziaływanie uszkadzające DNA; Mogą oddziaływać na fazę M lub S cyklu komórkowego; | Kardiotoksyczność, mielotoksyczność | Antracykliny (doksorubicyna, daunorubicyna, epirubicyna) |

RYCINA 2. Mechanizm działania i charakterystyczne skutki uboczne wybranych grup leków cytostatycznych [8, 10, 13, 26, 32, 48, 51, 54, 55, 57, 60, 63, 65, 79, 89, 100]

FIGURE 2. Mechanism of action and characteristic side effects of selected groups of cytostatic drugs [8, 10, 13, 26, 32, 48, 51, 54, 55, 57, 60, 63, 65, 79, 89, 100]

ście do leczenia nowotworów zazwyczaj związane jest z jednoczesnym leczeniem występujących skutków ubocznych, co może znacząco obniżyć skuteczność terapii, wpływając negatywnie na ogólny stan pacjenta, a także dodatkowo zwiększa koszty leczenia [13, 79].

LEKI CYTOSTATYCZNE KIEDYŚ I DZIŚ

Chemioterapia polega na wprowadzeniu do organizmu substancji cytostatycznych, które poprzez swoje nieselektywne działanie wpływają destrukcyjnie lub hamująco na proliferację komórek zarówno nowotworowych, jak i normalnych. W zależności od mechanizmu działania leki cytostatyczne dzieli się na grupy, które oddziałują na różne etapy cyklu komórkowego lub niezależnie od niego. Stąd też wynika ich zastosowanie w różnych typach nowotworów. Wyróżnia się m.in. leki alkilujące, antymetabolity, inhibitory mitozy oraz antybiotyki cytostatyczne [13, 17]. Do terapii przeciwnowotworowej stosunkowo niedawno zaczęto wykorzystywać także talidomid, który pierwotnie był stosowany jako lek przeciwdepresyjny [49].

Leki alkilujące (np. cyklofosfamid, chlorambucyl, tiotepa, busulfan, temozolomid, mannosulfan, cisplatyna) to substancje, których cytotoksyczne działanie polega na przyłączaniu rodników alkilowych do DNA, RNA lub białek, co powoduje zaburzenia podstawowych procesów genetycznych: replikacji i transkrypcji, a także innych procesów metabolicznych. Jest to jedyna grupa leków cytostatycznych, które działają niezależnie od fazy cyklu komórkowego [63]. Związki alkilujące zostały wykorzystane jako broń chemiczna już podczas I Wojny Światowej (gaz bojowy – iperyt). Jednak dopiero w 1942 r. powiązano działanie tej substancji z uszkodzeniem szpiku i objawami pancytopenii występującymi kilka dni po zatruciu iperytem, co doprowadziło do odkrycia chlorowodoru chlormetyny – nitrogranulogenu, który stał się pierwszym lekiem przeciwnowotworowym z grupy iperytów azotowych. W 1949 r. nastąpiło oficjalne zatwierdzenie przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) chlormetyny (Mustargen) jako leku alkilującego [28, 63]. Leki te obejmują kilka grup substancji. Są stosowane w leczeniu większości typów nowotworów złośliwych, m.in. w nowotworach krwi, prostaty, jajników, piersi, płuc, a także w przypadku nowotworów układu nerwowego i pokarmowego [63, 65]. Do skutków ubocznych występujących w terapii lekami alkilującymi zalicza się m.in. zahamowanie aktywności układu krwiotwórczego, zwłóknienie tkanki opłucnej, neuropatie obwodowe, a w przypadku chlorambucylu może dojść do rozwoju białaczki [65, 79]. Nowe generacje leków alkilujących obejmują grupy związków pochodzenia naturalnego jak tetrahydroizochinoliny czy illudyny. Ich cechą wyróżniającą jest oddziaływanie z mniejszym rowkiem helisy DNA, podczas gdy starsze generacje oddziałują z dużym rowkiem, co sprawia że mogą być skuteczne w zwalczaniu nowotworów opornych na starsze generacje leków [5, 63]. Aktualnie w użyciu jest niewiele leków z nowej generacji, można do nich zaliczyć np. Trabectedin, który znalazł zastosowanie w leczeniu mięsaków tkanek miękkich oraz jednego z typów nowotworu jajnika [14].

Antymetabolity (np. metotreksat, fluorouracyl, kladrybina) jest to grupa leków, które oddziałują hamująco na enzymy biorące udział w syntezie kwasów nukleinowych. Pierwszym lekiem z tej grupy był metotreksat, należący do antagonistów kwasu foliowego, z powodzeniem wprowadzony do leczenia ostrych białaczek u dzieci w 1947 r. Jest to lek hamujący fazę S cyklu komórkowego. Poza nowotworami krwi stosuje się go także w niektórych nowotworach litych, np. w nowotworze piersi [38, 43, 89]. Metotreksat jako analog kwasu foliowego hamuje jego redukcję do kwasu tetrahydrofoliowego, niezbędnego w procesach syntezy zasad purynowych i pirymidynowych, poprzez inaktywację enzymu reduktazy dihydrofolianowej. Dodatkowo cytostatyk ten przejawia powinowactwo do syntazy tymidylanowej, która jest enzymem katalizującym przekształcenie uracylu do tyminy. Kumulacja działania hamującego oba wyżej wymienione enzymy prowadzi do wyczerpania wewnątrzkomórkowych zasobów puryn i pirymidyn, które pełnią istotną rolę w syntezie DNA i RNA oraz wchodzą w skład koenzymów. W rezultacie dochodzi do zaburzeń syntezy kwasów nukleinowych, na co szczególnie wrażliwe są intensywnie dzielące się komórki nowotworowe. Działanie metotreksatu prowadzi więc do zahamowania aktywności podziałowej i śmierci komórek [89, 100]. Przyjmowanie antymetabolitów wiąże się z wieloma powikłaniami, do bardziej charakterystycznych należą zapalenie wątroby, zwłóknienie tkanki płucnej, encefalopatie, a także uszkodzenia nerek [32]. Przez lata przeprowadzono wiele badań dotyczących stosowania suplementacji kwasu foliowego w celu zniwelowania skutków ubocznych działania metotreksatu. W wyniku metaanalizy z 2013 r. wykazano, że codzienna, jak i cotygodniowa suplementacja kwasem foliowym znacznie zmniejsza częstość występowania działań niepożądanych, a tym samym zwiększa tolerancję na metotreksat [23, 75].

Inhibitory mitozy, do których można zaliczyć alkaloidy barwinka (*Vinca*) i taksany (naturalnie syntetyzowane przez rośliny z rodzaju *Taxus*), działają cytostatycznie hamując fazę M cyklu komórkowego, destabilizując mikrotubule i zapobiegając ich polimeryzacji (alkaloidy *Vinca*) lub poprzez nadmierną stabilizację mikrotubul w wyniku stymulowania ich polimeryzacji (taksany) [10, 60]. Wprowadzenie do terapii onkologicznej paklitakselu na początku lat 90. ubiegłego wieku miało pozytywny wpływ na leczenie nowotworów płuc, piersi czy jajnika. Później do praktyki klinicznej wprowadzono następny cytostatyk z tej grupy – docetaksel. W porównaniu z paklitakselem posiada on większe powinowactwo do tubuliny, dzięki czemu może w większym stopniu oddziaływać na komórki nowotworowe [8, 84]. Po 2000 r. taksany szeroko wprowadzono do praktyki klinicznej jako jedne z najskuteczniejszych leków nowej generacji hamujących mitozę. Oddziaływanie taksanów z β -tubuliną mikrotubul powoduje ich stabilizację i blokuje możliwość dynamicznej reorganizacji cytoszkieletu, co doprowadza

do zaburzenia funkcjonowania wrzeciona podziałowego. W konsekwencji prowadzi to do hamowania rozdziału chromatyd siostrzanych w wyniku nieprawidłowości strukturalnych i blokowania funkcji motorycznych wrzeciona podziałowego, co z kolei skutkuje zatrzymaniem aktywności mitotycznej komórek [8, 10]. Terapia taksanowa jest również związana z działaniami niepożądanymi, do których należą neuropatia obwodowa, bóle mięśni i stawów oraz reakcje skórne. Wielu pacjentów po przyjmowaniu taksanów zgłaszało również dolegliwości takie jak ogólne osłabienie, drętwienie i opuchliznę kończyn, problemy ze słuchem i koordynacją ruchową. U kobiet z nowotworami piersi leczonych taksanami dochodziło do utraty masy mięśnia sercowego, arytmii oraz niedokrwistości. Po długotrwałym leczeniu obserwowano również zmiany w obrębie układu kostnego, głównie osteoporotyczne [54, 55].

Antybiotyki cytostatyczne są grupą niejednorodną pod względem działania na komórki nowotworu, mogą one hamować zarówno fazę M lub S cyklu komórkowego. Zalicza się do nich m.in. antracykliny (np. doksorubicyna, daunorubicyna, epirubicyna), które są syntetyzowane przez bakterie z rodzaju *Streptomyces*. Ich działanie w fazie S opiera się na tworzeniu kompleksów z DNA, co z kolei prowadzi do zakłóceń w replikacji i transkrypcji, a w efekcie do śmierci komórki. Antracykliny mogą bezpośrednio uszkadzać DNA poprzez wzmaganie wytwarzania reaktywnych form tlenu, co dodatkowo zwiększa uszkodzenia materiału genetycznego, peroksydację lipidów oraz zaburzenia funkcji białek [26, 48]. Najbardziej znanym i jednym z najczęściej stosowanych leków z tej grupy jest doksorubicyna, wyizolowana ze zmutowanego szczepu *Streptomyces peuceitius* [26, 43, 78]. Uznawana jest ona za jeden z najbardziej efektywnych leków przeciwnowotworowych. Doksorubicyna działa na kilku poziomach poprzez różne mechanizmy. Głównym jej celem jest enzym topoizomeraza II, a tworzenie się kompleksów topoizomeraza – doksorubicyna – DNA prowadzi do pęknięcia helisy DNA. Dodatkowo oddziałuje ona z jonami żelaza i zaburza homeostazę wapniową komórki, a także wpływa na działanie wewnątrzkomórkowych enzymów utleniających wzmagając stres oksydacyjny [51]. Doksorubicyna znalazła zastosowanie w leczeniu wielu różnych nowotworów, szczególnie często stosowana jest w nowotworach piersi, jajnika, prostaty oraz płuc. Najczęstszym, charakterystycznym skutkiem ubocznym jej działania jest kardiotoksyczność, która może objawić się zaburzeniami pracy serca w trakcie leczenia jak i wiele lat później [51, 78]. Aktualnie dostępne są preparaty doksorubicyny w postaci nanocząsteczek, dokładniej liposomów. Tak skonstruowany lek sprawia, że mniejsza ilość cytostatyku trafia do serca i innych wrażliwych tkanek. Zaopatrujące nowotwór naczynia krwionośne wykazują większą porowatość, stąd liposomy są w stanie przedostać się przez ścianę naczyń głównie w obrębie guza, powodując że działanie cytostatyku ogranicza się przede wszystkim do tkanki nowotworowej [27, 64].

Chemioterapia inaczej

Jedną z propozycji poprawienia jakości życia pacjentów onkologicznych poprzez zmniejszenie nasilenia skutków ubocznych, a także zwiększenia skuteczności działania leków cytotoksycznych, jest udoskonalanie metodyki prowadzenia chemioterapii. Tak zwana chemioterapia metronomiczna, w odróżnieniu od standardowej terapii, nie polega na podawaniu wysokich dawek cytostatyków w formie iniekcji dożylnych raz na 2-3 tygodnie, ale na stosowaniu mniejszych dawek w formie tabletek kilka razy w tygodniu. Ten typ chemioterapii stosuje się m.in. w przypadku nowotworów piersi z przerzutami. Dostępne preparaty doustne (np. Capecitabine i Vinorelbine) pozwalają na lepszą kontrolę przebiegu choroby, ograniczają nasilenie skutków ubocznych i przedłużają życie pacjentów w porównaniu do standardowego leczenia [7, 37]. Metoda ta rozwija się dynamicznie i obecnie trwają prace nad rozszerzeniem spektrum cytostatyków stosowanych w trybie chemioterapii metronomicznej [77].

DRUGIE ŻYCIE TALIDOMIDU

Talidomid został po raz pierwszy wprowadzony na rynek w latach 50. XX wieku jako środek antydepresyjny o właściwościach przeciwwymiotnych i był szeroko stosowany w zwalczaniu porannych dolegliwości u ciężarnych kobiet. Wkrótce po tym pojawiły się doniesienia o poważnych wadach wrodzonych u dzieci, których matki przyjmowały talidomid w okresie ciąży. Między 1957 a 1960 r. w Niemczech, Australii i Wielkiej Brytanii zaobserwowano niezwykle wysoki wzrost liczby dzieci urodzonych z ciężkimi, rzadko spotykanymi deformacjami kończyn i niedorozwojem narządów wewnętrznych. Przeprowadzone przez Lenz'a i McBride'a badania udowodniły związek pomiędzy niedorozwojem dzieci a stosowaniem talidomidu przez ich matki w okresie ciąży [42, 47, 82]. Pod koniec 1961 r. lek ten zaczął być wycofywany z rynku ze względu na swoją teratogenność. Pomimo tych działań około 10 tysięcy dzieci na całym świecie stało się „ofiarami” skutków ubocznych talidomidu. Lek ten zaczęto stosować ponownie, tym razem w terapii nowotworów, wraz ze stwierdzeniem, że jednym z mechanizmów jego działania jest blokowanie procesu angiogenezy. Talidomid może występować w dwóch różnych postaciach izomerycznych, S (-) i R (+). Uważa się, że każdy z izomerów ma różne właściwości: S (-) może być teratogeny, a R (+) uspokajający. Klinicznie stosuje się mieszaninę tych dwóch izomerów. Talidomid wzmacnia również produkcję wolnych rodników w komórkach [88]. Lek ten, oprócz działania teratogenego, wywołuje powikłania podobne do leków cytostatycznych, do których można zaliczyć polineuropatie obwodową, małopłytkowość, niedokrwistość czy też zakrzepowe zapalenie żył. Od 2006 r. talidomid ma zastosowanie w terapii szpiczaka mnogiego. Trwają również badania nad rozszerzeniem jego zastosowania w leczeniu nowotworów trzustki, nerki, jelita grubego, piersi czy prostaty [49, 82].

TERAPIE CELOWANE PRZYSZŁOŚCIĄ LECZENIA NOWOTWORÓW

Chemioterapia i związane z nią skutki uboczne wymusiły poszukiwania nowych metod leczenia nowotworów, które wykorzystują naturalne mechanizmy odporności i przede wszystkim wykazywałyby mniejszą toksyczność dla organizmu (Ryc. 3). Pierwszą tego typu alternatywą stały się metody z zakresu immunoterapii i osiągnięto na tym polu ogromne postępy [58]. W ostatnim czasie do leczenia klinicznego wprowadzono terapię opartą na genetycznie zmodyfikowanych limfocytach T (CAR-T) [80]. Nowe spojrzenie na leczenie chorób nowotworowych wprowadziły także terapie genowe, gdzie największe nadzieje wiąże się ze zjawiskiem interferencji RNA, które jest intensywnie badane od początku XXI wieku [45].

| | Chemioterapia | Immunoterapia | Terapia CAR-T |
|--|---|---|---|
| Ogólne samopoczucie pacjenta | Ogólne osłabienie organizmu, depresja, zaburzenia lękowe | Ogólne osłabienie organizmu | Ogólne osłabienie organizmu |
| Układ krwiotwórczy i krwionośny | Zaburzenia czynności lub trwałe uszkodzenie szpiku, kardiotoxyczność arytmia | Anemia, arytmia, niedociśnienie | Arytmia, niedociśnienie powiązane z CRS |
| Układ odpornościowy | Spadek liczby limfocytów, duże ryzyko infekcji w trakcie trwania terapii | Obniżenie liczby limfocytów, gorączka, limfadenopatie, reakcje autoimmunologiczne | Zespół wyrzutu cytokin (CRS), aplazja limfocytów B, hipogammaglobulinemia |
| Układ nerwowy | Neuropatia obwodowa, encefalopatia, problemy ze słuchem i koordynacją ruchową | Splątanie, bóle głowy | Zespół neurotoksyczności (ICANS) |
| Układ kostny i mięśniowy | Oslabienie układu kostnego, zmiany osteoporotyczne, bóle mięśni i stawów | Stany zapalne stawów i powięzi | ? |
| Układ rozrodczy | Bezpłodność | ? | ? |
| Układ pokarmowy i wydalniczy | Uszkodzenia wątroby i nerek biegunki, wymioty | Zapalenie okrężnicy, autoimmunologiczne zapalenie wątroby, biegunka | Uszkodzenia organów w wyniku zespołu rozpadu nowotworu |
| Objawy skórne | Wypadanie włosów, wysypka | Wysypka, świąd skóry | ? |

*? - nieznanne.

RYCINA 3. Porównanie potencjalnych skutków ubocznych mogących wystąpić w poszczególnych terapiach przeciwnowotworowych [13, 30, 32, 39, 41, 51, 54, 55, 57, 72, 74, 83, 86]

FIGURE 3. Comparison of the potential side effects that may occur with individual cancer treatments [13, 30, 32, 39, 41, 51, 54, 55, 57, 72, 74, 83, 86]

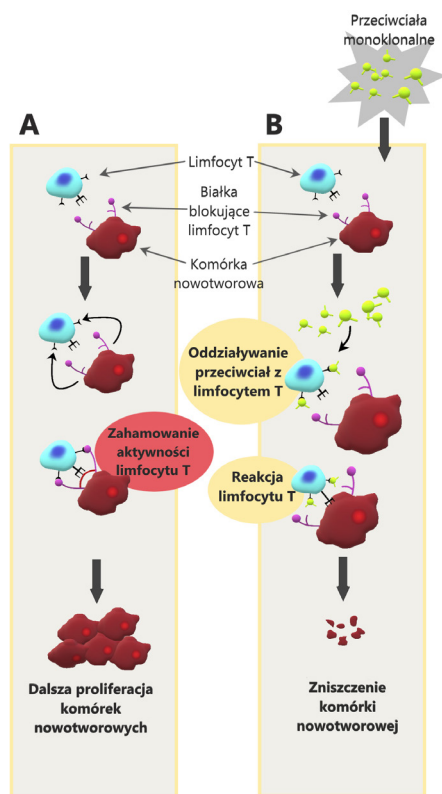
IMMUNOTERAPIA

Związek układu odpornościowego z nowotworami zauważono już pod koniec XIX wieku, kiedy to u pacjentów onkologicznych zarażonych patogenami wywołującymi różyczkę obserwowano znaczące zmniejszanie się guzów nowotworowych. Wililiam Coley w 1891 r. celowo wprowadził inaktywowane bakterie *Streptococcus pyogenes* do organizmów pacjentów onkologicznych z nieoperacyjnymi nowotworami. W swoim wieloletnim eksperymencie zaobserwował regresję nowotworów u ponad 1000 pacjentów [12, 58]. Wzrost zainteresowania radioterapią i chemioterapią w kolejnych latach odwiódł jednak uwagę badaczy od takich metod. Dodatkowo brak było rzetelnych danych i protokołów na temat tego typu leczenia, co uniemożliwiało uzyskiwanie powtarzalnych wyników. Wraz ze wzrostem wiedzy odnośnie działania układu odpornościowego i jego poszczególnych składowych zaczęto opracowywać leki i terapie oparte na zdolności układu odpornościowego do zwalczania komórek nowotworowych. Pierwsze próby kliniczne takich terapii wykonano pod koniec XX wieku wykorzystując niespecyficzne immunostymulatory, takie jak interferon czy interleukinę-2, co jednak nie odniosło spektakularnych sukcesów w leczeniu nowotworów [58].

Inną proponowaną metodą są tzw. szczepionki przeciwnowotworowe, jednak tylko jedna z nich została zaakceptowana przez FDA: Sipuleucel – T, mająca zastosowanie w profilaktyce nowotworu prostaty [24, 29]. Jej mechanizm działania jest oparty o modyfikację komórek dendrytycznych pacjenta, natomiast inne szczepionki opierają się m.in. na podawaniu pacjentom martwych komórek nowotworowych lub specjalnie wyselekcjonowanych antygenów powierzchniowych tych komórek, co ma na celu aktywację odpowiedzi immunologicznej na dany nowotwór [29, 58].

Z zasady obecność różnych antygenów ekspozowanych na powierzchni komórek nowotworowych, będących wynikiem licznych mutacji, powinna stymulować odpowiedź immunologiczną organizmu. Często jednak, podczas rozwoju guza nowotworowego, wytwarza się wokół niego środowisko immunosupresyjne, chroniące nowotwór przed układem odpornościowym. Komórki nowotworowe mogą w tym celu wykorzystywać naturalne mechanizmy kontrolujące wrażliwość układu immunologicznego [58, 83]. Ważnym krokiem w rozwoju immunoterapii okazało się scharakteryzowanie receptorów komórek odpornościowych sterujących ich cytotoksycznym działaniem. Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko tym receptorom zaowocowało wprowadzeniem skutecznych metod immunoterapeutycznych do walki z nowotworami (**Ryc. 4**). Do białek regulujących funkcję limfocytów T zalicza się między innymi receptor CTLA-4 (ang. *Cytotoxic Lymfocyte Antigen-4*) zlokalizowany na tych limfocytach, którego funkcja polega na hamowaniu ich cytotoksycznej aktywności, zapobiegając nadmiernej reakcji w stosunku do własnych komórek. Blokada tego receptora powoduje utrzymanie limfocytów T w stanie aktywności, co prowadzi

do wzmocnienia odpowiedzi odpornościowej organizmu, także w stosunku do komórek nowotworowych. Można to osiągnąć dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych anty-CTLA-4, które pod nazwą handlową Ipilimumab, są z powodzeniem wykorzystywane klinicznie w leczeniu czerniaka, nowotworu płuc oraz prostaty [46, 59, 83]. Innym negatywnym regulatorem limfocytów T jest receptor PD-1 (ang. *Programmed Death Receptor 1*), który poza limfocytami T ulega ekspresji również na limfocytach B oraz komórkach NK (ang. *Natural Killer*). Aktywacja receptora PD-1 doprowadza do supresji komórek układu odpornościowego w środowisku nowotworu, co chroni komórki nowotworowe przed cytotoksycznymi limfocytami T [59, 83]. Przeciwciała monoklonalne blokujące ten receptor znalazły zastosowanie, podobnie jak przeciwciała anty-CTLA-4, w leczeniu czer-



RYCINA 4. Schemat wykorzystania przeciwciał monoklonalnych w celu zwiększenia aktywności limfocytów T przeciwko komórkom nowotworowym. A – normalna proliferacja komórek nowotworowych, B – remisja nowotworu w wyniku podania przeciwciał monoklonalnych

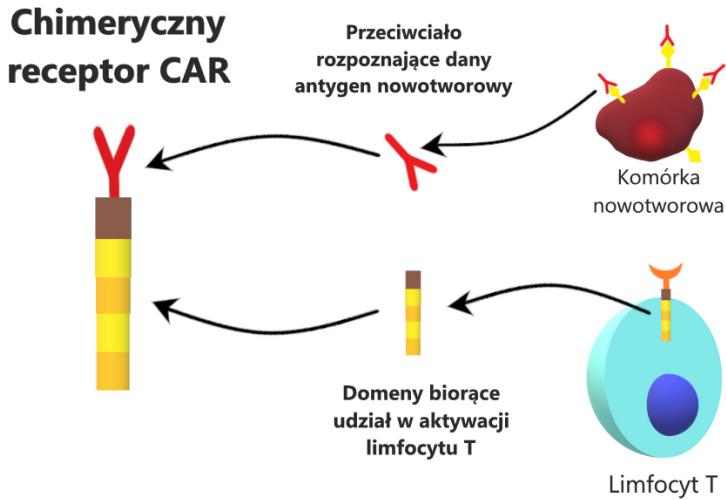
FIGURE 4. Scheme of using monoclonal antibodies to increase the activity of T lymphocytes against neoplastic cells. A – normal proliferation of tumor cells, B – tumor remission as a result of using monoclonal antibodies

niaka i nowotworu płuc, a także w leczeniu raka jelita grubego oraz jajnika. Nazwa handlowa leku zawierającego przeciwciała przeciwko PD-1 to Niwolumab [46, 99]. Wstępne badania pokazały, że jednoczesne zastosowanie Niwolumabu oraz Ipilimumabu może skutkować szybszą i mocniejszą odpowiedzią przeciwnowotworową niż dzieje się to podczas osobnego stosowania tych leków. W 2018 r. James P. Allison i Tasuku Honjo otrzymali Nagrodę Nobla za opracowanie skutecznej immunoterapii z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych [1, 34, 40].

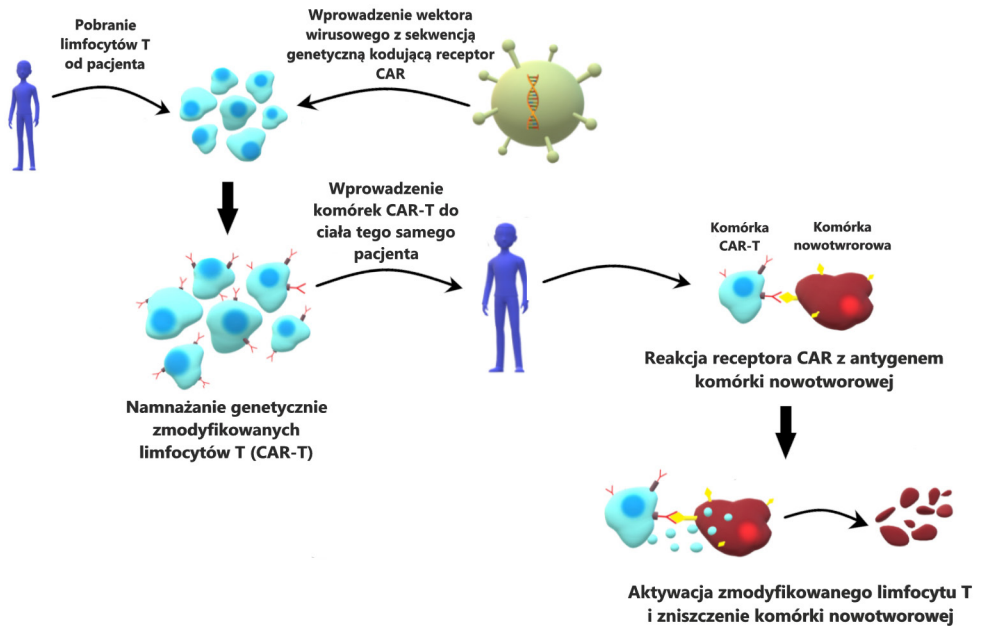
Objawy niepożądane, które mogą występować w leczeniu przeciwciałami monoklonalnymi to między innymi anemia, zmęczenie, limfopenia, gorączka czy też arytmia. Ponadto w przypadku stosowania immunoterapii należy liczyć się z odpowiedzią autoimmunologiczną organizmu w wyniku nadmiernej aktywacji limfocytów T [30, 39]. Immunoterapie wykazują większą skuteczność niż chemioterapie, jednocześnie mogą być mniej toksyczne, stąd wydają się być właściwym kierunkiem rozwoju metod leczenia nowotworów. Wiele nowych immunoterapeutyków jest obecnie opracowywanych oraz akceptowanych przez FDA do leczenia klinicznego, zwiększając pulę leków skierowanych przeciwko różnym typom nowotworów, co zwiększa jednocześnie powszechność ich stosowania. Nowym kierunkiem w immunoterapii w ostatnich kilku latach stały się także terapie adoptywne, do których zalicza się terapię CAR-T, uznaną za jedną z najbardziej obiecujących metod w leczeniu chorób nowotworowych.

TERAPIA CAR-T

Terapia CAR-T (ang. *Chimeric Antigen Receptor T-cells*), będąca metodą z zakresu immunoterapii i terapii genetycznych, czasami określana jest jako „żywy lek”. Wynika to z faktu, że w terapii tej używa się odpowiednio transformowanych limfocytów T pobranych od pacjenta onkologicznego, które następnie wykorzystane są w leczeniu tego samego pacjenta. Pobrane z krwi limfocyty T są następnie, poprzez wykorzystanie wektorów wirusowych lub metod niewektorowych, transformowane genami kodującymi receptor CAR. Jest to syntetyczna proteina, zaprojektowana genetycznie tak, żeby ulegać ekspresji na powierzchni komórek T. Receptory CAR składają się z zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej, która rozpoznaje antygen na powierzchni komórki nowotworowej, domeny transbłonowej i wielu wewnątrzkomórkowych domen sygnałowych, które odpowiadają za aktywację limfocyty T (**Ryc. 5**). Teoretycznie można zaprojektować je dla każdego antygeny znajdującego się na powierzchni komórki [96]. Namnożone *in vitro*, zmodyfikowane komórki T wprowadza się z powrotem do organizmu pacjenta, gdzie w wyniku zetknięcia się receptora CAR z antygenem znajdującym się na błonie komórki nowotworowej następuje cytotoksyczna aktywacja komórek CAR-T, w stosunku do komórek nowotworowych (**Ryc. 6**) [52]. Należy pamiętać, że komórki CAR-T stają się integralną częścią układu immunologicznego pacjenta, dzięki czemu ich przeciwnowotworowa aktywność jest długotrwała.



RYCINA 5. Idea konstrukcji receptora CAR (ang. *chimeric antigen receptor*)
 FIGURE 5. The idea of the CAR (chimeric antigen receptor) construction



RYCINA 6. Uzyskiwanie komórek CAR-T (ang. *chimeric antigen receptor T-cells*) oraz ich wykorzystanie w terapii nowotworów
 FIGURE 6. Obtaining of CAR-T (chimeric antigen receptor T-cells) and their use in cancer therapy

Aktualnie stosowane są receptory CAR skierowane przeciwko antygenom CD-19, charakterystycznym dla komórek nowotworowych chłoniaków i białaczek [96]. Jednocześnie są one opracowywane także dla wielu innych antygenów tych nowotworów, m.in. CD-20 i CD-22. Równoczesne działanie na różne antygeny nowotworowe może w przyszłości zwiększyć efektywność terapii zmodyfikowanymi limfocytami T [52, 68, 80].

Pierwsze komórki CAR-T zostały zaprojektowane już w latach 90. XX wieku, a ich twórcami byli dwaj izraelscy immunolodzy: Zelig Eshhar oraz Gideon Gross [19]. Wtedy jednak nie wykazywały one jeszcze efektywności klinicznej. Od tamtej pory opracowywano coraz lepsze generacje receptorów CAR. Dopiero w 2011 r. nastąpiła pierwsza udana administracja leku zawierającego komórki CAR-T pacjentowi choremu na przewlekłą białaczkę limfocytową [61]. Pierwszy sukces odniesiono natomiast w roku 2012, kiedy to terapia CAR-T doprowadziła do wyleczenia nawracającej ostrej białaczki szpikowej u 7-letniej pacjentki [69]. Do tej pory FDA zaakceptowało dwa produkty oparte na tej technice, mianowicie Tisagenlecleucel oraz Axicabtagene ciloleucel do leczenia ostrych białaczek limfoblastycznych oraz chłoniaka rozlanego z dużych komórek B [80]. Komórki CAR-T są w stanie pozostawać w organizmie jeszcze przez długi czas po leczeniu, także jako komórki pamięci krótkotrwałej, dodatkowo ograniczając przypadki nawrotów choroby nowotworowej, co jest ogromną zaletą tej terapii [52].

Niestety, mimo że terapia CAR-T pokazuje optymistyczne wyniki w przypadku nowotworów krwi, nie odnosi się to jednocześnie do nowotworów litych. Leczenie nie jest tak skuteczne z powodu środowiska immunosupresyjnego guza oraz ogromnego zróżnicowania antygenów powierzchniowych obecnych na błonie budujących go komórek nowotworowych [44, 73]. Dotychczas przeprowadzono wiele badań z użyciem CAR-T w stosunku do wielu różnych nowotworów, między innymi raka jelita grubego, płuc oraz nerwiaka zarodkowego, jednak z niezadowalającym skutkiem [20, 97]. W żadnym przypadku wykorzystania terapii CAR-T w stosunku do guzów litych nie udało się uzyskać znaczącej lub całkowitej i trwałej remisji, co ma miejsce w przypadku nowotworów krwi [21, 94].

Terapia CAR-T poza zaletami niesie ze sobą pewne wady, mimo że nie wykazuje ona toksyczności typowej dla chemioterapii. Najczęstszym problemem napotykanym podczas leczenia jest zespół wyrzutu cytokin CRS (ang. *Cytokine Release Syndrome*), który objawia się gorączką, niedociśnieniem oraz niedotlenieniem organizmu. CRS jest potencjalnie śmiertelnym powikłaniem wynikającym z reakcji między cytokinami a komórkami układu odpornościowego, która ma charakter sprzężenia zwrotnego [72, 74]. Drugim poważnym skutkiem ubocznym jest zespół neurotoksyczności związany z komórkami efektorowymi układu odpornościowego ICANS (ang. *Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome*) objawiający się encefalopatią, afazją, bólami głowy, zaburzeniami snu czy też dezorientacją. Dodatkowo terapia CAR-T może prowadzić do aplazji limfocytów

B, jako że te limfocyty mają także na swojej powierzchni antygeny CD-19 i mogą być niszczone jak komórki nowotworowe. Do innych skutków ubocznych można zaliczyć również zespół rozpadu nowotworu czy też hipogammaglobulinemię. Niszczenie limfocytów B oraz hipogammaglobulinemia powodują obniżenie odporności pacjenta, co często prowadzi do licznych infekcji bakteryjnych i wirusowych występujących niedługo po zastosowaniu terapii CAR-T [41, 72, 81].

Terapia CAR-T już w Polsce

Pierwszym ośrodkiem w Polsce, który rozpoczął stosowanie terapii CAR-T, jest Klinika Hematologii i Transplantologii Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, gdzie w listopadzie 2019 r. zastosowano ją u mężczyzny cierpiącego na chłoniaka złośliwego [18]. Kolejnymi ośrodkami stały się Klinika Transplantacji Szpiku i Onkohematologii Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach, gdzie terapii została poddana m.in. 38-letnia pacjentka z chłoniakiem niezziarnicznym oraz Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, gdzie terapię zastosowano u pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną [56, 87]. Aktualnie nie ma w Polsce możliwości modyfikacji limfocytów T, stąd też wyizolowane od pacjenta limfocyty są wysyłane do laboratorium znajdującego się w USA, gdzie następuje ich modyfikacja genetyczna i uzbrojenie w receptory CAR. Czas od pobrania limfocytów do otrzymania gotowego leku to około 4 tygodnie [18]. Terapia CAR-T jest w Polsce trudno dostępna i nier refundowana przez NFZ. Koszt leczenia jednego pacjenta w USA szacuje się na około 0,5 miliona dolarów natomiast w Polsce kwota ta jest bliska 1 miliona złotych. Pierwsi polscy pacjenci mieli możliwość skorzystania z tej metody leczenia dzięki instytucjom takim jak Fundacja na Ratunek Dzieciom z Chorobą Nowotworową, Fundacja Siępomaga, czy też Program Wczesnego Dostępu do Leku. Należy także zaznaczyć, że terapia CAR-T aktualnie jest rekomendowana do przypadków, gdzie inne metody nie dają żadnego efektu lub ostrych, nawracających nowotworów krwi [18, 56, 87, 90].

TERAPIE GENOWE – INTERFERENCJA RNA I LEKI SFERYCZNE

Zjawisko interferencji RNA (RNAi) po raz pierwszy zaobserwowano u roślin na początku lat 90. ubiegłego wieku, a w 1998 r. opisano to zjawisko u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Za odkrycie procesu i jego mechanizmu Andrew Z. Fire oraz Craig C. Mello otrzymali Nagrodę Nobla w 2006 r. [3, 22, 35, 50]. Interferencja RNA to naturalny proces posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, zachodzący we wszystkich komórkach eukariotycznych za pomocą cząsteczek miRNA homologicznych do sekwencji mRNA kodujących określone białka. Jest to ewolucyjnie konserwatywny proces, który dodatkowo chroni komórkę przed obcym materiałem genetycznym (pochodzącym na przykład od wirusów) lub transpozonami (ruchomymi elementami DNA) [11]. Cząsteczki zaangażowane w proces interfe-

rencji RNA to wspomniane już miRNA oraz siRNA. Różnica pomiędzy nimi polega na tym, że miRNA są pochodzenia endogennego, kodowane w jądrze komórkowym i syntetyzowane przez komórki organizmu, natomiast siRNA są pochodzenia egzogenego np. wirusowego lub projektowane za pomocą metod bioinformatycznych i syntetyzowane sztucznie, a następnie wprowadzane do organizmu [95].

Mechanizm wyciszania genów za pomocą siRNA można podzielić na dwa etapy: starterowy i efektorowy. Pierwszy etap zapoczątkowany jest przez długi dwuniciowy RNA, dsRNA (ang. double-strand RNA), liczący 200-500 par zasad, który jest degradowany w komórce poprzez cięcie na krótsze fragmenty przez enzym rybonukleazę Dicer, co prowadzi do powstania cząsteczek siRNA (21-25 par zasad). Drugi etap polega na wbudowaniu krótkich dwuniciowych fragmentów do kompleksu RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*), gdzie następuje rozdzielenie siRNA na pojedyncze nici. Niec sensowna jest degradowana, natomiast niec antysensowna pozostaje połączona z kompleksem, który ulega w ten sposób aktywacji. Następnie kompleks RISC, w połączeniu z sondą w postaci nici siRNA, jest zdolny do rozpoznawania docelowego mRNA na zasadzie komplementarności. Przyłączenie kompleksu do mRNA prowadzi do jego rozcięcia i dalszej degradacji, w wyniku czego nie dochodzi do ekspresji genu i produkcji określonego białka. W ten sposób ekspresja konkretnych genów jest regulowana w komórce na poziomie translacji [45, 50, 62].

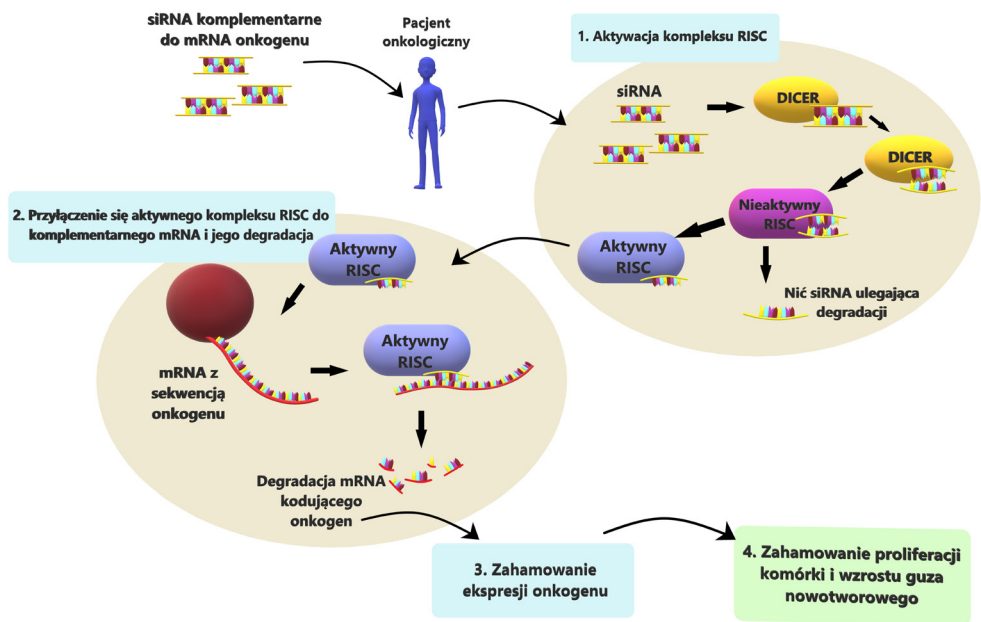
W przypadku komórek nowotworowych zazwyczaj mamy do czynienia z zaburzeniami ekspresji wielu różnych genów, szczególnie tych związanych ze wzrostem czy podziałem komórek. Dlatego też interferencja RNA jest metodą o ogromnym potencjale w leczeniu nowotworów, dającą możliwość regulacji poziomu ekspresji genów poprzez wykorzystanie m.in. odpowiednio spreparowanego siRNA, które może hamować produkcję białka odpowiedzialnego za transformację nowotworową i proliferację guza (**Ryc. 7**). Dodatkowo, w przypadkach, gdy przyczyną transformacji nowotworowej jest zahamowanie ekspresji określonych genów, poprzez nadmierną produkcję specyficznych endogennych miRNA, można wprowadzić do komórek fragmenty anty-miRNA. W efekcie może dojść do blokowania degradacji docelowego mRNA przez kompleks RISC i przywrócenia ekspresji genów [62].

Pierwsze próby kliniczne z wykorzystaniem zjawiska interferencji RNA zostały zatwierdzone przez FDA już w 2004 r. [76]. Od tamtej pory scharakteryzowano wiele genów ulegających mutacji w nowotworach oraz ponad 3000 cząsteczek miRNA biorących udział m.in. w regulacji ekspresji tych genów (**Ryc. 8**). Warto dodać, że jeden rodzaj miRNA może regulować nawet do 200 różnych sekwencji genowych [33]. Co roku wiele firm opracowuje nowe leki w postaci syntetyzowanych fragmentów siRNA, anty-miRNA czy też naśladujących miRNA (w celu pobudzenia ekspresji zablokowanych genów), które aktualnie są w różnych fazach testów klinicznych i nie są jeszcze stosowane w leczeniu [11, 35]. Do pierwszych terapii tego typu dopuszczonych do prób klinicznych na ludziach należy tera-

pia MRX34 z wykorzystaniem cząsteczek miR-34a do leczenia zaawansowanych nowotworów litych [9]. RNAi jest intensywnie badana także w kontekście zjawiska oporności wielolekowej MDR (ang. *Multi Drug Resistance*), które często występuje po długotrwałej chemioterapii. Wiele prób wyciszania genu MDR1, odpowiedzialnego za to zjawisko w komórkach nowotworowych, nie przyniosło jeszcze pożądanego efektu. Wykazano również, że połączenie leków chemioterapeutycznych i cząsteczek siRNA w jednym preparacie może zwiększać skuteczność leczenia w porównaniu do osobnego stosowania tych metod [11].

RNAi prowadzi do efektywnej supresji wzrostu nowotworów w zaawansowanym stadium, a możliwość jednoczesnego hamowania ekspresji wielu genów zaangażowanych w różne procesy może zwiększać skuteczność tej metody. Ogromną zaletą tej terapii jest dość wysoka specyficzność w stosunku do wyciszanych genów i związana z tym niska toksyczność dla organizmu. Szacuje się, że koszty tej terapii są relatywnie niskie, co może w przyszłości mieć wpływ na jej dostępność [76].

Należy zwrócić uwagę, że w przypadku terapii z wykorzystaniem siRNA, mimo względnie wysokiej specyficzności, może dochodzić do wyciszania ekspresji innych genów, poza tymi, które były celem. Jest to wynikiem pewnego zakresu



RYCINA 7. Schemat działania cząsteczek siRNA na ekspresję onkogenu w komórkach nowotworowych organizmu pacjenta onkologicznego

FIGURE 7. Diagram of the action of siRNA molecules on the expression of an oncogene in cancer cells of an oncological patient

tolerancji niedopasowania pomiędzy cząsteczkami siRNA a docelowym mRNA. Wykazano, że w niektórych przypadkach wystarczy tylko jedenaście kolejnych komplementarnych nukleotydów, żeby wyciszyć ekspresję genu.

Dużym problemem związanym z tą terapią jest także możliwość aktywowania szlaków sygnalizacji z udziałem PKR (ang. *double stranded RNA – dependent Protein Kinase*) oraz receptorów TLR (ang. *Toll- like Receptor*). Aktywacja PRK prowadzi do całkowitego zahamowania syntezy białek i śmierci komórki, natomiast indukcja kaskady szlaku sygnałowego aktywowanego przez TLR prowadzi do indukcji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [35, 67].

Dodatkowym problemem związanym z tą terapią jest efektywne dostarczenie dsRNA czy siRNA do komórek guza, ponieważ z zasady DNA oraz RNA nie mogą przechodzić przez błony komórkowe. Takie cząsteczki są bardzo szybko degradowane w organizmie przez nukleazy i stąd są bardzo niestabilne w środowisku pozakomórkowym. W celu dostarczenia liniowych oligonukleotydów stosuje się więc

| miRNA | Typ nowotworu | Gen docelowy |
|-------------|---|---|
| miR-17-92 | Rak płuc | PTEN, RB2 |
| miR-19 | Białaczka, chłoniak | PTEN |
| miR-21 | Rak jelita grubego, płuc, trzustki, piersi, prostaty, mózgu, wątroby, żołądka | CDK6, PDCD4, CDKN 1A, FAS, IL6R, COCS5, APAF1, NFIB, TPM1 |
| miR-25/29 | Białaczka, chłoniak, rak płuc, jelita grubego, trzustki, prostaty, żołądka, nerwiak zarodkowy | BCL2, L11, CDKN1C |
| miR-26a | Rak nerki | PTEN |
| miR-34a | Białaczka, chłoniak, rak płuc, prostaty, jelita grubego, wątroby, trzustki, mózgu, kości, jajnika | KRAS, MET, MEK1, MYC, BCL2, CD44 |
| miR-155 | Białaczka, chłoniak, rak płuc, piersi, jamy nosowo-gardłowej | BACH1, AGTR1, LDO C1, MATR3, TM6SF1, AGTR1, AID, SHIP1 |
| miR-221/222 | Rak trzustki, prostaty, tarczycy, żołądka | CDKN1B, CDKN1C, KIT |
| miR-335 | Rak piersi | SOX4, PTPRN2, MERTK, TNC |
| Let-7 | Rak płuc, piersi | LIN28, KRAS, NF2 |

RYCINA 8. Przykładowe scharakteryzowane cząsteczki miRNA regulujące ekspresję określonych genów w różnych typach nowotworów [2, 9, 67, 85]

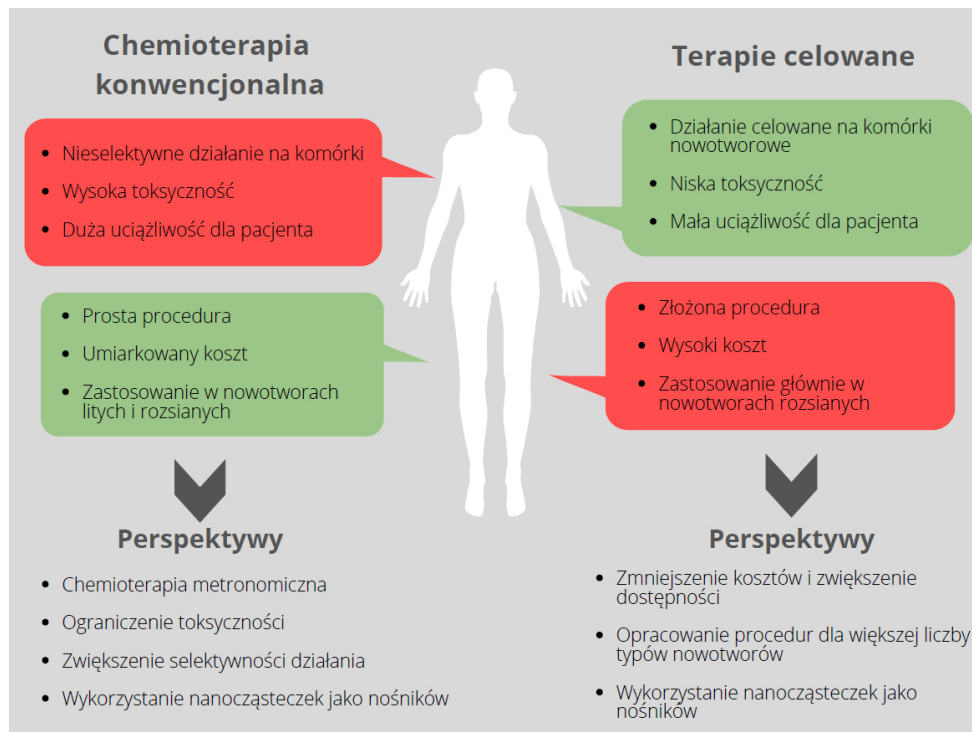
FIGURE 8. Exemplary characterized miRNAs regulating the expression of specific genes in various types of cancer [2, 9, 67, 85]

wektory wirusowe i bakteryjne, co często może prowadzić do reakcji immunologicznej organizmu. Wykazano, że cząsteczki siRNA są także szybko wydalane przez nerki. Rozwiązanie powyżej sygnalizowanych problemów może znacząco wpłynąć na skuteczność strategii interferencji RNA w leczeniu nowotworów [3, 11].

Potencjalnym rozwiązaniem dla tego typu problemów mogą okazać się aktualnie intensywnie badane nanocząsteczki, a szczególnie leki sferyczne (ang. *Spheric Nucleic Acids*, SNA). SNA mają na swojej powierzchni ściśle upakowane jednoniciowe fragmenty oligonukleotydowe, dzięki temu są odporne na działanie nukleaz, a także bez problemu wnikają w dużych ilościach do niemal każdego typu komórek, silnie reagując z odpowiednimi receptorami znajdującymi się na powierzchni ich błony komórkowej. SNA mogą w najbliższym czasie znaleźć zastosowanie w immunoterapii nowotworów, a także w przenoszeniu leków cytostatycznych czy cząsteczek siRNA [6, 98]. Ogromną zaletą tego typu nanocząsteczek jest możliwość migracji przez barierę krew-mózg, co może w przyszłości poszerzyć możliwości leczenia nowotworów mózgu. W porównaniu do innych nanocząstek, SNA zapewniają najbardziej efektywne wnikanie do komórek, a brak konieczności stosowania dodatkowych wektorów wirusowych czy bakteryjnych ogranicza nasilenie odpowiedzi immunologicznej organizmu. Leki sferyczne czeka jeszcze wiele testów zanim będą mogły wejść do praktyki klinicznej, jednak już teraz można założyć, że w niedalekiej przyszłości mogą stać się niezastąpionym elementem nowoczesnych terapii w leczeniu nowotworów [53, 95].

PODSUMOWANIE

Omówione w tym artykule metody pokazujące nowatorskie podejście do leczenia nowotworów dają nadzieję na leczenie przebiegające w mniej obciążający dla pacjentów sposób. Metody konwencjonalne, szczególnie chemioterapia, wiążą się z nieuniknionymi powikłaniami o różnym nasileniu, które mogą wywołać trwałe szkody w organizmie, co powoduje, że nie rzadko pacjenci rezygnują z leczenia metodami klinicznymi. Innowacyjne metody, które są alternatywą dla tego typu terapii pokazują, że leczenie nowotworów może wyglądać zupełnie inaczej, bez szeregu powikłań (**Ryc. 9**). Zmiana strategii leczenia nowotworów z leczenia objawowego (chirurgia) i niespecyficznego hamowania proliferacji komórek (chemioterapia i radioterapia) na leczenie nakierowane na aktywację własnego układu immunologicznego do specyficznego zwalczania komórek nowotworowych (immunoterapia) lub naprawę nieprawidłowo funkcjonujących komórek (interferencja RNA), staje się faktem. Leki projektowane indywidualnie dla pacjenta, jak komórki CAR-T, są już rzeczywistością, a ingerowanie w poziom ekspresji określonych genów w komórkach przynosi coraz lepsze efekty.



RYCINA 9. Schematyczne porównanie wad oraz zalet chemioterapii konwencjonalnej i terapii celowanych oraz perspektywy ich rozwoju

FIGURE 9. Schematic comparison of the advantages and disadvantages of conventional chemotherapy and targeted therapies and their development prospects

Nowe metody wymagają jeszcze wielu badań w celu pełnego wykorzystania ich możliwości. Aktualnie są one dobrym uzupełnieniem metod konwencjonalnych lub stanowią leki ostatniego wyboru, gdy inne metody zawiodły. Nowy sposób prowadzenia chemioterapii, jakim jest chemioterapia metronomiczna pokazuje, że nawet typowe leczenie cytostatykami można zaprojektować na nowo, a niewielka zmiana może przynieść duże korzyści. Biorąc pod uwagę poprawiającą się diagnostykę nowotworów, pozwalającą na wykrywanie ich we wczesnym etapie rozwoju oraz skuteczność nowatorskich metod leczenia, można prognozować, że w niedalekiej przyszłości metody takie jak immunoterapia, stosowanie żywych leków lub interferencja RNA staną się powszechnie dostępne i będą stopniowo zajmować miejsce klasycznej chemioterapii. Rozwój terapii celowanych jest ogromnym wyzwaniem współczesnej medycyny i biologii. Aktualne wyniki klinicznych badań tych terapii są obiecujące i dają nadzieję na poprawienie statystyk w skuteczności leczenia nowotworów.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z subwencji na utrzymanie i rozwój potencjału dydaktycznego i badawczego Wydziału Biologii Uniwersytetu w Białymstoku (SWB-8).

LITERATURA

- [1] ALTMANN DM. A Nobel Prize-worthy pursuit: cancer immunology and harnessing immunity to tumor neoantigens. *Immunology* 2018; **155**: 283-284.
- [2] BEG MS, BRENNER AJ, SACHDEV J, BORAD M, KANG YK, STOUDEMIRE J, SMITH S, BADER AG, KIM S, HONG DS. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2017; **35**: 180-188.
- [3] BORA RS, GUPTA D, MUKKUR TK, SAINI KS. RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities. *Mol Med Rep* 2012; **6**: 9-15.
- [4] 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; **68**: 394-424.
- [5] CAI X, GRAY JR PJ, VON HOFF DD. DNA minor groove binders: back in the groove. *Cancer Treat Rev* 2009; **35**: 437-450.
- [6] CALLMANN CE, COLE LE, KUSMIERZ CD, HUANG Z, HORIUCHI D, MIRKIN CA. Tumor cell lysate-loaded immunostimulatory spherical nucleic acids as therapeutics for triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2020; **117**: 17543-17550.
- [7] CAZZANIGA ME, BIGANZOLI L, CORTESI L, DE PLACIDO S, DONADIO M, FABI A, FERRO A, GENERALI D, LORUSSO V, MILANI A, MONTAGNA E, MUNZONE E, ORLANDO L, PIZZUTI L, SIMONCINI E, ZAMAGNI C, PAPPAGALLO GL. Treating advanced breast cancer with metronomic chemotherapy: what is known, what is new and what is the future? *Onco Targets Ther* 2019; **12**: 2989-2997.
- [8] CELLA D, PETERMAN A, HUDGENS S, WEBSTER K, SOCINSKI MA. Measuring the side effects of taxane therapy in oncology: The Functional Assessment of Cancer Therapy–taxane (FACT-taxane). *Cancer* 2003; **98**: 822-831.
- [9] CHAKRABORTY C, SHARMA AR, SHARMA G, SARKAR BK, LEE SS. The novel strategies for next-generation cancer treatment: miRNA combined with chemotherapeutic agents for the treatment of cancer. *Oncotarget* 2018; **9**: 10164-10174.
- [10] CHAN KS, KOH CG, LI HY. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death Dis* 2012; **3**: e411.
- [11] CHEN X, MANGALA LS, RODRIGUEZ-AGUAYO C, KONG X, LOPEZ-BERESTEIN, G, SOOD, AK. RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer Metastasis Rev* 2018; **37**: 107-124.
- [12] COLEY WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. 1. *Clin Orthop Relat Res* 1991; **262**: 3-11.
- [13] CORRIE PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine* 2008; **36**: 24-28.
- [14] CUEVAS C, FRANCESCH A. Development of Yondelis®(trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat Prod Rep* 2009; **26**: 322-337.
- [15] DE MARTEL C, FERLAY J, FRANCESCHI S, VIGNAT J, BRAY F, FORMAN D, PLUMMER M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 607-615.

- [16] DEVITA JR VT, ROSENBERG SA. Two hundred years of cancer research. *New Eng J Med* 2012; **366**: 2207-2214.
- [17] DICKENS E, AHMED S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)* 2018; **36**: 134-138.
- [18] DYTFFELD D, ŁOJKO-DANKOWSKAA, MATUSZAK M, WACHE, A, NOWICKIA, KOZŁOWSKA-SKRZYPCZAK M, BEMBNISTA E, MATUSZAK P, KUBIAK A, JANKOWIAK-GRACZ H, NOWAK-POTOCZEK A, DURAJCZYK K, RAWICZ-OLEJDZKA G, GRZYBOWSKA, U, KOŁTUNIAK J, PRZEWOŻNA I, GIL L. Road to clinical implementation of CAR-T technology in Poznań. *Acta Haematol Pol* 2020; **51**: 24-28.
- [19] ESHHAR Z, WAKS T, GROSS G, SCHINDLER DG. 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 USA* 1993; **90**: 720-724.
- [20] FENG K, GUO Y, DAI H, WANG Y, LI X, JIA H, HAN W. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer. *Sci China Life Sci.* 2016; **59**: 468-479.
- [21] FILLEY AC, HENRIQUEZ M, DEY M. (2018). CART immunotherapy: development, success, and translation to malignant gliomas and other solid tumors. *Front Oncol* 2018; **8**.
- [22] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806-811.
- [23] FRIEDMAN B, CRONSTEIN B. (2019). Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2019; **86**: 301-307.
- [24] GARDNER TA, ELZEY BD, HAHN NM. Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Hum Vaccin Immunother* 2012; **8**: 534-539.
- [25] GBD 2015 RISK FACTORS COLLABORATORS. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioral, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; **388**: 1659-1724.
- [26] GEORGIADIS N, TSAROUHAS K, REZAEI R, NEPKA H, KASS GE, DORNE JL, STAGOS D, TOUTOUZAS K, SPANDIDOS D, KOURETAS D, TSITSIMPIKOU C. What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies. *Oncol Rep* 2020; **44**: 798-818.
- [27] GŁOGOWSKA I, DUBIAŃSKI R, SKRZYPCZYK A, PIENKOWSKI T. Rola antracyklin w leczeniu zaawansowanego raka piersi-miejsce niepegylowanej doksorubicyny liposomalnej. *Onkol Prakt Klin* 2010; **6**: 8-17.
- [28] GOODMAN LS, WINTROBE MM, DAMESHEK W, GOODMAN MJ, GILMAN A, McLENNAN MT. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc* 1946; **132**: 126-132.
- [29] GUILLEREY C, HUNTINGTON ND, SMYTH MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 2016; **17**: 1025-1036.
- [30] HAMANISHI J, MANDAI M, IKEDA T, MINAMI M, KAWAGUCHI A, MURAYAMA T, KANAI M, MORI Y, MATSUMOTO S, CHIKUMA S, MATSUMURA N, ABIKO K, BABA T, YAMAGUCHI K, UEDAA, HOSOE Y, MORITA S, YOKODE M, SHIMIZU A, HONJO T, KONISHI I. Safety and antitumor activity of anti-PD-1 antibody, nivolumab, in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 4015-4022.
- [31] HENNEQUIN C, GUILLERM S, QUERO L. Combination of chemotherapy and radiotherapy: A thirty years evolution. *Cancer/Radiothérapie* 2019; **23**: 662-665.
- [32] HOWARD SC, MCCORMICK J, PUI CH, BUDDINGTON RK, HARVEY RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *Oncologist* 2016; **21**: 1471-1482.

- [33] HUKOWSKA-SZEMATOWICZ B, DEPTULA W. Biologiczna rola mikroRNA [miRNA]-nowe dane. *Post Biol Kom* 2010; **3**: 585-597.
- [34] ISHIDA YA, AGATA Y, SHIBAHARA K, HONJO T. Induced expression of PD1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; **11**: 3887-3952.
- [35] JÓZWIĄK P, LIPIŃSKA A. Zastosowanie interferencji RNA w diagnostyce i terapii niektórych chorób człowieka. *Postępy Hig Med Dośw* 2010; **64**: 504-512.
- [36] KANAVOS P. The rising burden of cancer in the developing world. *Ann Oncol* 2006; **8**: 15-23.
- [37] KAREVA I, WAXMAN DJ, KLEMENT GL. Metronomic chemotherapy: an attractive alternative to maximum tolerated dose therapy that can activate anti-tumor immunity and minimize therapeutic resistance. *Cancer Lett* 2015; **358**: 100-106.
- [38] KREMER JM. Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 1370-1382.
- [39] KRUGER S, ILMER M, KOBOLD S, CADILHA BL, ENDRES S, ORMANN S, SCHUEBBE G, RENZ BW, D'HAESE JG, SCHLOESSER H, HEINEMANN V, SUBKLEWE M, BOECK S, WERNER J, VON BERGWELT-BAILDON M. Advances in cancer immunotherapy 2019 – latest trends. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; **38**: 268.
- [40] LEACH DR, KRUMMEL MF, ALLISON JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* 1996; **271**: 1734-1736.
- [41] LEE DW, SANTOMASSO BD, LOCKE FL, GHOBADI A, TURTLE CJ, BRUDNO JN, MAUS MV, PARK JH, MEAD E, PAVLETIC S, GO WY, ELDJEROU L, GARDNER RA, FREY N, CURRAN KJ, PEGGS K, PASQUINI M, DIPERSIO JF, VAN DEN BRINK MRM, KOMANDURI KV, GRUPP SA, NEELAPU SS. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; **25**: 625-638.
- [42] LENZ W, KNAPP K. Foetal malformations due to thalidomide. *Ger Med Mon* 1962; **7**: 253-258.
- [43] ŁYSKAWA W. Chemioterapia w leczeniu choroby nowotworowej i jej neurotoksyczność. *Anest Ratow* 2009; **3**: 80-87.
- [44] MA S, LI X, WANG X, CHENG L, LI Z, ZHANG C, YE Z, QIAN Q. Current progress in CAR-T cell therapy for solid tumors. *Int J Biol Sci* 2019; **15**: 2548-2560.
- [45] MANSOORI B, SHOTORBANI SS, BARADARAN B. RNA interference and its role in cancer therapy. *Adv Pharm Bull* 2014; **4**: 313-321.
- [46] MARKOWSKA A, SAJDAK S, LUBIN J, MARKOWSKA J. The role of PD-1 – a programmed cell death receptor 1 – and its ligands in ovarian cancer immunotherapy. *Curr Gynecol Oncol* 2016; **14**: 117-120.
- [47] MCBRIDE WG. Thalidomide and congenital malformations. *Lancet* 1961; **2**: 90927-90928.
- [48] MCGOWAN JV, CHUNG R, MAULIK A, PIOTROWSKA I, WALKER JM, YELLON DM. Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther* 2017; **31**: 63-75.
- [49] MELCHERT M, LIST A. The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 1489-1499.
- [50] MELLO CC, CONTE D. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004; **431**: 338-342.
- [51] MITRY MA, EDWARDS JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart & Vasculature* 2016; **10**: 17-24.
- [52] MOHANTY R, CHOWDHURY CR, AREGA S, SEN P, GANGULY P, GANGULY N. CAR T cell therapy: a new era for cancer treatment. *Oncol Rep* 2019; **42**: 2183-2195.
- [53] MOKHTARZADEH A, VAHIDNEZHAD H, YOUSSEFIAN L, MOSAFER J, BARADARAN B, UITTO J. Applications of spherical nucleic acid nanoparticles as delivery systems. *Trends Mol Med* 2019; **25**: 1066-1079.
- [54] MUKHTAR E, ADHAMI VM, MUKHTAR H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2014; **13**: 275-284.
- [55] MYŚLIWIEC P. Późne działania niepożądane leczenia uzupełniającego u chorych z rozpoznaniem raka piersi. *Zeszyty Naukowe WCO, Letters in Oncology Science* 2019; **16**: 29-36.
- [56] Narodowy Instytut Onkologii w Gliwicach im. Marii Skłodowskiej – Curie, Państwowy Instytut Badawczy. <https://www.io.gliwice.pl/institut/informacje-prasowe> [dostęp z dnia 01.10.2020].

- [57] NURGALI K, JAGOE RT, ABALO R. Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol* 2018; **9**: 245.
- [58] OISETH SJ, AZIZ MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat* 2017; **3**: 250-261.
- [59] PARDOLL D, DRAKE C. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. *J Exp Med* 2012; **209**: 201-209.
- [60] PEREZ EA. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther* 2009; **8**: 2086-2095.
- [61] PORTER DL, LEVINE BL, KALOS M, BAGG A, JUNE CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; **365**: 725-733.
- [62] POTAPIŃSKA O, WĄSIK M. Wyciszenie nadekspresji genu MDR1 za pomocą siRNA, nośniki, efekty perspektywy. *Nowotwory J Oncol* 2009; **59**: 33-39.
- [63] PUYO S, MONTAUDON D, POURQUIER P. From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; **89**: 43-61.
- [64] RAFIYATH SM, RASUL M, LEE B, WEI G, LAMBA G, LIU D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp Hematol Oncol* 2012; **1**: 10.
- [65] RALHAN R, KAUR J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Op Ther Patents* 2007; **17**: 1061-1075.
- [66] RELIGIONI U. Cancer incidence and mortality in Poland. *Clinical Epidemiology and Global Health* 2020; **8**: 329-334.
- [67] REN YJ, ZHANG Y. An update on RNA interference-mediated gene silencing in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2014; **14**: 1581-1592.
- [68] RODDIE C, O'REILLY M, PINTO JDA, VISPUTE K, LOWDELL M. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy* 2019; **21**: 327-340.
- [69] ROSENBAUM L. Tragedy, perseverance, and chance – the story of CAR-T therapy. *N Engl J Med* 2017; **377**: 1313-1315.
- [70] ROSER M, RITCHIE H. Cancer. Published online at <https://ourworldindata.org/> [data dostępu: 25.09.2020]
- [71] RUBACH M, SIEDLECKI P. Początki chemioterapii w Polsce: w 40. rocznicę powstania pierwszej w kraju Kliniki Chemioterapii w Instytucie Onkologii w Warszawie. *Nowotwory J Oncol* 2014; **64**: 544-550.
- [72] SANTOMASSO B, BACHIER C, WESTIN J, REZVANI K, SHPALL EJ. The other side of CAR T-cell therapy: cytokine release syndrome, neurologic toxicity, and financial burden. *ASCO Educational Book* 2019; **39**: 433-444.
- [73] SCARFÒ I, MAUS MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2017; **5**: 1-8.
- [74] SCHUSTER SJ, BISHOP MR, TAM CS, WALLER EK, BORCHMANN P, MCGUIRK JP, JÄGER U, JAGLOWSKI S, ANDREADIS C, WESTIN JR, FLEURY I, BACHANOVA V, FOLEY SR, HO PJ, MIELKE S, MAGENAU JM, HOLTE H, PANTANO S, PACAUD LB, AWASTHI R, CHU J, ANAK Ö, SALLES G, MAZIARZ RT, JULIET INVESTIGATORS. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2019; **380**: 45-56.
- [75] SHEA B, SWINDEN MV, TANJONG GHOGOMU E, ORTIZ Z, KATCHAMART W, RADER T, BOMBARDIER C, WELLS GA, TUGWELL P. Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; **31**.
- [76] SHRIVASTAVA N, SRIVASTAVA A. RNA interference: an emerging generation of biologicals. *Bio-technol J: Healthcare Nutrition Technology* 2008; **3**: 339-353.
- [77] SIMSEK C, ESIN E, YALCIN S. Metronomic chemotherapy: a systematic review of the literature and clinical experience. *J Oncol* 2019; **2019**: 5483791.

- [78] SOBCZUK P, CZERWIŃSKA M, KLEIBERT M, CUDNOCH-JĘDRZEJEWSKA A. Anthracycline-induced cardiotoxicity and renin-angiotensin-aldosterone system – from molecular mechanisms to therapeutic applications. *Heart Fail Rev* 2020; 1-25.
- [79] STRĄG-LEMANOWICZ A, LEPPERT W. Rola onkologicznego leczenia systemowego u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową. *Palliat Med Pract* 2014; **8**: 11-22.
- [80] STYCZYŃSKI J. A brief history of CAR-T cells: from laboratory to the bedside. *Acta Haematol Pol* 2020; **51**: 2-5.
- [81] STYCZYŃSKI J. Infections following CAR-T cells therapy: current state-of-the-art review and recommendations. *Acta Haematol Pol* 2020; **51**: 11-16.
- [82] SUROWIEC A, WOŁOWIEC Ł, SUROWIEC J, WOŁOWIEC M, KOCHAŃSKI B, KAŁUŻNY K, PLASKIEWICZ A, KRAKOWSKA A, ZUKOW W. Talidomid – nowe znaczenie terapeutyczne teratogennego leku – Thalidomide. *J Educ Health Sport* 2015; **5**: 341-354.
- [83] SWATLER J, KOZŁOWSKA E. Immunoterapie nowotworów działające na punkty kontrolne układu odpornościowego. *Postepy Hig Med Dosw* 2016; **70**: 25-42.
- [84] TABACZAR S, KOCEVA-CHYŁA A, MATCZAK K, GWOZDZIŃSKI K. Molekularne mechanizmy aktywności przeciwnowotworowej taksanów. I. Oddziaływanie docetakselu na mikrotubule. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2010; **64**: 568-581.
- [85] TAVAZOIE S, ALARCÓN C, OSKARSSON T, PADUA D, WANG Q, BOS PD, GERALD WL, MASSAGUÉ J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; **451**: 147-152.
- [86] TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, GETTINGER SN, SMITH DC, MCDERMOTT DF, POWDERLY JD, CARVAJAL RD, SOSMAN JA, ATKINS MB, LEMING PD, SPIGEL DR, ANTONIA SJ, HORN L, DRAKE CG, PARDOLL DM, CHEN L, SHARFMAN WH, ANDERS RA, TAUBE JM, MCMILLER TL, XU H, KORMAN AJ, JURE-KUNKEL M, AGRAWAL S, MCDONALD D, KOLLIA GD, GUPTA A, WIGGINTON JM, SZNOL M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; **366**: 2443-2454.
- [87] Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Jana Mikulicza – Radeckiego we Wrocławiu. http://www.usk.wroc.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=2235:sukces-terapii-car-t-w-uniwersyteckim-szpitalu-klinicznym-we-wrocawiu-&catid=158:dla-mediow&Itemid=176 [dostęp z dnia 01.10.2020].
- [88] VARGESSON N. Thalidomide. *Reprod Develop Toxicol* 2011; **31**: 395-340.
- [89] VISENTIN M, ZHAO R, GOLDMAN ID. The antifolates. *Hematol Oncol Clin* 2012; **26**: 629-648.
- [90] WHITTINGTON MD, MCQUEEN RB, OLLENDORF DA, KUMAR VM, CHAPMAN RH, TICE JA, PEARSON SD, CAMPBELL JD. Long-term Survival and Cost-effectiveness Associated With Axicabtagene Ciloleucef vs Chemotherapy for Treatment of B-Cell Lymphoma. *JAMA Netw Open* 2019; **2**: e190035.
- [91] WILD CP, WEIDERPASS E, STEWART BW. World cancer report: cancer research for cancer prevention. *IARC* 2020.
- [92] WOJCIECHOWSKA U, DIDKOWSKA J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. <http://onkologia.org.pl/raporty> [dostęp z dnia 25.09.2020]
- [93] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). European Health Information https://gateway.euro.who.int/en/indicators/hfa_358-2321-number-of-new-cases-of-cancer/ [dostęp z dnia: 23.09.2020]
- [94] XIA AL, WANG XC, LU YJ, LU XJ, SUN B. Chimeric-antigen receptor T (CAR-T) cell therapy for solid tumors: challenges and opportunities. *Oncotarget* 2017; **8**: 90521-90531.
- [95] XIN Y, HUANG M, GUO WW, HUANG Q, ZHEN ZHANG L, JIANG G. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Mol Cancer* 2017; **16**: 1-9.
- [96] XU D, JIN G, CHAI D, ZHOU X, GU W, CHONG Y, SONG J, ZHENG J. The development of CAR design for tumor CAR-T cell therapy. *Oncotarget* 2018; **9**: 13991-14004.

- [97] ZHANG C, WANG Z, YANG Z, WANG M, LI S, LI Y, ZHANG R, XIONG Z, WEI Z, SHEN J, LUO Y, ZHANG Q, LIU L, QIN H, LIU W, WU F, CHEN W, PAN F, ZHANG X, BIE P, LIANG H, PECHER G, QIAN CH. Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA+ Metastatic Colorectal Cancers. *Mol Ther* 2017; **25**: 1248-1258
- [98] ZHANG W, MECKES B, MIRKIN, CA. Spherical Nucleic Acids with Tailored and Active Protein Corona. *ACS Cent Sci* 2019; **5**: 1983-1990.
- [99] ZHOU Q, MUNGER ME, HIGHFILL SL, TOLAR J, WEIGEL BJ, RIDDLE M, SHARPE AH, VAL-LERA DA, AZUMA M, LEVINE BL, JUNE CH, MURPHY WJ, MUNN DH, BLAZAR BR. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; **116**: 2484-2493.
- [100] ZIMECKI M, ARTYM J. Działanie metotreksatu na odpowiedź immunologiczną w wybranych modelach doświadczalnych. *Postepy Hig Med Dosw* 2004; **20**: 226-235.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 10.26.2020

Przyjęto: 16.11.2020

Adam Tylicki

Pracownia Cytobiochemii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii

Wydział Biologii

Uniwersytet w Białymstoku

ul. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok

tel.: 85 738 83 99

e-mail: atyl@uwb.edu.pl

WYBRANE MARKERY NOWOTWOROWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (CSCs) W RAKU JAJNIKA

SELECTED CANCER STEM CELLS (CSCs) MARKERS IN OVARIAN CANCER

Natalia IŻYCKA¹, Ewa NOWAK-MARKWITZ¹, Karolina STERZYŃSKA²

¹Klinika Onkologii Ginekologicznej, Katedra Ginekologii, Położnictwa
i Onkologii Ginekologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Rak jajnika pozostaje wiodącą przyczyną zgonów wśród pacjentek chorujących na nowotwory ginekologiczne. Zbudowany jest z heterogennej populacji komórek wśród których występuje rzadka subpopulacja – nowotworowe komórki macierzyste (ang. *cancer stem cells*, CSCs) – która ze względu na swoje charakterystyczne cechy jest odporna na terapię chemioterapeutykami. Identyfikacja i izolacja CSCs opiera się przede wszystkim na określeniu ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych. W odniesieniu do raka jajnika najczęściej wymieniane są, w różnych konfiguracjach: CD44, CD133 i ostatnio ALDH1A. Precyzyjna charakterystyka markerów CSCs może być atrakcyjnym celem terapii celowanych, które mogłyby uwrażliwić komórki raka jajnika, w tym CSCs, na podawane standardowo cytostatyki.

Słowa kluczowe: rak jajnika, nowotworowe komórki macierzyste, markery nowotworowych komórek macierzystych

Summary: Ovarian cancer remains the leading cause of death among patients suffering from gynecological tumors. It is composed of a heterogeneous population of cells, where a rare sub-population – cancer stem cells (CSCs) – is found. CSCs, due to their characteristic features, remain resistant to chemotherapeutic therapies. The identification and isolation of CSCs are based primarily on the expression of specific surface markers. The most often mentioned in various configurations concerning ovarian cancer are CD44, CD133, and recently ALDH1A. CSC markers' precise characterization may lead to more targeted therapies that could sensitize ovarian cancer cells, including CSCs, to standard cytostatics.

Keywords: ovarian cancer, cancer stem cells, cancer stem cells' markers

WPROWADZENIE

Mimo ostatnich postępów w leczeniu raka jajnika, jest on nadal jest wiodącą przyczyną zgonów wśród pacjentek chorujących na nowotwory ginekologiczne. W momencie diagnozy około 70% pacjentek cierpi na zaawansowaną chorobę z obecnością przerzutów do otrzewnej jamy brzusznej, narządów mięszzowych czy sieci większej [6]. Rozsiew raka jajnika w momencie diagnozy w istotny sposób utrudnia przeprowadzenie optymalnej cytoredukcji, która pozostaje podstawą leczenia, zazwyczaj w skojarzeniu z chemioterapią. U większości chorych obserwuje się dobrą odpowiedź na standardową pierwszorazową chemioterapię opartą na taksanach i związkach platyny [29]. Niestety, u ponad 70% pacjentek dochodzi do nawrotu choroby i rozwoju chemiooporności, co w istotny sposób pogarsza rokowania i czas przeżycia chorych [61, 37]. To właśnie wysoki stopień zaawansowania choroby w momencie diagnozy oraz oporność na leki cytotoksyczne stopniowo rozwijana przez nowotwór stanowią główne przyczyny niekorzystnych wskaźników przeżywalności chorych z rakiem jajnika [62]. Mimo wieloletnich badań, nadal nie udaje się wyprzedzić agresywnego charakteru raka jajnika na tyle, by w istotny sposób poprawić rokowania pacjentek.

NOWOTWOROWE KOMÓRKI MACIERZYSTE (CSCs, CANCER STEM CELLS)

Nawrót nowotworu, uznawany za przyczynę niepowodzeń w leczeniu, jest zazwyczaj mniej wrażliwy na aktualnie stosowane strategie chemioterapii. Rak jajnika zbudowany jest z heterogennej populacji komórek o odmiennych właściwościach i funkcjach. Wśród nich występuje rzadka subpopulacja komórek, która ze względu na swoje charakterystyczne cechy nie poddaje się skutkom obecnej terapii cytotoksycznej i powoduje nawrót choroby [19, 63, 27]. Właściwości takie jak zdolność do asymetrycznych podziałów, potencjał samoodnowy czy różnicowania to cechy jakie posiadają komórki macierzyste [8]. Dlatego subpopulację komórek o takich właściwościach, obecnych w obrębie komórek guza nazwano nowotworowymi komórkami macierzystymi (ang. *Cancer Stem Cells*, CSCs.).

Coraz więcej doniesień opisuje CSCs jako populację komórek odpowiedzialną za procesy nowotworzenia, chemiooporności nowotworu czy powstawanie przerzutów i wznowy [59]. Dlatego hipoteza nowotworowych komórek macierzystych (Cancer Stem Cell Model) pojawiła się jako kolejny model rozwoju nowotworów, który zakłada, że tylko CSCs posiadają nieograniczony potencjał do samoodnowy oraz możliwość różnicowania do bardziej wyspecjalizowanych

komórek stanowiących masę guza, tym samym powodując rozwój nowotworu [46]. Dodatkowo, nowotworowe komórki macierzyste jako bardziej odporne na działanie chemioterapeutyków, mają szansę przetrwać terapię i mogą być odpowiedzialne za odtworzenie guza po zakończonym leczeniu, co więcej guza składającego się w dużej mierze z komórek dużo bardziej odpornych na leki [11]. Model nowotworowych komórek macierzystych różni się od klasycznego modelu ewolucji klonalnej (Clonal Evolution Model), który zakłada, że każda komórka w guzie ma taki sam potencjał onkogenny i poprzez hamowanie szlaków apoptozy lub aktywację szlaków sygnalizacji komórkowej prowadzących do dalszych podziałów i proliferacji komórek powoduje rozwój nowotworu [52].

Nowotworowe komórki macierzyste opisywane są jako jedno z potencjalnych źródeł niekorzystnych cech wielu raków, w tym nabłonkowego raka jajnika. Poza powolnym tempem podziałów komórkowych, potencjał do przerzutowania, tendencje do tworzenia wznowy czy oporność na cytostatyki to tylko niektóre z potencjalnych cech promujących powstanie lekoopornej wznowy po zakończeniu leczenia. Komórki te pozostają niejako „w uśpieniu” w stadium niezróżnicowania w guzie pierwotnym i ulegają aktywacji pod wpływem czynników środowiskowych takich jak hipoksja, czy podanie cytostatyku [45, 22, 31]. Co więcej, nieograniczony potencjał do różnicowania czyni je źródłem heterogenności guza, przyczyny zróżnicowanej odpowiedzi na stosowane leki [63, 44]. Jeśli rzeczywiście przyjąć, że CSCs są przyczyną nawrotu choroby oraz oporności na chemioterapeutyki to stanowią one ważny cel w rozwoju nowych strategii leczenia, skupionych na ich eliminacji.

Identyfikacja i izolacja CSCs opiera się przede wszystkim na określeniu ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych, często już zdefiniowanych dla normalnych komórek macierzystych.

Cechą charakterystyczną CSCs jest wysoki poziom ekspresji transporterów błonowych z rodziny ABC (szczególnie P-gp i BCRP) odpowiedzialnych za aktywne usuwanie leków z komórki, oraz obecność markerów umożliwiających ich identyfikację, które mogą być wspólne dla różnych nowotworów [25]. Nie istnieje jednak jeden pojedynczy marker identyfikujący CSCs w konkretnym typie nowotworu.

Dotychczas, opisano kilka potencjalnych markerów CSCs, w tym CD24, CD44, CD117, CD133, ALDH1 (ang. *aldehyde dehydrogenase*, ALDH) [41, 25], czy EpCAM. Część z nich jest specyficzna nowotworowo, a niektóre – jak ALDH1A – uważane są za uniwersalne markery CSCs [48]. W odniesieniu do raka jajnika najczęściej wymieniane są, w różnych konfiguracjach: CD44, CD133 i ostatnio ALDH1A [8, 19, 49]. Dlatego w niniejszym przeglądzie skupiono się na charakterystyce trzech wymienionych markerów w kontekście ich użyteczności jako czynników predykcyjnych w raku jajnika i potencjalnych celów nowych terapii przeciwnowotworowych.

CD44

CD44 jest ważnym receptorem błonowym dla kwasu hialuronowego, który bierze udział w wielu procesach komórkowych, w tym proliferacji, różnicowaniu, migracji i inwazji komórek [2, 32]. Rola białka CD44 oraz jego poszczególnych wariantów (CD44v) nie została do końca poznana, choć jak wiadomo, fizjologicznie ulega ekspresji w zarodkowych komórkach macierzystych oraz komórkach tkanki łącznej i szpiku kostnego [33].

CD 44 oraz różne izoformy tego białka pełnią różnorodną rolę w nowotworach, między innymi promując wzrost guza, przejście epithelialno – mezenchymalne, migrację komórek nowotworowych, zahamowanie procesów anty-apoptotycznych i aktywację ścieżek pro-apoptotycznych czy wreszcie oporność na chemioterapię [70, 5].

Wśród wielu potencjalnych markerów nowotworowych komórek macierzystych CD44 jest jednym z najczęściej wymienianych w raku jajnika.

Jedno z pierwszych doniesień opisujących CD44 w kontekście nadawania charakteru macierzystego komórkom raka jajnika zostało opisane przez Bapata i wsp [4], którzy odkryli w masie guza niewielką subpopulację CD44 pozytywnych komórek (CD44+), charakteryzujących się agresywnym fenotypem, zdolnością do spontanicznych podziałów komórkowych oraz nieśmiertelnością.

Na podstawie poziomu ekspresji CD44 w komórkach nowotworowych określono dwie subpopulacje: CD44+ oraz CD44-, które zostały następnie zdefiniowane jako typ I i typ II nabłonkowego raka jajnika (ang. *epithelial ovarian cancer cells*, EOCs). Komórki typu I okazały się być odporne na chemioterapię, podczas gdy komórki typu II były chemowrażliwe [1]. Nie był również zaskakujący fakt, że subpopulacje CD44+ i CD44- różniły się pod względem potencjału proliferacyjnego czy produkcji cytokin, gdzie populacja CD44+ różnicowała się zarówno w komórki CD44+ jak i CD44- [42].

Ostatnie doniesienia wykazały, że CD 44 jest obiecującym markerem prognostycznym w raku piersi, trzustki, żołądka, jelita grubego, wątroby, czy nowotworach głowy i szyi, w których nadekspresja tego białka związana była z istotnym pogorszeniem czasu przeżycia pacjentów, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i innych narządów czy niższym stopniem zróżnicowania guza, a co za tym idzie, z niekorzystnym rokowaniem [70].

W raku jajnika, wyższa ekspresja CD44 w zaawansowanych nowotworach opornych na cytostatyki, w przypadku niskozróżnicowanych guzów pochodzenia nabłonkowego ma również związek z krótszym czasem przeżycia i czasem wolnym od progresji. U pacjentek z rakiem jajnika przebiegającym z wodobrzuszem zawartość komórek CD44+/CD24- przekraczająca 25% korelowała z wyższym ryzykiem wznowy oraz krótszym czasem wolnym od progresji [38]. Odwrotnie, u pacjentek z niską ekspresją białka CD44 w guzie nowotworowym zaobserwowano dłuższe czasy przeżycia i wolne od progresji. Nie są to jednak jednolite doniesienia, ponieważ istnieją

również prace, w których związek między zwiększonym poziomem ekspresji CD44, a czasem przeżycia pacjentek z rakiem jajnika nie został potwierdzony.

CD44 jako jeden z głównych markerów CSCs w raku jajnika, jest również zaangażowany w rozwój chemiooporności, co wydaje się mieć potwierdzenie w badaniach *in vitro*, w których poprzez wyciszenie ekspresji białka CD44 uzyskiwano większą wrażliwość komórek raka jajnika na cytostatyki.

Dzięki szerokiemu zaangażowaniu CD44 w różnego rodzaju procesy biologiczne, takie jak interakcje komórka-komórka, apoptoza, migracja, kancerogeneza czy przerzutowanie, ocena poziomu jego ekspresji nadal wykorzystywana jest jako narzędzie w diagnostyce patologicznej i w prognozowaniu raka jajnika w warunkach klinicznych.

CD133

CD133 jest ludzkim homologiem mysiego przezbłonowego białka prominy1, pierwotnie wykrytego w neuroepitelialnych komórkach macierzystych u myszy [66, 40]. Rola CD133 w organizmie jest nie do końca poznana, choć jako białko zlokalizowane głównie w błonie komórkowej i mikrokosmkach w szczytowej części błony komórkowej wydaje się odgrywać dużą rolę w utrzymaniu jej struktury [17, 44]. U człowieka białko to występuje fizjologicznie na powierzchni macierzystych i progenitorowych komórek hematopoietycznych [39, 12], oraz w komórkach nabłonkowych, jak i nienabłonkowych wielu tkanek, w tym gruczołu sutkowego, jądra, przewodu pokarmowego, dróg oddechowych czy łożyska.

Pomimo nie do końca poznanej funkcji CD133 w komórkach macierzystych, cząsteczka ta jest powszechnie wykorzystywana jako marker CSCs. Fenotyp CD133+ został po raz pierwszy wykorzystany przy identyfikacji i izolacji komórek macierzystych raka mózgu [53], a obecnie do izolacji CSCs w raku prostaty [7], trzustki [21], jelita grubego [48], oraz jajnika [1, 18, 14, 69].

W odniesieniu do raka jajnika, po raz pierwszy subpopulację komórek CD133+ została opisana przez zespół Baba i wsp [3]. Przebadali oni 40 różnych linii komórkowych raka jajnika, pierwotne guzy raka jajnika oraz nabłonkową frakcję komórek wyizolowanych z płynu z wodobrzusza. Poziom ekspresji oraz liczba komórek CD133 pozytywnych znacznie różniły się w zależności od linii komórkowej. Jednak komórki CD133+ dzieląc się dawały początek zarówno komórkom CD133+, jak również CD133-. Może to świadczyć o fakcie, że komórki CD133+ dzielą się asymetrycznie odnawiając pulę komórek o charakterze macierzystym oraz różnicując się w fenotypowo różne komórki potomne. Co więcej, populacja komórek CD133+ była bardziej oporna na działanie związków platyny. Podobne wyniki uzyskano w innym badaniu, gdzie komórki CD133+ pierwotnego raka jajnika charakteryzowały się znacznie wyższym potencjałem proliferacyjnym, a ich liczba w guzie pierwotnym była znacznie większa niż w łagodnych guzach jajnikach czy przerzutach do sieci większej [18]. Niestety, CD133 ulegało

ekspresji tylko w około 40% z przebadanych linii komórkowych oraz 30% guzów pierwotnych, co może stanowić ograniczenie dla wykorzystania tego markera dla większości typów raka jajnika [3].

Badanie ekspresji CD 133, zazwyczaj w połączeniu z innymi białkami powierzchniowymi, pozwala na identyfikację CSCs raka jajnika [20]. Ekspresja tego białka w raku jajnika jest zwykle wskaźnikiem niekorzystnym prognostycznie i związana jest z krótszym czasem przeżycia, wyższym stadium zaawansowania choroby, opornością na pochodne platyny i obecnością odległych przerzutów [9].

Dane literaturowe w tym zakresie bywają jednak odmienne, co może być związane z różnicami w stosowanej metodologii lub liczebnością analizowanych przypadków. Z jednej strony Ferradina i wsp. opisali, iż wykrywanie CD133 w raku jajnika nie wnosi żadnych informacji prognostycznych dla pacjentów [18]. Natomiast inne badania, przeprowadzone na dużej grupie chorych wykazały, że ekspresja CD133 była związana z surowiczym typem raka jajnika, późnym stadium choroby, występowaniem wodobrzusza i brakiem odpowiedzi na leczenie. Co więcej, ekspresja CD133 korelowała z krótszym czasem wolnym od wznowy (ang. *progression free survival* PFE) oraz krótszym ogólnym czasem przeżycia (ang. *overall survival*, OS) [69]. Podobne wyniki opisano w innych badaniach nad rakiem jajnika sugerując, iż CD133 odgrywa istotną rolę w progresji nowotworu oraz stanowi istotny czynnik prognostyczny [52, 56, 51].

Rozważana jest również rola CD133 w generowaniu oporności na chemioterapię oraz podtrzymanie potencjału do odtwarzania i odnawiania struktury guza w trakcie leczenia onkologicznego [57]. Pomimo, że wpływ ekspresji markerów nowotworowych komórek macierzystych na oporność nowotworów na leczenie jest jeszcze słabo poznany, to istnieją już doniesienia o związku ekspresji CD133 w raku jajnika z opornością na cytostatyki. Fenotyp komórek pierwotnego raka jajnika CD133+ korelował z opornością na terapie związkami platyny [3, 57, 1].

Niezależnie od ograniczeń w metodyce badawczej stosowanej do wykrywania ekspresji CD133, oraz braku jednoznacznej wiedzy co do roli CD133 w nowotworach, z większości aktualnych badań wynika, że ocena ekspresji CD133 może mieć istotne znaczenie w przewidywaniu czasu przeżycia, czasu wolnego od choroby czy czasu wolnego od progresji w wielu typach nowotworów [36, 67, 55, 69, 52, 56, 51, 34].

ALDH1A

ALDH1A jest białkiem z rodziny dehydrogenaz aldehydowych, enzymów katalizujących proces utleniania substratów aldehydowych do odpowiadających im kwasów karboksylowych. Fizjologicznie są to białka zlokalizowane w cytozolu, gdzie uczestniczą m.in. w detoksyfikacji komórek, ochronie przed działaniem wolnych rodników tlenowych [10], czy w metabolizmie witaminy A (retinolu) i kwasu retinowego [54], istotnego czynnika aktywującego ścieżkę różnicowa-

nia komórek. Różne izoformy ALDH wykrywano w komórkach mózgu, jąder, nerek, oka, wątroby czy płuc. Wykazują dużą aktywność w wielu kluczowych dla wszystkich komórek organizmu procesach metabolicznych, w tym w rozwoju normalnych komórek macierzystych [35].

Izoforma ALDH1A jest najczęściej wykorzystywana do identyfikacji nowotworowych komórek macierzystych, jakkolwiek mechanizmy leżące u podstaw jej funkcji w tej grupie komórek nie zostały dokładnie poznane. Nie określono również, czy enzym odpowiedzialny jest za utrzymanie specyficznych właściwości komórek macierzystych czy jest tylko ich markerem. Niemniej, obecność ALDH1A wykazano w komórkach takich nowotworów jak głowy i szyi [70], rak piersi [43], jelita grubego [23], trzustki [26], oraz jajnika [24, 28]. W większości tych badań podwyższony poziom ekspresji tego markera korelował inwazyjnym charakterem guza, zwiększonym potencjałem proliferacyjnym, neoangiogenezą, opornością na leczenie chemioterapeutykami, a często również ze złą prognozą.

Wykrywanie ekspresji ALDH1 samego lub w połączeniu z innymi markerami CSCs jest obecnie powszechnie akceptowaną metodą identyfikacji CSCs w raku jajnika. Wyniki badań wskazują, że ALDH1A może być wykorzystywany jako marker proliferacji komórek, migracji, złego rokowania czy chemiooporności [64, 65, 25], a inhibicja jego ekspresji prowadzi do zwiększenia wrażliwości na leczenie [30]. Ostatnie badania wskazują natomiast, że wysoka ekspresja ALDH1A znacząco koreluje z 5-letnim czasem przeżycia oraz czasem wolnym nawrotu u pacjentów z rakiem jajnika. Nie odnotowano za to zależności z innymi danymi kliniko-patologicznymi jak FIGO, stopień zaawansowania choroby, przerzuty do węzłów chłonnych, czy wiek pacjenta [51].

W nabłonkowym raku jajnika zawartość komórek wykazujących ekspresję ALDH1A waha się między 0.2 a 10%, przy czym wyższą ekspresję tego enzymu wykazano w podtypach endometrioidalnym i śluzowym, jak również w komórkach guza po przebytej chemioterapii z użyciem związków platyny [60]. Podwyższona ekspresja wykrywana była również w typie surowiczym, gdzie związana była ze złymi rokowaniami dla pacjenta [15, 30].

ALDH i jego izoformy odgrywają również istotną rolę w oporności nowotworów na chemioterapię. Jest to prawdopodobnie związane z ich funkcją detoksyfikującą i zaangażowaniem w komórkowy metabolizm tych leków. ALDH1 pozytywne CSCs są bardziej odporne na działanie cyklofosfamidu w raku jelita grubego [16], czy antracykliny i taksany w raku piersi [13]. Oporność na pochodne platyny i taksany związaną z ekspresją ALDH1A opisano również w liniach komórkowych i tkankach pochodzących od pacjentek chorych na raka jajnika [30, 58]. Co więcej, w badaniach na liniach komórkowych, istotnie wyższą ekspresję ALDH1A wykazano w komórkach raka opornych na paklitaxel i topotekan. Co istotne, wyciszenie aktywności ALDH1A w komórkach z wykorzystaniem siRNA przywróciło wrażliwość na działanie chemioterapeutyków [30].

Z racji na szerokie spektrum nowotworów, w których ALDH1A jest wykrywany, uznaje się go obecnie za uniwersalny marker CSCs. Jako marker potencjalnie odgrywający istotną rolę w chemiooporności nowotworów złośliwych, wydaje się być atrakcyjnym celem terapii celowanych, które mogłyby uwrażliwić komórki raka, w tym CSCs, na podawane standardowo cytostatyki.

PODSUMOWANIE

Rak jajnika jest heterogennym nowotworem z histologicznie określonymi typami, gdzie z dużym prawdopodobieństwem CSCs są zaangażowane w proces jego rozwoju. Pomimo wielu badań nad próbami identyfikacji i izolacji CSCs, jak dotąd nie udało się szczegółowo scharakteryzować ich profilu. Natomiast coraz więcej dowodów wskazuje na to, iż w obrębie guza istnieje więcej niż jedna populacja CSC lub/i, że te same CSCs mogą wykazywać ekspresję różnych markerów nowotworowych komórek macierzystych. Może to wyjaśniać heterogenność raka jajnika, jego agresywny charakter, tendencje do tworzenia ognisk wznowy oraz oporność na leczenie.

Wszystkie wyżej wymienione cechy CSCs oraz ich implikacje kliniczne sprawiają, że dalsze badania nad mechanizmami warunkującymi ich aktywność wydają się bardziej niż zasadne. Stworzyłyby one szansę na opracowanie skutecznego leczenia choroby, na przykład nowych strategii terapii celowanych, ukierunkowanych właśnie na niszczenie CSCs. Co więcej, badanie ich ekspresji w guzie pierwotnym oraz ogniskach przerzutowych raka jajnika może wspomóc poznanie biologii nowotworu, ułatwić wytypowanie kandydatek mogących czerpać największe korzyści ze stosowania określonych schematów leczenia. Ponadto, być może, w przyszłości, opisywane zjawisko mogłoby stać się markerem prognostycznym ocenianym *in situ* u pacjentek z rakiem jajnika.

LITERATURA

- [1] ALVERO AB, CHEN R, FU HH, MONTAGNA M, SCHWARTZ PE, RUTHERFORD T, SILASI DA, STEFFENSEN KD, WALDSTROM M, VISINTIN I, MOR G. Molecular phenotyping of human ovarian cancer vstem cells unravels the mechanism for repair and chemoresistance. *Cell cycle* 2009; **8**:158-166.
- [2] ARUFFO A., STAMENKOVIC I., MELNICK M., UNDERHILL C. B., SEED B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; **61**: 1303-1313
- [3] BABA T, CONVERY PA, MATSUMURA N, WHITAKER RS, KONDOH E, PERRY T, HUANG Z, BENTLEY RC, MORI S, FUJII S, MARKS JR, BERCHUCK A, MURPHY SK. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene* 2009; **15**: 209-218.
- [4] BAPAT SA, MALI AM, KOPPIKAR CB, KURREY NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2005; **65**: 3025-3029.

- [5] BHATTACHARYA R, MITRA T, RAY CHAUDHURI S, ROY SS. Mesenchymal splice isoform of CD44 (CD44s) promotes EMT/invasion and imparts stem-like properties to ovarian cancer cells. *J Cell Biochem* 2018; **119**: 3373-3383.
- [6] BOWTELL DD, BOHM S, AHMED AA, ASPURIA PJ, BAST JR RC, BERAL V, BEREK JS, BIRRER MJ, BLAGDEN S, BOOKMAN MA, BRENTON JD, CHIAPPINELLI KB, MARTINS FC, COUKOS G, DRAPKIN R, EDMONDSON R, FOTOPOULOU C, GABRA H, GALON J, GOURLEY C, HEONG V, HUNTSMAN DG, IWANICKI M, KARLAN BY, KAYE A, LENGUEL E, LEVINEDA, LU KH, MCNEISH IA, MENON U, NAROD SA, NELSON BH, NEPHEW KP, PHAROAH P, POWELL DJ, RAMOS P, ROMERO IL, SCOTT CL, SOOD AK, STRONACH EA, BALKWILL FR. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; **15**: 668-679.
- [7] BROWN MD, GILMORE PE, HART CA, SAMUEL JD, RAMANI VA, GEORGE NJ, CLARKE NW. Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations. *Prostate* 2007; **15**: 1384-1396.
- [8] BURGOS- OJEDA D, RUEDA BR, BUCKANOVICH RJ. Ovarian cancer stem cell markers: prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett* 2012; **1**: 1-7.
- [9] CIOFFI M, D'ALTERIO C, CAMERLINGO R, TIRINO V, CONSALES C, RICCIO A, IERANÒ C, CECERE SC, LOSITO NS, GREGGI S, PIGNATA S, PIROZZI G, SCALA S. Identification of a distinct population of CD133(+)/CXCR4(+) cancer stem cells in ovarian cancer. *Sci Rep* 2015; **28**: 10357.
- [10] CLARK DW, PALLE K. Aldehyde dehydrogenases in cancer stem cells: potential as therapeutic targets. *Ann Transl Med* 2016; **24**: 518.
- [11] CLEVERS H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011; **17**: 313-319.
- [12] CORBEIL D, RÖPER K, WEIGMANN A, HUTTNER WB. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 1998; **7**: 2625-2626.
- [13] CROKER AK, ALLAN AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **133**: 75-87.
- [14] CURLEY MD, THERRIEN VA, CUMMINGS CL, SERGENT PA, KOULOURIS CR, FRIEL AM, ROBERTS DJ, SEIDEN MV, SCADDEN DT, RUEDA BR, FOSTER R. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells* 2009; **12**: 2875-2883.
- [15] DENG S, YANG X, LASSUS H, LIANG S, KAUR S, YE Q, LI C, WANG LP, ROBY KF, ORSULIC S, CONNOLLY DC, ZHANG Y, MONTONE K, BÜTZOW R, COUKOS G, ZHANG L. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* 2010; **4**: e10277.
- [16] DYALL S, GAYTHER SA, DAFOU D. Cancer stem cells and epithelial ovarian cancer. *J Oncol* 2010; **2010**: 105269.
- [17] DYLLA SJ, BEVIGLIA L, PARK IK, CHARTIER C, RAVAL J, NGAN L, PICKELL K, AGUILAR J, LAZETIC S, SMITH-BERDAN S, CLARKE MF, HOEY T, LEWICKI J, GURNEY AL. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 2008; **6**: e2428.
- [18] FERRANDINA G, BONANNO G, PIERELLI L, PERILLO A, PROCOLI A, MARIOTTI A, CORALLO M, MARTINELLI E, RUTELLA S, PAGLIA A, ZANNONI G, MANCUSO S, SCAMBIA G. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008; **18**: 506-514.
- [19] GARSON K, VANDERHYDEN BC. Epithelial ovarian cancer stem cells: underlying complexity of a simple paradigm. *Reproduction* 2015 Feb; **149**(2): R59-70.
- [20] GLUMAC PM, LEBEAU AM: The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med* 2018; **1**: 18.

- [21] GOU S, LIU T, WANG C, YIN T, LI K, YANG M, ZHOU J. Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties. *Pancreas* 2007; **34**: 429-35.
- [22] GREIJER AE, VAN DER GROEP P, KEMMING D, SHVARTS A, SEMENZA GL, MEIJER GA, VAN DE WIEL MA, BELIEN JAM, VAN DIEST PJ, VAN DER WALL E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor I (HIF-1) *The J of Pathol* 2005; **206**: 291-304.
- [23] HESSMAN CJ, BUBBERS EJ, BILLINGSLEY KG, HERZIG DO, WONG MH. Loss of expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 correlates with advanced-stage colorectal cancer. *Am J Surg* 2012; **203**: 649-653.
- [24] HUANG R, LI X, HOLM R, TROPE CG, NESLAND JM, SUO Z. The expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in ovarian carcinomas and its clinicopathological associations: a retrospective study. *BMC Cancer* 2015; **15**: 502.
- [25] JANUCHOWSKI R, WOJTOWICZ K, STERZYŃSKA K, SOSIŃSKA P, ANDRZEJEWSKA M, ZAWIERUCHA P, NOWICKI M, ZABEL M. Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; **78**: 248-259.
- [26] KAHLERT C, BERGMANN F, BECK J, WELSCH T, MOGLER C, HERPEL E, DUTTA S, NIEMIETZ T, KOCH M, WEITZ J. Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2011; **11**: 275.
- [27] KRESO A, DICK J; Evolution of the Cancer Stem Cell model. *Cell Stem Cell* 2014; **14**: 275-291.
- [28] KURODA T, HIROHASHI Y, TORIGOE T, YASUDA K, TAKAHASHI A, ASANUMA H, MORITA R, MARIYA T, ASANO T, MIZUUCHI M, SAITO T, SATO N. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One* 2013; **6**: e65158.
- [29] KYRGIU M, SALANTI G, PAVLIDIS N, PARASKEVAIDIS E, IOANNIDIS JPA. Survival benefits with diverse chemotherapy regimens for ovarian cancer: meta-analysis of multiple treatments. *J Natl Cancer Inst* 2006; **22**: 1655-1663.
- [30] LANDEN CN JR, GOODMAN B, KATRE AA, STEG AD, NICK AM, STONE RL, MILLER LD, MEJIA PV, JENNINGS NB, GERSHENSON DM, BAST RC JR, COLEMAN RL, LOPEZ-BERESTEIN G, SOOD AK. Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2010; **12**: 3186-3199.
- [31] LARA PC, LLORET M, CLAVO B, APOLINARIO RM, HENRIQUEZ-HERNANDEZ LA, BORDON E, FONTES F, REY A. Severe hypoxia induces chemo-resistance in clinical cervical tumors through MVP over-expression. *Radiation Oncology* 2009; **4**: 29.
- [32] LESLEY J., HYMAN R., KINCADE P. W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; **54**: 271-335.
- [33] LIN J, DING D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int* 2017; **17**: 8.
- [34] LIU CL, CHEN YJ, FAN MH, LIAO YJ, TSUI LM. Characteristics of CD133-Sustained Chemoresistant Cancer Stem-Like Cells in Human Ovarian Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2020; **18**: 6467.
- [35] MA I, ALLAN AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 2011; **2**: 292-306.
- [36] MAEDA S, SHINCHI H, KURAHARA H, MATAKI Y, MAEMURA K, SATO M, NATSUGOE S, AIKOU T, TAKAO S. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008; **8**: 1389-1397.
- [37] MEACHAM CE, MORRISON SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013; **501**: 328-337.
- [38] MENG E, LONG B, SULLIVAN P, MCCLELLAN S, FINAN MA, REED E, SHEVDE L, ROC-CONI RP. CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. *Clin Exp Metastasis* 2012; **29**: 939-948.

- [39] MIRAGLIA S, GODFREY W, YIN AH, ATKINS K, WARNKE R, HOLDEN JT, BRAY RA, WALLER EK, BUCK DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; **12**: 5013-5021.
- [40] MIZRAK D, BRITTAN M, ALISON MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 2008; **1**: 3-9.
- [41] MOITRA K, LOU H, DEAN M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* 2011; **89**: 491-502.
- [42] MOR G, YIN G, CHEFETZ I, YANG Y, ALVERO A. Ovarian cancer stem cells and inflammation. *Cancer Biol Ther* 2011; **11**: 708-713.
- [43] OHI Y, UMEKITA Y, YOSHIOKA T, SOUDA M, RAI Y, SAGARA Y, SAGARA Y, SAGARA Y, TANIMOTO A. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology* 2011; **4**: 776-80.
- [44] PARTE S.C., BATRA SK, KAKAR SS. Characterization of stem cell and cancer stem cell populations in ovary and ovarian tumors. *J Ovarian Res* 2018; **1**: 69.
- [45] PASQUIER J, RAFII A.: Role of the Microenvironment in Ovarian Cancer Stem Cell Maintenance *Biomed Res Int* 2013; **2013**.
- [46] RAHMAN M, DELEYROLLE L, VEDAM-MAI V, AZARI H, ABD-EL-BARR M, REYNOLDS BA. 2011. The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls. *Neurosurgery* **68**: 531-545.
- [47] RICCI F, GUFFANTI F AND DAMIA G. Ovarian Cancer Recurrence: Role of Ovarian Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *J Cancer Sci Ther* 2014; **6**: 8.
- [48] RICCI-VITIANI L, LOMBARDI DG, PILOZZI E, BIFFONI M, TODARO M, PESCHLE C, DE MARIA R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; **7123**: 111-115.
- [49] ROY M., CONNOR J, AL.-NIAIMI A, ROSE SL, MAHAIAN A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) expression by immunohistochemistry is associated with chemo-refractoriness in patients with high-grade ovarian serous carcinoma. *Hum Pathol* 2018; **73**: 1-6.
- [50] RUSCITO I, CACSIRE CASTILLO-TONG D, VERGOTE I, IGNAT I, STANSKE M, VANDERSTICHELE A, GANAPATHI RN, GLAJZER J, KULBE H, TRILLSCH F, MUSTEA A, KREUZINGER C, BENEDETTI PANICI P, GOURLEY C, GABRA H, KESSLER M, SEHOULI J, DARB-ESFAHANI S, BRAICU EI. Exploring the clonal evolution of CD133/aldehyde-dehydrogenase-1 (ALDH1)-positive cancer stem-like cells from primary to recurrent high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). A study of the Ovarian Cancer Therapy-Innovative Models Prolong Survival (OCTIPS) Consortium. *Eur J Cancer* 2017; **79**: 214-225.
- [51] RUSCITO I, DARB-ESFAHANI S, KULBE H, BELLATI F, ZIZZARI IG, RAHIMI KOSHKAKI H, NAPOLETANO C, CASERTA D, RUGHETTI A, KESSLER M, SEHOULI J, NUTI M, BRAICU EI. The prognostic impact of cancer stem-like cell biomarker aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1) in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2018; **1**: 151-157.
- [52] SILVA IA, BAI S, MCLEAN K, YANG K, GRIFFITH K, THOMAS D, GINESTIER C, JOHNSTON C, KUECK A, REYNOLDS RK, WICHA MS, BUCKANOVICH RJ. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res* 2011; **11**: 3991-4001.
- [53] SINGH SK, CLARKE ID, TERASAKI M, BONN VE, HAWKINS C, SQUIRE J, DIRKS PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; **18**: 5821-5828.
- [54] SLADEK NE. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; **17**: 7-23.
- [55] SONG W, LI H, TAO K, LI R, SONG Z, ZHAO Q, ZHANG F, DOU K. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Pract* 2008; **8**: 1212-1218.
- [56] STEMBERGER-PAPIĆ S, VRDOLJAK-MOZETIC D, OSTOJIĆ DV, RUBESA-MIHALJEVIĆ R, KRIGTOFIĆ I, BRNCIĆ-FISHER A, KRAGEVIĆ M, EMINOVIĆ S. Expression of CD133 and CD117 in 64 Serous Ovarian Cancer Cases. *Coll Antropol* 2015; **3**: 745-753.

- [57] STEG AD, BEVIS KS, KATRE AA, ZIEBARTH A, DOBBIN ZC, ALVAREZ RD, ZHANG K, CONNER M, LANDEN CN. Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2012; **3**: 869-881.
- [58] STERZYŃSKA K, KLEJEWSKI A, WOJTOWICZ K, ŚWIERCZEWSKA M, NOWACKA M, KAŻMIERCZAK D, ANDRZEJEWSKA M, RUSEK D, BRAŻERT M, BRAŻERT J, NOWICKI M, JANUCHOWSKI R. Mutual Expression of ALDH1A1, LOX, and Collagens in Ovarian Cancer Cell Lines as Combined CSCs- and ECM-Related Models of Drug Resistance Development. *Int J Mol Sci* 2018; **20**: 54.
- [59] SUGIHARA E, SAYA H. Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer* 2013; **6**: 1249-1259.
- [60] TOMITA H, TANAKA K, TANAKA T, HARA A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 2016; **10**: 11018-11032.
- [61] THIGPEN T. First-line therapy for ovarian carcinoma: what's next? *Cancer Invest* 2004; **22**: 21-28
- [62] TSIBULAK I, ZEIMET AG, MARTH C. Hopes and failures in front-line ovarian cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; **143**: 14-19.
- [63] TYSNES BB. Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control. *Neoplasia* 2010; **7**: 506-515
- [64] WANG YC, YO YT, LEE HY, LIAO YP, CHAO TK, SU PH, LAI HC. ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome. *Am J Pathol* **3**: 1159-1169.
- [65] WANG Y, SHAO F, CHEN L. ALDH1A2 suppresses epithelial ovarian cancer cell proliferation and migration by downregulating STAT3. *Onco Targets Ther* 2018; **11**: 599-608.
- [66] WEIGMANN A, CORBEIL D, HELLWIG A, HUTTNER WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **23**: 12425-12430.
- [67] ZEPPERLICK F, AHMADI R, CAMPOS B, DICTUS C, HELMKE BM, BECKER N, LICHTER P, UNTERBERG A, RADLWIMMER B, HEROLD-MENDE CC. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 123-129.
- [68] ZHANG S, BALCH C, CHAN MW, LAI HC, MATEI D, SCHILDER JM, YAN PS, HUANG TH, NEPHEW KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008; **11**: 4311-4320.
- [69] ZHANG J, GUO X, CHANG DY, ROSEN DG, MERCADO-URIBE I, LIU J. CD133 expression associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Mod Pathol* 2012; **3**: 456-464.
- [70] ZHOU C, SUN B. The prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in head and neck squamous cell carcinomas: a meta-analysis. *Oral Oncol* 2014; **12**: 1144-1148.
- [71] ZHOU J, DU Y, LU Y, LUAN B, XU C, YU Y, ZHAO H. CD44 Expression Predicts Prognosis of Ovarian Cancer Patients Through Promoting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating Snail, ZEB1, and Caveolin-1. *Front Oncol* 2019; **9**: 802.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 31.11.2020

Przyjęto: 15.12.2020

Natalia Iżycka

Klinika Onkologii Ginekologicznej

Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

e-mail: natalia.izycka@gmail.com

POTENCJAŁ APLIKACYJNY ROŚLIN TRANSGENICZNYCH W PRODUKCJI REKOMBINOWANYCH BIAŁEK O WŁAŚCIWOŚCIACH FARMAKOLOGICZNYCH

TRANSGENIC PLANTS AS A SOURCE OF RECOMBINANT
PROTEINS WITH PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

Adrianna MICHALAK, Anna WDOWIKOWSKA

Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej,
Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

Streszczenie: Rośliny genetycznie modyfikowane (GM) stanowią wydajną oraz bezpieczną platformę do produkcji rekombinowanych białek o przeznaczeniu terapeutycznym, przy relatywnie niskich nakładach zasobów kapitałowych. Dzięki roślinnym systemom ekspresji uzyskano już wiele różnych grup terapeutyków, w tym antygeny stanowiące podjednostki tradycyjnych oraz stosowanych doustnie szczepionek, przeciwciała, toksyny czy też enzymy. Wśród słabych stron roślinnego systemu produkcji rekombinowanych białek należy wymienić odmienny od typowego dla ssących komórek wzór glikozylacji białek, co może wywoływać niepożądaną immunogenność biofarmaceutyków. Uporanie się z niedoskonałościami roślinnego systemu ekspresyjnego skutkowało pojawieniem się na rynku pierwszego leku produkowanego z użyciem roślin GM – glukocerebrozydazy, stosowanej w leczeniu choroby Gaucher’a. Ponadto na zaawansowanych etapach badań klinicznych znajduje się obecnie szereg potencjalnych leków. Co więcej, dostrzeżono potencjał aplikacyjny roślin transgenicznych w walce z wirusem SARS-CoV-2, który wywołał pandemię w 2019 roku. W związku z powyższym, w niniejszej pracy przedstawiono molekularne aspekty tworzenia platform ekspresyjnych opartych o rośliny genetycznie modyfikowane, wraz z opisem silnych i słabych stron tego systemu. Opisano także najnowsze dane dotyczące badań klinicznych rekombinowanych białek terapeutycznych produkowanych w roślinach. Aż wreszcie przedstawiono możliwe aspekty użycia roślin GM w walce z wirusem SARS-CoV-2.

Słowa kluczowe: rośliny transgeniczne, biofarmaceutyki, bioreaktory, roślinny system ekspresji, wirus SARS-CoV-2

Summary: Genetically modified (GM) plants are considered as low-cost, efficient, and safe platform for production of recombinant proteins with pharmacological properties. With the use of plant expression systems, many different groups of therapeutics have already been obtained, including antigens constituting subunits of traditional and *per os* vaccines, antibodies, toxins, or enzymes. Among disadvantages of this system, it should be mentioned that the glycosylation pattern of proteins differs from that typical of mammalian cells, which may induce undesirable immunogenicity of biopharmaceuticals. Up to now only one drug is produced with the use of GM plants – glucocerebrosidase, used in the treatment of Gaucher's disease. However, a number of potential drugs are currently at advanced stages of their clinical trials. Moreover, the application of transgenic plants in the fight against the SARS-CoV-2 virus has been noticed. Therefore, this paper presents the molecular aspects of creating expression platforms based on genetically modified plants, along with a description of the advantages and disadvantages of this system. The latest clinical trials data of recombinant therapeutic proteins produced in plants are also described. Finally, the possible aspects of the use of GM plants in the fight against the SARS-CoV-2 virus have been presented.

Keywords: transgenic plants, bioreactors, plant expression system, virus SARS-CoV-2

WSTĘP

Przez wiele wieków wiedza na temat zastosowania roślin w medycynie rosła. Naukowcy stale odkrywają nowe związki pochodzenia roślinnego oraz ich wszechstronne zastosowanie terapeutyczne. Powstanie przed kilkudziesięciami laty inżynierii genetycznej, umożliwiającej manipulację genami oraz transformację komórek, następnie zsekwencjonowanie ludzkiego genomu, nakreśliło nowe możliwości wykorzystania roślin jako systemów ekspresyjnych. Współcześnie rośliny genetycznie modyfikowane (GM) uznawane są za alternatywę dla bakteryjnych, drożdżowych systemów ekspresyjnych oraz ssaczych linii komórek w produkcji białek heterologicznych. Coraz częściej wskazuje się rośliny transgeniczne jako źródło zróżnicowanych białek rekombinowanych o właściwościach farmakologicznych [37]. Dlatego celem niniejszej pracy jest przybliżenie molekularnych aspektów tworzenia platform ekspresyjnych z zastosowaniem roślin GM, porównanie genetycznie modyfikowanych roślin oraz pozostałych najczęściej stosowanych organizmów jako źródła rekombinowanych białek wykorzystywanych w medycynie. W pracy poruszane są także aspekty wykorzystania roślinnych systemów ekspresji w walce z wirusem SARS-CoV-2, który w 2019 spowodował pandemię COVID-19 na całym świecie.

OPTIMALIZACJA PROCESU PRODUKCJI BIAŁEK W ROŚLINACH GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH

Roślinne kultury *in vitro* w tzw. bioreaktorach oraz uprawa transgenicznych odmian roślin w szklarniach lub na polu w kontrolowanych warunkach to najpowszechniejsze kierunki wykorzystania roślin w przemyśle biotechnologicznym

[12]. Popularna stała się koncepcja upraw molekularnych, polegająca na odpowiednim przygotowaniu roślin do produkcji białek o znaczeniu farmakologicznym i przemysłowym na szeroką skalę [50]. Produkcja białek rekombinowanych z wykorzystaniem roślin GM wymaga starannego zaplanowania całego procesu i obejmuje wybór gatunku rośliny-gospodarza i metody transformacji rośliny oraz kasyety ekspresyjnej wraz z przygotowaniem wektora do transformacji. Na wczesnych etapach planowania uwzględnia się ponadto przyszłą lokalizację ekspresji białka rekombinowanego w obrębie poszczególnych tkanek rośliny [17]. Regulacja ekspresji transgenów w przypadku produkcji białek rekombinowanych jest złożonym, wieloetapowym procesem. Aby zapewnić wydajną ekspresję białek w transgenicznej roślinie, konieczna jest optymalizacja każdego z etapów procesu na poziomie molekularnym. Optymalizacja ta obejmuje zagadnienia takie jak wybór promotora, otrzymanie stabilnego transkryptu oraz uzyskanie wydajnego procesu translacji. Sortowanie białka do odpowiednich kompartmentów oraz ich akumulacja stanowią kluczowe etapy dla uzyskania efektywnej produkcji białek heterologicznych [35].

SELEKCJA ODPOWIEDNIEGO GATUNKU ROŚLINY JAKO PLATFORMY PRODUKCYJNEJ

Wybór rośliny-gospodarza jest kluczowym czynnikiem determinującym sukces całego procesu produkcji biofarmaceutyków. Roślina taka stanowić będzie platformę ekspresji oraz akumulacji rekombinowanych białek. Czynniki ekonomiczne to główne aspekty rozważane podczas wyboru rośliny i zazwyczaj planując proces produkcyjny jako pierwsze poddaje się je pod rozważanie [50]. Czynniki te obejmują zagadnienia takie jak biomasa plonów, właściwości ich przechowywania czy łatwość transportowania, wartość produkowanego rekombinowanego białka *per se*, koszty kapitałowe zasobów niezbędnych do rozpoczęcia produkcji, koszty utrzymania hodowli, wymagana powierzchnia uprawy transgenicznych roślin, jadalność, długość cyklu produkcyjnego, a także łatwość transformacji oraz regeneracji [15, 63]. Co więcej, gatunki roślin samopylnych są bardziej pożądane niż te, które wymagają zapylenia krzyżowego, ze względu na konieczność ograniczenia rozpowszechniania pyłku pochodzącego z roślin GM. Mając to na uwadze w wielu przypadkach wybierane są gatunki, których uprawę można przeprowadzić w warunkach izolacji, na przykład pomidory hodowane w szklarniach [17]. Do gatunków roślin najczęściej wykorzystywanych do produkcji białek heterologicznych należą *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Vigna unguiculata*, *Zea mays*, *Daucus carota* oraz *Solanum lycopersicum* [49, 17].

Jednymi z częściej wybieranych tkanek roślinnych w celu ekspresji i akumulacji białka heterologicznego są zielone części rośliny, zazwyczaj liście oraz tkanki łodygi. Konstytutywna ekspresja transgenu w tych organach jest relatywnie prosta do osiągnięcia, a poziom biosyntezy białka bardzo wysoki [17]. Główną

wadą związaną z wyborem zielonych organów jest ich krótki okres trwałości po zebraniu, co wiąże się z koniecznością przeprowadzenia możliwie jak najszybszego procesu ich przetworzenia i oczyszczenia białek rekombinowanych [15]. Utrudniony jest też sam proces izolacji transgenicznego białka z tkanek zielonych ze względu na skomplikowany i żmudny proces oczyszczania masy liści ze specyficznych związków, takich jak barwniki, alkaloidy i inne metabolity wtórne [17]. Podatność na szereg technik transformacji oraz łatwość regeneracji czynią rośliny z rodzaju *Nicotiana*, główną platformę produkcji biofarmaceutyków w liściach [71]. Tytoń posiada również większość cech pożądaných z ekonomicznego punktu widzenia, np. wysoki poziom biomasy plonów, możliwość zwiększania skali produkcji, dokładnie opracowane protokoły transformacji czy całoroczny wzrost oraz zbiór plonów [64, 67]. Liczne zalety roślin z gatunków *N. tabacum* oraz *N. benthamiana* sprawiają, że są one najczęściej wybieranymi roślinami w uprawach molekularnych w celu produkcji najistotniejszych z medycznego punktu widzenia białek, takich jak przeciwciała, szczepionki czy cytokiny [10, 71]. Jednakże tytoń zawiera duże ilości toksycznych substancji, jak nikotyna czy inne alkaloidy, które muszą zostać usunięte w trakcie procesu oczyszczania biofarmaceutyków z tkanek rośliny [50]. Ze względu na żmudny proces oczyszczania białek rekombinowanych z liści oraz negatywną opinię społeczeństwa odnośnie tytoniu jako szkodliwej używki, poszukiwane są alternatywne systemy ekspresji dla produkcji i akumulacji biofarmaceutyków w liściach. Obecnie jako bioreaktory dla upraw molekularnych eksplorowane są rośliny takie jak lucerna siewna (*Medicago sativa*) czy sałata siewna (*Lactuca sativa*) [59].

Nasiona także są często wybierane jako miejsce ekspresji oraz akumulacji białek rekombinowanych. Szczególnie dotyczy to gatunków roślin, których nasiona gromadzą znaczne ilości białek. Transgen wprowadza się na wektorach pod kontrolą promotorów specyficznych dla nasion, gwarantując wysoki poziom biosyntezy białka. Proces oczyszczania białek z tkanek nasion jest znacznie mniej skomplikowany niż w przypadku liści. Ponadto, białka mogą być przechowywane w nasionach w temperaturze otoczenia przez dłuższy czas [35]. Wadą przy wykorzystaniu tego organu jest długi czas oczekiwania na wytworzenie nasion przez roślinę, w zależności od jej cyklu życiowego. Wśród roślin, których nasiona najczęściej stosuje się w uprawach molekularnych znajduje się soja (*Glycine max*) [49], a także ryż (*Oryza sativa*), pszenica (*Triticum aestivum*) oraz kukurydza (*Zea mays*) [34]. Jadalna szczepionka Muco-Rice CTB przeciwko wirusowi cholery, wyprodukowana w ryżu, wykazuje stabilność w temperaturze pokojowej przez 8 miesięcy, co więcej jest odporna na trawienie pepsyną [48]. Natomiast rekombinowana szczepionka przeciw enterotoksynogennemu szczepowi pałeczki okrężnicy, stworzona za pośrednictwem nasion soi, pozostaje stabilna przez okres 4 lat [49].

Szczególnym znaczeniem dla produkcji leków rekombinowanych wykazuje się mech *Physcomitrella patens*, który posiada ugruntowany status organizmu

modelowego w badaniach nad ewolucją, rozwojem i fizjologią roślin. *Physcomitrella patens* jest rośliną, w której z powodzeniem wycisza się geny kodujące białka szlaku glikozylacji metodą “knock-out” [11]. Zaletą mchów jest także relatywnie niski koszt hodowli w fotobioreaktorach lub na szalkach Petriego. Ponadto komórki, a także całe tkanki *P. patens* charakteryzują się wysoką zdolnością regeneracji po zastosowaniu procedury transformacji genetycznej [70].

Przy rozważaniu wykorzystania roślin w produkcji białek o znaczeniu terapeutycznym lub diagnostycznym warto wspomnieć o kulturach *in vitro* komórek roślinnych, które to posiadają większość zalet roślinnych systemów ekspresyjnych, a w szczególności możliwość produkowania skomplikowanych białek, które są prawidłowo glikozylowane oraz fałdowane bez ryzyka kontaminacji patogenami czy endotoksynami [75]. Chociaż kultury komórek roślinnych nie zapewniają produkcji na tak szeroką skalę jak uprawa całych transgenicznych roślin na polach, to pozbawione są szeregu problemów charakterystycznych dla konwencjonalnych upraw, związanych ze zmiennością pogody, szkodnikami, glebą czy przepływem genów do środowiska [57]. Ze względu na krótki cykl wzrostu komórek w zawieszonych kulturach, czas potrzebny do wyprodukowania rekombinowanych białek z ich użyciem liczony jest w dniach lub tygodniach, w odróżnieniu od miesięcy, które zajmuje produkcja w całych transgenicznych roślinach [79]. Hodowanie komórek roślinnych w sterylnych i kontrolowanych warunkach *in vitro* umożliwia dokładny nadzór nad warunkami wzrostu komórek, użycia promotorów indukowanych chemicznie czy wektorów wirusowych [78, 75]. Kultury komórek roślinnych dają możliwość sekrecji rekombinowanych białek bezpośrednio do podłoża, co wiąże się z niskim kosztem przetwarzania i oczyszczania produkowanych białek. Częściowo rekompensuje to niski uzysk białek rekombinowanych produkowanych w hodowlach *in vitro* komórek roślinnych i związane z tym wysokie koszty kapitałowe [57, 62]. Najczęściej używane linie komórek roślinnych w celu produkcji biofarmaceutyków otrzymywane są z kalusa siewek tytoniu [79]. Linie te posiadają pożądane cechy takie jak szybki wzrost, synchronizację cyklu komórkowego oraz łatwość transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* [53, 87]. Inne szeroko stosowane linie komórek roślinnych pochodzą z jadalnych gatunków takich jak ryż (*Oriza sativa*), soja (*Glycine max*), lucerna siewna (*Medicago sativa*), marchew (*Daucus carota*) czy pomidor (*Lycopersicon esculentum*) [79]. Linie komórek marchwi (*D. carota*) są używane przez firmę Protalix w celu produkowania ludzkiej glukocerebrozydazy, która jest pierwszym biofarmaceutykiem produkowanym z użyciem roślinnego systemu ekspresyjnego zaakceptowanym do wypuszczenia na rynek [66].

WYBÓR PROMOTORA DO KASETY EKSPRESYJNEJ

W osiągnięciu wysokiego poziomu transkrypcji transgeny ważną rolę odgrywają siła oraz profil inicjacji transkrypcji, co osiąga się poprzez zastosowanie

odpowiedniego promotora. Promotory konstytutywne indukują ekspresję genów niezależnie od środowiska komórki, pozwalając na ciągłą syntezę białka we wszystkich tkankach roślinnych. Przykładami promotorów konstytutywnych stosowanych do produkcji białek w roślinach jest promotor CaMV 35S wirusa mozaiki kalafiora charakterystyczny dla roślin dwuliściennych oraz promotor ubikwityny-1 z kukurydzy dla jednoliściennych [74]. Promotor CaMV 35S jest z powodzeniem wykorzystany do produkcji antygenów, m.in. podjednostki B toksyny cholery (CTB) [31], czy glikoproteiny S wirusa SARS [36]. Szereg białek, przykładowo aprotynina [80], czy antygen powierzchniowy WZW B (HBsAg) [33] zostały wyprodukowane w roślinnych systemach ekspresyjnych przy użyciu promotora ubikwityny-1. Jednakże konstytutywna ekspresja rekombinowanego białka może negatywnie oddziaływać na plony i prowadzić do ograniczenia wzrostu transformowanych roślin [27]. Alternatywnym rozwiązaniem jest stosowanie promotorów specyficznych, wykorzystywanych w celu regulacji ekspresji transgenów w tkankach lub organach takich jak: bulwa, nasiona bądź owoce [74]. Przykładem promotora specyficznego jest promotor gluteliny ryżu GluA-2 (Gt-1), który zapewnia specyficzną ekspresję w nasionach ryżu oraz kukurydzy [77]. Najwydajniejszą zaś produkcję białek rekombinowanych w nasionach roślin umożliwiają promotory lektyny i glicytyny soi, leguminy groszku (legA) oraz nieznanego białka nasion bobu (ang. *unknown seed protein*; USP) [61, 46, 35].

Działanie promotorów może być wspomagane szeroko pojętymi czynnikami transkrypcyjnymi, które działają jako wzmacniacze aktywności promotorów [50]. Przykładem są regiony przyłączenia macierzy jądrowych (MAR), które mogą oddziaływać z regulatorowymi białkami macierzy jądrowej, stanowiąc element regulatorowy *cis* w selektywnej ekspresji genów [73]. MAR łączą się z sąsiednimi loci regionów, w których znajdują się sekwencje odpowiedzialne za rekrutację czynników transkrypcyjnych dla promotorów [17].

WZMACNIANIE STABILNOŚCI REKOMBINOWANEGO BIAŁKA

Najważniejsze z technik pozwalających na zwiększenie stabilności oraz akumulacji rekombinowanego białka jest jego kierowanie do stabilnego przedziału komórkowego lub fuzja z innym białkiem, cechującym się wysoką stabilnością [3]. Rekombinowane białka kodowane przez transgeny integrujące się z genomem jądrowym mogą być kierowane do określonych kompartmentów komórki takich jak chloroplasty, mitochondria, wakuole, oleosomy czy apoplast [35]. Kierowanie białek rekombinowanych na drogę sekrecji skutkuje znacznym zwiększeniem wydajności upraw, niż ma to miejsce w przypadku ich akumulacji w cytozolu [72]. Można to osiągnąć poprzez dołączenie peptydowej sekwencji sygnałowej do N-końca białka kodowanego przez transgen, co sprawia, iż powstające białko jest kotranslacyjnie przenoszone do systemu endomembranowego [8]. Białko skierowane na szlak sekrecyjny migruje przez retikulum endoplazmatyczne oraz aparat

Golgiego, aż do osiągnięcia macierzy zewnątrzkomórkowej lub wakuoli w przypadku obecności wakuolarnej sekwencji sygnałowej w pierwotnej sekwencji białka [3]. Białka rekombinowane trafiające do ER mogą zostać w nim zatrzymane, między innymi poprzez dołączenie do C-końca sekwencji sygnałowej (K/H)DEL, zatrzymującej białka w ER [43]. Taki zabieg wpływa pozytywnie na stabilizację białka, co zaobserwowano w przypadku produkcji w roślinnych systemach ekspresyjnych m.in. antygenowego białka S koronawirusa SARS [58].

Kompartenty komórki roślinnej takie jak jądro komórkowe czy chloroplasty również są wybierane jako lokalizacja akumulacji białek rekombinowanych. Nie trwała termicznie toksyna Lt-B pochodząca z enterotoksygennego szczepu *E. coli* wykazywała większy poziom akumulacji w ziarnach kukurydzy po zmianie jej posttranslacyjnej lokalizacji z cytozolu na jądro komórkowe, poprzez dodanie jądrowego sygnału lokalizowania wirusa SV40 [69]. Ksylanaza pochodząca z grzyba *Trichoderma reesei* wykazywała wysoki poziom akumulacji w liściach *A. thaliana*, gdy kierowano ją do chloroplastów, wykorzystując sekwencję sygnałową aktywazy RuBisCo [28]. W stromie chloroplastów zachodzą pewne modyfikacje posttranslacyjne takie jak multimeryzacja czy formowanie mostków disiarczkowych [9], co sprawia, iż stroma chloroplastów stanowi odpowiednie środowisko dla białek, które nie wymagają dla swojej aktywności skomplikowanych modyfikacji, na przykład glikozylacji, typowej dla ścieżki sekrecyjnej [3].

Fuzja białka rekombinowanego z innym białkiem stabilizującym może również okazać się pomocna we wzmacnianiu stabilności czy poprawnego fałdowania. β -glukuronidaza, lucyferaza czy podjednostka toksyny B cholery osiągnęły wysoki poziom akumulacji w liściach transgenicznego tytoniu czy ziemniaka po fuzji z ubikwityną [45].

PORÓWNANIE SYSTEMÓW EKSPRESYJNYCH STOSOWANYCH W PRODUKCJI BIOFARMACEUTYKÓW

Wśród ogromu możliwości jakie niosło za sobą opracowanie metody klonowania genów jak również transformacji genetycznej, wyłoniła się idea produkcji w bakteriach transgenicznych ludzkich białek o przeznaczeniu terapeutycznym. Pierwszymi ludzkimi białkami, które z powodzeniem produkowano w komórkach bakterii *E. coli* były insulina oraz somatostatyna [29, 20]. W 1982 roku na rynku pojawiła się rekombinowana insulina – pierwszy lek opracowany z wykorzystaniem zmodyfikowanych genetycznie bakterii [18]. Kolejnym osiągnięciem tej dziedziny nauki była pierwsza udana ekspresja ludzkich przeciwciał w transgenicznym tytoniu *Nicotiana tabacum* [26]. Równolegle opracowywano platformy do produkcji biofarmaceutyków, które oparte były na liniach genetycznie modyfikowanych komórek ssaków, grzybów czy innych niż *E. coli* gatunkach bakterii. Systemy te do dziś posiadają ugruntowaną po-

zycję jako szeroko stosowane platformy ekspresji rekombinowanych białek o właściwościach terapeutycznych. Szybko zauważono jednak, że roślinne systemy ekspresji heterologicznych białek posiadają szereg potencjalnych zalet, które sprawiają, iż są one bardziej wydajne w porównaniu z pozostałymi systemami [26]. Porównanie zalet i wad linii genetycznie modyfikowanych komórek ssaków, grzybków, bakterii oraz roślinnych systemów ekspresji białek rekombinowanych przedstawiono w **tabeli 1**.

TABELA 1 Porównanie systemów ekspresyjnych stosowanych w celu produkcji rekombinowanych białek. Na podstawie [67]

TABLE 1 Comparison of expression systems used for recombinant protein production. Table is based on [67]

| System ekspresyjny | Zalety | Wady |
|----------------------------------|--|---|
| Bakterie | <p>Wysoki poziom ekspresji Krótki czas realizacji produkcji Niskie koszty produkcji Łatwość zwiększania skali produkcji Łatwość manipulacji genetycznych Ugruntowane procedury regulacyjne</p> | <p>Brak modyfikacji potranslacyjnych Nieprawidłowe fałdowanie rekombinowanych białek Wysokie ryzyko kontaminacji endotoksynami bakteryjnymi</p> |
| Drożdże | <p>Szybki wzrost oraz możliwość zwiększania skali produkcji Łatwość manipulacji genetycznych Niedrogie podłoża hodowlane Nieskomplikowane warunki hodowli Obecność niezbędnych modyfikacji potranslacyjnych</p> | <p>Nieprawidłowy wzór glikozylacji ekspresjonowanych białek Utrudniona dezintegracja komórek – obecność twardej i grubej ściany komórkowej</p> |
| Kultury ssaczycch komórek | <p>Prawidłowe fałdowanie oraz szlaki modyfikacji potranslacyjnych produkowanych białek Ugruntowane procedury regulacyjne</p> | <p>Wysokie koszty produkcji Ryzyko kontaminacji ssaczycch wirusami, prionami oraz onkogennym DNA</p> |
| Transgeniczne rośliny | <p>Krótki czas produkcji białek rekombinowanych Niskie koszty utrzymania hodowli Zoptymalizowane warunki wzrostu Brak zanieczyszczeń szkodliwymi dla ludźmi patogenami Łatwość zwiększenia skali produkcji Modyfikacje potranslacyjne niemal identyczne jak w systemach ssaczycch</p> | <p>Brak ugruntowanych procedur regulacyjnych Odmienność od ssaczycch szlak glikozylacji białek</p> |

Systemy ekspresyjne oparte o transgeniczne drożdże, bakterie czy też linie ssaczych komórek obarczone są wadami, których nie obserwuje się w przypadku produkcji biofarmaceutyków w roślinach GM. Przykładem może być brak lub znikome ryzyko zanieczyszczenia biofarmaceutyków podczas produkcji w roślinach GM szkodliwymi dla zdrowia ludzi patogenami, takimi jak wirusy czy endotoksyny bakteryjne [1]. Transgeniczne rośliny mogą stanowić platformę do ekspresji białek, które nie mogą być wydajnie produkowane w liniach ssaczych komórek ze względu na swoją cytotoksyczność. Takim przykładem jest wiskumina, która jest lektyną o właściwościach antynowotworowych [81]. Co więcej, roślinne platformy ekspresyjne łączą zalety systemów opartych o eukariotyczne komórki, w których zachodzą odpowiednie modyfikacje potranslacyjne białek, a także zalety systemów bakteryjnych, które cechuje niski stopień komplikacji oraz niskie koszty kapitałowe. Aspekty ekonomiczne stanowią jedną z najważniejszych determinantów wyboru systemu ekspresyjnego białka podczas projektowania procesu produkcji. Rośliny GM jako bioreaktory wymagają najniższego udziału zasobów kapitałowych w porównaniu z pozostałymi systemami [23]. Wiąże się to, po pierwsze, z łatwością przeniesienia upraw roślin GM do wielotonowej skali, z laboratorium na pola czy też do szklarni, gdzie powierzchnia uprawy może zajmować nawet kilka tysięcy hektarów. Drugim aspektem jest niski koszt magazynowania oraz transportu roślin GM, które można przechowywać w temperaturze pokojowej, natomiast warunki dla pozostałych systemów są znacznie bardziej rygorystyczne: dla drożdży i bakterii wymagana jest temperatura -20°C , a kultury ssaczych komórek muszą być przechowywane w ciekłym azocie [14].

Kolejną zaletą roślinnych platform ekspresyjnych jest relatywnie krótki odcinek czasu od rozpoczęcia procesu produkcji do uzyskania kompletnego biofarmaceutyku. Zastosowanie transformacji roślin z wykorzystaniem metody infiltracji z *Agrobacterium* i/lub wprowadzenia wektorów wirusowych umożliwia osiągnięcie przejściowej ekspresji rekombinowanych białek nawet w 8 tygodni po otrzymaniu odpowiadającej białku sekwencji DNA [55, 19]. Możliwość skrócenia czasu potrzebnego do wyprodukowania biofarmaceutyków pozwala na produkcję tak zwanych „szczepionek szybkiej odpowiedzi”. Szczepionki takie wykorzystywane są w obliczu epidemii w związku z koniecznością niezwłocznego opracowania terapii skierowanej przeciw patogenowi, dla którego brak jest skutecznej terapii lub w przypadku, gdy epidemia została wywołana przez nowy, nieznany dotychczas szczep patogenu. W przeszłości, w celu uzyskania szybkiej i skutecznej terapii wykorzystano transgeniczny tytoń (*N. benthamiana*), w którym uzyskano ekspresję grupy przeciwciał skierowanych przeciw wirusowi Ebola, a następnie podawano w formie koktajlu w trakcie epidemii gorączki krwotocznej w 2014 roku w Zachodniej Afryce [38].

PROBLEMY ZWIĄZANE Z N-GLIKOZYLACJĄ SSACZYCH BIAŁEK W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Jedną z najistotniejszych właściwości roślinnych platform ekspresyjnych dla produkcji biofarmaceutyków jest możliwość przeprowadzenia w roślinnych komórkach większości modyfikacji potranslacyjnych. Modyfikacje te są niezbędne dla poprawnego fałdowania białka, a to z kolei jest konieczne dla otrzymania stabilnych oraz aktywnych na wskazanym poziomie ssaczych białek. Dzięki temu w roślinnych platformach ekspresyjnych z powodzeniem dokonuje się ekspresji białek o skomplikowanej strukturze, na przykład przeciwciał monoklonalnych czy też białek błonowych [63, 25]. Z drugiej strony różnice występujące w szlaku N-glikozylacji białek w komórkach roślinnych oraz ssaczych stanowią jedno z największych wyzwań w produkcji biofarmaceutyków z zastosowaniem transgenicznnych roślin. N-glikany, które charakterystyczne są dla komórek roślinnych sprawiają, że ssacze glikoproteiny produkowane w roślinnych systemach ekspresyjnych posiadają właściwości immunogenne, a także mogą nie wykazywać pożądanej bioaktywności. Aplikacja pacjentowi biofarmaceutyku, który posiada inny niż ssaczy wzór N-glikozylacji, skutkować może wystąpieniem reakcji alergicznej, a nawet wstrząsem anafilaktycznym [22].

Proces N-glikozylacji w komórkach eukariotycznych rozpoczyna dołączenie oligosacharydowego prekursora do reszty asparaginy, w obrębie specyficznej sekwencji Asn-X-Ser/Thr (gdzie X oznacza dowolny aminokwas z wyłączeniem proliny). Wraz z transportem powstałej glikoproteiny przez szlak sekrecyjny, N-glikan poddawany jest szeregowi reakcji dojrzewania. Początkowe etapy N-glikozylacji zachodzące w ER są wspólne dla roślin i zwierząt, jednak różnice pojawiają się podczas syntezy białka w aparacie Golgiego (AG), gdzie enzymy zwane glikozylotransferazami przyłączają oligocukrowe reszty do wybranych aminokwasów łańcucha białkowego poprzez utworzenie wiązań glikozydowych [35]. Główne różnice polegają na tym, że w AG komórek ssaków fukoza dołączana jest do cukrowego łańcucha wiązaniem $\alpha(1,6)$ oraz terminalnie dołączany jest kwas sjałowy, natomiast u roślin do rdzenia cukrowego dołączana jest ksyloza wiązaniem $\beta(1,2)$, a fukoza wiązaniem $\alpha(1,3)$ [21]. W celu pokonania przeszkód związanych z brakiem bioaktywności oraz immunogennością produkowanych biofarmaceutyków na skutek nieprawidłowego wzoru glikozylacji, opracowano roślinne systemy ekspresji umożliwiające przeprowadzenie autentycznego szlaku glikozylacji rekombinowanych białek, typowego dla komórek ludzkich [24, 42].

Jedną z metod obejmuje fuzję sekwencji sygnałowej KDEL zatrzymującej białko w świetle ER, wraz z sekwencją kodującą białko heterologiczne, co pozwala na ograniczenie glikozylacji przeciwciał produkowanych w roślinie do wyłącznie przyłączania N-glikanu o wysokiej zawartości mannozy [16]. Kolejną strategią opartą jest na hamowaniu roślinnych glikozylotransferaz, które odpo-

wiedzialne są za dojrzewanie N-glikanu w AG [54]. Usunięcie genów kodujących $\alpha(1,3)$ -fukozylotransferazy oraz $\beta(1,2)$ -ksylozylotransferazy u *Physcomitrella patens* skutecznie zapobiegło produkcji specyficznych dla roślin glikoepitopów bez oddziaływania na proces sekrecji białka heterologicznego przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na wzrost roślin [32]. W celu zahamowania roślinnych glikozylotransferaz wykorzystano z powodzeniem interferujące RNA (RNAi) u gatunków takich jak *Lemna minor*, *Nicotiana benthamiana*, *Medicago sativa*, a także *Oryza sativa*. Badania profilu N-glikozylacji rekombinowanych glikoprotein pochodzących z roślin, u których zahamowano swoiste glikozylotransferazy, wykazały znaczny spadek zawartości $\alpha(1,3)$ -fukozy oraz $\beta(1,2)$ -ksylozy w łańcuchach oligosacharydowych [60]. Wśród najnowszych osiągnięć z zakresu glikoinżynierii należy wymienić usunięcie techniką knock-out'u dwóch genów $\beta(1,2)$ -ksylozylotransferazy oraz 4/5 genów $\alpha(1,3)$ -fukozylotransferazy u *N. benthamiana* poprzez zastosowanie systemu edycji genomu CRISPR/Cas9 przez dwie niezależne grupy badaczy w 2017 roku [24, 42].

Ponadto w celu przeprowadzenia szlaku N-glikozylacji w komórkach roślinnych możliwie jak najbardziej zbliżonego do tego, który ma miejsce w komórkach ludzkich, dokonano transformacji roślin wektorem niosącym geny kodujące ssacze glikozylotransferazy oraz kodujące enzymy odpowiedzialne za sjalicylację produkowanych białek [60]. Z sukcesem dokonano ekspresji ludzkich enzymów $\beta(1,4)$ -galaktozylotransferazy oraz $\alpha(1,6)$ -fukozylotransferazy w *N. benthamiana* z wyciszoną ekspresją genów kodujących roślinne glikozylotransferazy [6, 68]. Brak kwasu sjalowego w N-glikanach ludzkich glikoprotein może powodować ograniczenie ich funkcjonalności [30]. U niektórych gatunków roślin wprawdzie kwas sjalowy występuje w wolnej postaci, jednakże nie jest on dołączany do syntezowanego łańcucha oligocukrowego na szlaku N-glikozylacji. Ponadto w komórkach roślinnych nie występują enzymy szlaku biosyntezy CMP-kwas sjalowy, który stanowi aktywowaną formę kwasu sjalowego, enzymu odpowiedzialnego za transport CMP-kwas sjalowy z cytoplazmy do aparatu Golgiego, a także enzymu $\alpha(2,6)$ -sialylotransferazy, który odpowiada za przyłączenie CMP-kwas sjalowy do N-glikanu w komórkach ludzi [60]. Aby umożliwić produkcję w transgenicznych roślinach ludzkich białek, które wymagają sjalicylacji, dokonano koekspresji trzech ludzkich enzymów niezbędnych do syntezy aktywowanej formy kwasu sjalowego (CMP-kwas sjalowy) u *Arabidopsis thaliana*. W efekcie zaobserwowano w komórkach transformowanych roślin obecność znaczących ilości CMP-kwas sjalowy jak i wolnego kwasu sjalowego [7]. Kolejnym krokiem na drodze do sjalicylacji N-glikanów ludzkich białek produkowanych w roślinach GM była synteza enzymu transportującego do AG, a także przyłączającego CMP-kwas sjalowy do łańcucha oligocukrowego. W tym celu do komórek *N. benthamiana* (Δ X/FT) wprowadzono sześć ludzkich genów, które kodują wszystkie niezbęd-

ne enzymy znajdujące się na szlaku biosyntezy, transportu oraz przyłączenia CM-P-kwas sjałowy do N-glikanu. Przejściowa superekspresja powyższych sześciu genów w tytoniu wraz z równoległą ekspresją przeciwciał monoklonalnych 2G12 stosowanych przeciw wirusowi HIV-1, skutkowała produkcją w pełni funkcjonalnych przeciwciał, których N-glikany pozbawione były roślinnych glikoepitopów, a także zawierały cząsteczki kwasu sjałowego. Udowodniono, że przeciwciała wyprodukowane w ten sposób posiadają taką samą zdolność do neutralizacji wirusa HIV w warunkach *in vitro*, jak przeciwciała C2G12 produkowane z użyciem ssaczych linii komórkowych [41].

PRZEGLĄD REKOMBINOWANYCH BIAŁEK TERAPEUTYCZNYCH PRODUKOWANYCH W ROŚLINACH

Pośród białek o zastosowaniu farmakologicznym, które produkowane są w roślinach transgenicznym należy wymienić przeciwciała oraz ich pochodne, w tym wydzielnicze immunoglobuliny A (sIgA), immunoglobuliny klasy M (IgM) oraz klasy G (IgG), podjednostki szczepionek, jak również cząsteczki wirusopodobne (ang. virus-like particles, VLP), terapeutyczne enzymy czy też toksyny [38]. Obecnie jedynym dostępnym na rynku lekiem wyprodukowanym z wykorzystaniem roślinnego systemu ekspresyjnego jest enzym glukocerebrozydaza, stosowany w przypadku choroby Gaucher'a [65]. Lek został zaakceptowany przez amerykańską Agencję Żywności i Leków w 2012 roku. Zestawienie biofarmaceutyków produkowanych w roślinnych systemach ekspresyjnych, które znajdują się na zaawansowanych etapach badań klinicznych zestawiono w **tabeli 2**.

NAJNOWSZE DANE O SZCZEPIONKACH I PRZECIWCIAŁACH PRODUKOWANYCH W ROŚLINACH

Począwszy od szczepionek przeciw wirusowi HBV (Hepatitis B Virus), wścieklicznie, wirusowi HIV (Human Immunodeficiency Virus), toksynie B przecinkowca cholery, wirusom grypy, wirusowi SARS-CoV-1, aż do szczepionek przeciw nowotworom, na przestrzeni ostatnich 30 lat wyprodukowano za pomocą roślin GM jako platform ekspresyjnych, wiele antygenów stanowiących składniki szczepionek kandydujących do badań klinicznych, a nawet komercyjnego użytku [37]. Szczegółowe informacje dotyczące takich badań zestawiono m.in. w pracy przeglądowej Łucka i in. 2015 [39]. Wśród najnowszych biofarmaceutyków pochodzenia roślinnego, których badania kliniczne przyniosły obiecujące wyniki, znajduje się kwadriwalentna szczepionka zawierająca cząsteczki podobne wirusom grypy (ang. QVLPs) produkowana w *N. benthamiana*. Składniki tej

szczepionki oparte są o podtypy wirusa odpowiadające za sezonowe epidemie grypy (Yamagata i Victoria). W trakcie drugiej fazy badań klinicznych szczepionki QVLP przeciw wirusom grypy przeprowadzono dwa randomizowane badania w grupach osób od 18 do 49 roku życia (identyfikator badania: NCT02233816) oraz od 50 roku życia (identyfikator badania: NCT02236052), których wyniki pozwoliły ustalić dawki szczepionki niezbędne do wytworzenia u badanych odpowiedzi odpornościowej humoralnej i komórkowej. W 2019 roku szczepionka ta została zakwalifikowana do trzeciego etapu badań klinicznych [56, 82, 83].

Podobnie jak w przypadku antygenów, jest wiele przykładów przeciwciał wyprodukowanych w roślinnych systemach ekspresji [67]. Tytoń (*N. tabacum*) był pierwszym organizmem roślinnym wybranym do ekspresji rekombinowanego kompletnego monoklonalnego przeciwciała anty-mysiego IgG₁(6D4) o właściwościach katalitycznych [26]. Od tego czasu, w roślinnych systemach ekspresyjnych wyprodukowano wiele różnych typów przeciwciał i ich fragmentów, między innymi: jednołańcuchowe fragmenty zmienne (scFv), fragmenty Fab, IgG, chimeryczne przeciwciała wydzielnicze typu IgA (sIgA) czy przeciwciała jednodomenowe (sdAb) [50]. Ponadto w ostatnich latach kilka obiecujących biofarmaceutyków opartych o przeciwciała, produkowane w roślinach, wkroczyło w fazę badań klinicznych. Przykładem takich biofarmaceutyków jest chimeryczne przeciwciało sIgA-G o nazwie *CaroRx*TM, skierowane przeciw bakterii *Streptococcus mutans*, powodującej próchnicę zębów czy też *Avicidin*, preparat zawierający przeciwciała klasy IgG skierowane przeciw białku EpCAM zaprojektowany w celu leczenia raka jelita grubego [40]. Badania nad tymi produktami zatrzymały się na etapie II fazy badań klinicznych. *CaroRx*TM po obiecujących wynikach badań został wprowadzony na terenie Unii Europejskiej nie jako lek, lecz jako wyrób medyczny, natomiast *Avicidin* pomimo potwierdzonych efektów antynowotworowych został wycofany z badań ze względu na poważne skutki uboczne (niezwiązane z roślinnym pochodzeniem leku) [40, 37].

Wśród obecnie najlepiej rokujących przeciwciał produkowanych przez roślinne systemy ekspresji należy wymienić przeciwciała monoklonalne P2G12, ekspresjonowane w *N. benthamiana* skierowane przeciw wirusowi HIV-1, które w 2015 roku przeszły pomyślnie pierwszą fazę badań klinicznych [41]. Planowane są również dalsze badania mające na celu ustalenie optymalnego dawkowania przeciwciał P2G12 (identyfikator badania: NCT02923999) [85]. Innym przykładem jest lek ZMapp, czyli koktajl składający się z trzech przeciwciał skierowanych przeciwko powierzchniowej glikoproteinie wirusa Ebola produkowany w *N. benthamiana*, którego 1 i 2 faza badań klinicznych zakończyła się w 2019 roku (identyfikator badania: NCT02363322) wraz z rozpoczęciem fazy 2/3 (identyfikator badania: NCT03719586) [84, 86].

TABELA 2 Przykłady biofarmaceutyków pochodzenia roślinnego znajdujących się na etapie badań klinicznych lub wprowadzonych na rynek. Na podstawie [37] oraz [38]

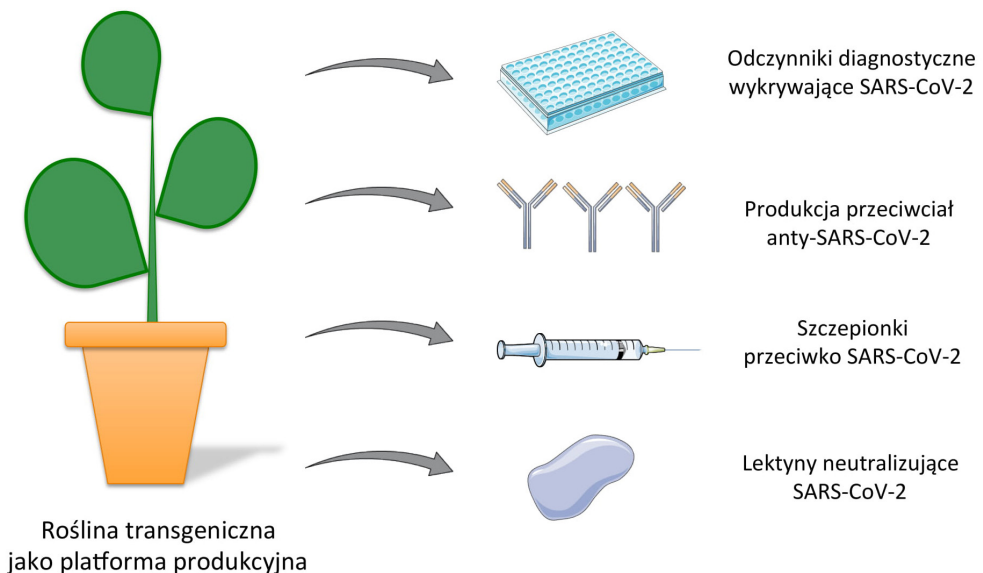
TABLE 2 Examples of plant-derived biopharmaceuticals at various stages of clinical development. Table is based on [37] and [38]

| Produkt białkowy | Zastosowanie | Roślinny system ekspresji | Status badań klinicznych |
|---|--|---|---------------------------------------|
| Szczepionki | | | |
| Podjednostka PA83 toksyny <i>Bacillus anthracis</i> | Szczepionka podjednostkowa przeciw wąglikowi | <i>N. benthamiana</i> | Faza 1 |
| eVLP składające się z czterech antygenów wirusa grypy: H1/Cal, H3/Vic, B/Bris, B/Mass | Kwadriwalentna szczepionka przeciw wirusom grypy: H1N1, H3N2 oraz wirusowi grypy typu B (linie: Yamagata i Victoria) | <i>N. benthamiana</i> | Faza 2,3 |
| Idiotypowe scFv pochodzące z nowotworu pacjenta | Indywidualna szczepionka przeciw chłoniakowi nieziarniczemu | <i>N. benthamiana</i> | Faza 1 |
| Podjednostka B toksyny <i>Vibrio cholerae</i> | Szczepionka podjednostkowa przeciw cholercze | <i>O. sativa</i> | Faza 1 |
| Antygen powierzchniowy HBV (HBsAg) | Szczepionka podjednostkowa przeciw HBV | <i>S. tuberosum</i> | Faza 1 |
| Białko S1 wirusa SARS-CoV-1 | Szczepionka podjednostkowa przeciw SARS-CoV-1 | <i>S. lycopersicum</i> <i>N. tabacum</i> | Przedkliniczne badania na zwierzętach |
| Przeciwciała | | | |
| Koktajl trzech przeciwciał monoklonalnych (13C6, 2G4, 4G7) | Terapia infekcji wywołanej zakażeniem wirusem Ebola | <i>N. benthamiana</i> | Faza 1,2 |
| Przeciwciało monoklonalne P2G12 | Terapia infekcji wywołanej wirusem HIV-1 | <i>N. tabacum</i> | Faza 1 |
| Przeciwciało monoklonalne CO17-1A | Inhibitor wzrostu raka jelita grubego | <i>N. tabacum</i> | Przedkliniczne badania na zwierzętach |
| Inne biofarmaceutyki | | | |
| Glukocerebrozydaza | Enzymatyczna terapia zastępcza dla pacjentów z chorobą Gaucher'a | <i>D. carota</i> | Zaakceptowany do użytku przez FDA |
| Laktoferyna | Lek stosowany w przypadku chronicznych stanów zapalnych | <i>O. sativa</i> | Faza 2 |
| Alfa-galaktozydaza A | Enzymatyczna terapia zastępcza dla pacjentów z chorobą Fabry'ego | <i>P. patens</i> | Faza 1 |

WYKORZYSTANIE ROŚLINNYCH SYSTEMÓW EKSPRESJI W WALCE Z WIRUSEM SARS-CoV-2

Zastosowanie roślin GM stanowi jeden z kluczowych aspektów badań nad lekami przeciwwirusowymi, przeciwciałami oraz szczepionkami, które są obecnie prowadzone w związku z pandemią wirusa SARS-CoV-2 (**Ryc. 1**), który pojawił się w grudniu 2019 roku w mieście Wuhan w Chinach i szybko rozprzestrzenił się na cały świat [5]. W styczniu 2020 sekwencja genomowa SARS-CoV-2 została udostępniona, dostarczając niezbędnych informacji do opracowania strategii walki z tym wirusem [76].

Lomonossoff oraz Peyret wykorzystują roślinny system ekspresji w badaniach nad uniwersalnym odczynnikiem diagnostycznym mającym na celu udoskonalenie testu na obecność SARS-CoV-2 opartego o reakcje Real Time-PCR. Odczynnik ten ma stanowić kontrolę pozytywną w powyższej reakcji i bazuje na cząsteczkach wirusopodobnych (VLPs), uzyskanych z wirusa mozaiki tytoniu, które zawierają regiony sztucznego genomu wirusa SARS-CoV-2 [5]. Włoska firma biotechnologiczna Diamante stosuje tytoń jako źródło antygenów opartych o domenę



RYCINA 1 Potencjalne zastosowanie roślin transgenicznych, otrzymanych metodami stałej jak i przejściowej transformacji, w walce z wirusem SARS-CoV-2. Na podstawie [5]. Rycina zawiera obrazy pochodzące z bazy Servier Medical Art. Database (<https://smart.servier.com>) na warunkach licencji Creative Commons Attribution 3.0

FIGURE 1 Application of transgenic plants obtained by stable as well as transient transformation methods, against SARS-CoV-2 virus. Figure is based on [5] and contains images from Servier Medical Art. Database (<https://smart.servier.com>) and made available under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 license

wiążącą receptor – SARS-CoV-2 (ang. *Receptor Binding Domain*, RBD), używanych w testach ELISA do diagnostyki wykrywania przeciwciał w surowicy krwi. Ponadto rozważa się wykorzystanie roślin do produkcji przeciwciał skierowanych przeciw wirusowi SARS-CoV-2 o wysokiej stabilności i jednocześnie produkcji na szeroką skalę w ciągu zaledwie kilku tygodni. Uzyskanie podobnych efektów w liniach komórek ssaczych zajęłoby najprawdopodobniej miesiące, a poprawa wydajności produkcji nawet lata. Z jednej strony wykorzystanie zrekombinowanych przeciwciał miałyby na celu spowolnienie tempa rozwoju infekcji w organizmie człowieka, co poparte jest niedawnym odkryciem, że surowica pochodząca od ozdrowieńców zmniejsza nasilenie objawów choroby COVID-19 [13]. Z drugiej strony rośliny mogłyby produkować przeciwciała hamujące wysoki poziom cytokin (tzw. burza cytokinowa), który towarzyszy tej infekcji w wielu przypadkach o najcięższym przebiegu. Aktualnie w walce z wirusem SARS-CoV-2 testowane są w badaniach klinicznych dwa przeciwciała skierowane przeciw receptorowi interleukiny 6 (IL-6R), stosowane do tej pory w reumatoidalnym zapaleniu stawów [5].

W walce z wirusem SARS-CoV-2 miałyby być także wykorzystywane lektyny, czyli glikoproteiny występujące u roślin, alg morskich i bakterii. Wiele lektyn hamuje replikację wirusów poprzez interakcję z glikanami w glikoproteinach otoczki wirusowej [5]. Wykazano, że białko GRFT będące lektyną pochodzącą z czerwonych alg rodzaju *Griffithsia*, hamuje namnażanie wirusów, dla których nie ma obecnie skutecznej szczepionki, w tym wirusa HIV [47], Ebola-Zair [2], a także koronawirusa odpowiedzialnego za epidemię SARS-CoV oraz wirusa MERS-CoV [51, 44]. Co istotne, lektyna ta wykazuje niską toksyczność względem komórek ludzkich, a wysoka homologia między białkiem S eksponowanym na powierzchni wirusów SARS-CoV oraz SARS-CoV-2, sugeruje możliwą reakcję krzyżową [5]. Najnowsze doniesienia z października 2020 roku potwierdzają, że GRFT jest w stanie zahamować infekcję SARS-CoV-2 w warunkach *in vitro* [4]. Białko GRFT jak również inne lektyny, były produkowane z wykorzystaniem transgenicznych linii komórek roślin, m.in. *Nicotiana benthamiana* [52]. Taka przejściowa ekspresja w roślinach zapewniłaby szybki dostęp do terapeutyków o działaniu przeciwwirusowym na szeroką skalę [5].

Najwięcej nadziei pokłada się w uzyskaniu skutecznej szczepionki przeciw SARS-CoV-2. Obserwuje się dwa kierunki badań z wykorzystaniem transgenicznych roślin. Pierwszy dotyczy produkcji szczepionki, w której podjednostka białka S1 SARS-CoV-2 ma pełnić rolę antygeny. Firma Kentucky BioProcessing (Owensboro, KT, USA), która jest częścią grupy British American Tobacco, opracowuje tego typu szczepionkę w transgenicznych roślinach tytoniu. Drugi kierunek badań nad szczepionką przeciw SARS-CoV-2 oparty jest o technologię VLP. W przypadku cząsteczek wirusopodobnych nie ma niebezpieczeństwa namnożenia wirusa, gdyż nie zawierają materiału genetycznego, ale jednocześnie indukują

odpowiedź immunologiczną. Gotowa platforma VLP oparta na transgenicznym tytoniu stosowana jest do produkcji szczepionek przeciw grypie H1N1 przez firmę Medicago, która pracuje nad wykorzystaniem tej platformy VLP do produkcji szczepionki na SARS-CoV-2 [5].

PODSUMOWANIE

Badania związane z rozwojem koncepcji roślin transgenicznych używanych jako bioreaktory do produkcji białek heterologicznych trwają od przeszło trzydziestu lat. Początkowo niski uzysk biofarmaceutyków, żmudny proces oczyszczania białek z materiału roślinnego, a także odmienny szlak glikozylacji białek u roślin spowodowały spadek zainteresowania technologią produkcji w roślinach GM na korzyść innych systemów ekspresyjnych. Obecnie, dzięki opracowaniu i wdrożeniu nowych strategii i rozwiązań, duża część z powyższych trudności została pokonana. Wraz z postępem tych badań wciąż będą pojawiały się nowe pytania dotyczące strategii produkcyjnej, bezpieczeństwa, immunogenności, dawkowania oraz sposobów podawania leków produkowanych w roślinach GM, co będzie wymagało zaangażowania naukowców z wielu różnych dziedzin. Roślinne systemy oparte na przejściowej ekspresji zapewniają możliwości szybkiej produkcji z wykorzystaniem niskich nakładów kapitałowych, co przyciąga zainteresowanie koncernów biotechnologicznych. Możliwość przeniesienia produkcji białek *in vitro* z laboratorium do wielotonowej skali oraz wolność biofarmaceutyków pochodzenia roślinnego od groźnych dla ludzi patogenów jest również pożądaną cechą z finansowego punktu widzenia. Analizując dynamikę oraz kierunek badań, a także potrzeby współczesnego społeczeństwa, można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości biofarmaceutyki produkowane w roślinach transgenicznych stanowiąc będą źródło relatywnie tanich leków oraz szczepionek pozwalających na walkę z wieloma chorobami. Rośliny GM umożliwią także szybką produkcję tanich leków stanowiących odpowiedź na nagle pojawiające się ogniska epidemii, wywołane nowymi szczepami wirusów.

LITERATURA

- [1] ABIRI R, VALDIANI A, MAZIAH M, SHAHARUDDIN NA, SAHEBI M, YUSOF ZN, ATABAKI N, TALEI D. A Critical Review of the Concept of Transgenic Plants: Insights into Pharmaceutical Biotechnology and Molecular Farming. *Curr Issues Mol Biol* 2016; **18**: 21-42.
- [2] BARTON C, KOUOKAM JC, LASNIK AB, FOREMAN O, CAMBON A, BROCK G, MONTEFIORI DC, VOJDANI F, MCCORMICK AA, O'KEEFE BR, PALMER KE. Activity of and effect of subcutaneous treatment with the broad-spectrum antiviral lectin griffithsin in two laboratory rodent models. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 120-127.

- [3] BENCHABANE M, GOULET C, RIVARD D, FAYE L, GOMORD V, MICHAUD D. Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol J* 2008; **6**: 633-648.
- [4] CAI Y, XU W, GU C, CAI X, QU D, LU L, XIE Y, JIANG S. Griffithsin with A Broad-Spectrum Antiviral Activity by Binding Glycans in Viral Glycoprotein Exhibits Strong Synergistic Effect in Combination with A Pan-Coronavirus Fusion Inhibitor Targeting SARS-CoV-2 Spike S2 Subunit. *Virol Sin* 2020; **14**: 1-4.
- [5] CAPELL T, TWYMAN RM, ARMARIO-NAJERA V, MA JK, SCHILLBERG S, CHRISTOU P. Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends Plant Sci* 2020; **25**: 635-643.
- [6] CASTILHO A, GATTINGER P, GRASS J, JEZ J, PABST M, ALTMANN F, GORFER M, STRASSER R, STEINKELLNER H. N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans. *Glycobiology* 2011; **21**: 813-823.
- [7] CASTILHO A, PABST M, LEONARD R, VEIT C, ALTMANN F, MACH L, GLÖSSL J, STRASSER R, STEINKELLNER H. Construction of a functional CMP-sialic acid biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; **147**: 331-339.
- [8] CHOI SB, WANG C, MUENCH DG, OZAWA K, FRANCESCHI VR, WU Y, OKITA TW. Messenger RNA targeting of rice seed storage proteins to specific ER subdomains. *Nature* 2000; **407**: 765-767.
- [9] DANIELL H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J* 2006; **1**: 1071-1079.
- [10] DE MUYNCK B, NAVARRE C, BOUTRY M. Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnol J* 2010; **8**: 529-563.
- [11] DECKER EL, RESKI R. The moss bioreactor. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 166-170.
- [12] DOBROWOLSKA A. Wykorzystanie roślin do wytwarzania biofarmaceutyków. *Kosmos* 2004; **53**: 201-206.
- [13] DUAN K, LIU B, LI C, ZHANG H, YU T, QU J, ZHOU M, CHEN L, MENG S, HU Y, PENG C, YUAN M, HUANG J, WANG Z, YU J, GAO X, WANG D, YU X, LI L, ZHANG J, WU X, LI B, XU Y, CHEN W, PENG Y, HU Y, LIN L, LIU X, HUANG S, ZHOU Z, ZHANG L, WANG Y, ZHANG Z, DENG K, XIA Z, GONG Q, ZHANG W, ZHENG X, LIU Y, YANG H, ZHOU D, YU D, HOU J, SHI Z, CHEN S, CHEN Z, ZHANG X, YANG X. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; **117**: 9490-9496.
- [14] FAYE L, BOULAFLOUSA A, BENCHABANE M, GOMORDA V, MICHAUD D. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 2005; **23**: 1770-1778.
- [15] FISCHER R, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P, TWYMAN RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 152-158.
- [16] FLOSS DM, SACK M, ARCALIS E, STADLMANN J, QUENDLER H, RADEMACHER T, STOGER E, SCHELLER J, FISCHER R, CONRAD U. Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnol J* 2009; **7**: 899-913.
- [17] GANAPATHY M. Plants as Bioreactors- A Review. *Adv Tech Biol Med* 2016; **4**: 161.
- [18] GEORGE K, WOOLLETT G. Insulins as Drugs or Biologics in the USA: What Difference Does it Make and Why Does it Matter? *BioDrugs* 2019; **33**: 447-451.
- [19] GLEBA Y, TUSÉ D, GIRITCH A. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; **375**: 155-192.
- [20] GOEDDEL DV, KLEID DG, BOLIVAR F, HEYNEKER HL, YANSURA DG, CREA R, HIROSE T, KRASZEWSKI A, ITAKURA K, RIGGS AD. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 106-110.
- [21] GOMORD V, FAYE L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 171-181.

- [22] GRABOWSKI GA, GOLEMO M, SHAALTIEL Y. Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab* 2014; **112**: 1-8.
- [23] HÄKKINEN ST, RAVEN N, HENQUET M, LAUKKANEN ML, ANDERLEI T, PITKÄNEN JP, TWYMAN RM, BOSCH D, OKSMAN-CALDENTEY KM, SCHILLBERG S, RITALA A. Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnol Bioeng* 2014; **111**: 336-346.
- [24] HANANIA U, ARIEL T, TEKOA H, FUX L, SHEVA M, GUBBAY Y, WEISS M, OZ D, AZULAY Y, TURBOVSKI A, FORSTER Y, SHAALTIEL Y. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant Biotechnol J* 2017; **15**: 1120-1129.
- [25] HE Y, WANG K, YAN N. The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein Cell* 2014; **5**: 658-672.
- [26] HIATT A, CAFFERKEY R, BOWDISH K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 1989; **342**: 76-78.
- [27] HOOD EE, BAILEY MR, BEIFUSS K, MAGALLANES-LUNDBACK M, HORN ME, CALLAWAY E, DREES C, DELANEY DE, CLOUGH R, HOWARD JA. Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnol J* 2003; **1**: 129-140.
- [28] HYUNJONG B, LEE DS, HWANG I. Dual targeting of xylanase to chloroplasts and peroxisomes as a means to increase protein accumulation in plant cells. *J Exp Bot* 2006; **57**: 161-169.
- [29] ITAKURA K, HIROSE T, CREA R, RIGGS AD, HEYNEKER HL, BOLIVAR F, BOYER HW. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 1977; **198**: 1056-1063.
- [30] KALLOLIMATH S, CASTILHO A, STRASSER R, GRÜNWARD-GRUBER C, ALTMANN F, STRUBL S, GALUSKA CE, ZLATINA K, GALUSKA SP, WERNER S, THIESLER H, WERNBURG S, HILDEBRANDT H, GERARDY-SCHAHN R, STEINKELLNER H. Engineering of complex protein sialylation in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: 9498-9503.
- [31] KANG T-J, HAN S-C, YANG M-S. Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in tobacco using a herbicide resistance gene as a selection marker. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 2005; **81**: 165-174.
- [32] KOPRIVOVA A, STEMMER C, ALTMANN F, HOFFMANN A, KOPRIVA S, GORR G, RESKI R, DECKER EL. Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnol J* 2004; **2**: 517-523.
- [33] KUMAR GBS, GANAPATHI TR, REVATHI CJ, SRINIVAS L, BAPAT VA. Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Banana Plants. *Planta* 2005; **222**: 484-493.
- [34] KURUP VM, THOMAS J. Edible Vaccines: Promises and Challenges. *Mol Biotechnol* 2020; **62**: 79-90.
- [35] LAU OS, SUN SSM. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnol Adv* 2009; **27**: 1015-1022.
- [36] LI H-Y, RAMALINGAM S, CHYE M-L. Accumulation of Recombinant SARS-CoV Spike Protein in Plant Cytosol and Chloroplasts Indicate Potential for Development of Plant-Derived Oral Vaccines. *Exp Biol Med* 2006; **231**: 1346-1352.
- [37] LOH H-S, GREEN BJ, YUSIBOV V. Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases. *Curr Opin Virol* 2017; **26**: 81-89.
- [38] LOMONOSSOFF GP, D'AOUST MA. Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. *Science* 2016; **353**: 1237-1240.
- [39] ŁUCKA M, KOWALCZYK T, SZEMRAJ J, SAKOWICZ T. Rośliny jako alternatywne źródło białek terapeutycznych. *Post Hig Med Dośw* 2015; **69**: 362-373.
- [40] MA JK, DRAKE PM, CHRISTOU P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 2003; **4**: 794-805.

- [41] MA JK, DROSSARD J, LEWIS D, ALTMANN F, BOYLE J, CHRISTOU P, COLE T, DALE P, VAN DOLLEWEERD CJ, ISITT V, KATINGER D, LOBEDAN M, MERTENS H, PAUL MJ, RADEMACHER T, SACK M, HUNDLEBY PA, STIEGLER G, STOGER E, TWYMAN RM, VCELAR B, FISCHER R. Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 2015; **13**: 1106-1120.
- [42] MERCX S, SMARGIASSO N, CHAUMONT F, DE PAUW E, BOUTRY M, NAVARRE C. Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans. *Front Plant Sci* 2011; **8**: 403.
- [43] MICHAUD D, VRAIN TC, GOMORD V, FAYE L. Stability of recombinant proteins in plants. *Methods Biotechnol* 1998; **3**: 177-188.
- [44] MILLET JK, SÉRON K, LABITT RN, DANNEELS A, PALMER KE, WHITTAKER GR, DUBUISSON J, BELOUZARD S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection is inhibited by griffithsin. *Antiviral Res* 2016; **133**: 1-8.
- [45] MISHRA S, YADAV DK, TULI R. Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. *J Biotechnol* 2006; **127**: 95-108.
- [46] MORAVEC T, SCHMIDT MA, HERMAN EM, WOODFORD-THOMAS T. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* 2007; **25**: 1647-1657.
- [47] MORI T, O'KEEFE BR, SOWDER RC 2ND, BRINGANS S, GARDELLA R, BERG S, COCHRAN P, TURPIN JA, BUCKHEIT RW JR, MCMAHON JB, BOYD MR. Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. *J Biol Chem*. 2005; **280**: 9345-9353.
- [48] NOCHI T, TAKAGI H, YUKI Y, YANG L, MASUMURA T, MEJIMA M, NAKANISHI U, MATSUMURA A, UOZUMI A, HIROI T, MORITA S, TANAKA K, TAKAIWA F, KIYONO H. 2007. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10986-10991.
- [49] OAKES JL, BOST KL, PILLER KJ. Stability of a soybean seed-derived vaccine antigen following long-term storage, processing and transport in the absence of a cold chain. *J Sci Food Agric* 2009; **89**: 2191-2199.
- [50] OBEMBE OO, POPOOLA JO, LEELAVATHI S, REDDY SV. Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Adv* 2011; **29**: 210-222.
- [51] O'KEEFE BR, GIOMARELLI B, BARNARD DL, SHENOY SR, CHAN PK, MCMAHON JB, PALMER KE, BARNETT BW, MEYERHOLZ DK, WOHLFORD-LENANE CL, MCCRAY PB JR. Broad-spectrum in vitro activity and in vivo efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae. *J Virol* 2010; **84**: 2511-2521.
- [52] O'KEEFE BR, VOJDANI F, BUFFA V, SHATTOCK RJ, MONTEFIORI DC, BAKKE J, MIRSALES J, D'ANDREA A-L, HUME SD, BRATCHER B, SAUCEDO CJ, MCMAHON JB, POGUE GP, PALMER KE. Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proc Nat Acad Sci* 2009; **106**: 6099-6104.
- [53] OZAWA K, TAKAIWA F. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of suspension-cultured cell clusters of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 2010; **179**: 333-337.
- [54] PAGNY S, BOUISSONNIE F, SARKAR M, FOLLET-GUEYE ML, DRIOUICH A, SCHACHTER H, FAYE L, GOMORD V. Structural requirements for Arabidopsis beta1,2-xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *Plant J* 2003; **33**: 189-203.
- [55] PEYRET H, LOMONOSSOFF GP. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Mol Biol* 2013; **83**: 51-58.
- [56] PILLET S, COUILLARD J, TRÉPANIÉ S, POULIN JF, YASSINE-DIAB B, GUY B, WARD BJ, LANDRY N. Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza

- vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and ≥ 50 years old adults. *PLoS One* 2019; **14**: e0216533.
- [57] PLASSON C, MICHEL R, LIENARD D, SAINT-JORE-DUPAS C, SOURROUILLE C, DE MARCH GG, GOMORD V. Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells. *Methods Mol Biol* 2009; **483**: 145-161.
- [58] POGREBNIYAK N, GOLOVKIN M, ANDRIANOV V, SPITSIN S, SMIRNOV Y, EGOLF R, KOPROWSKI H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 9062-9067.
- [59] ROSALES-MENDOZA S, SORIA-GUERRA RE, MORENO-FIERROS L, ALPUCHE-SOLÍS ÁG, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ L, KORBAN SS. Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague. *Planta* 2010; **232**: 409-416.
- [60] ROZOV SM, PERMYAKOVA NV, DEINEKO EV. Main Strategies of Plant Expression System Glycoengineering for Producing Humanized Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Biochemistry (Moscow)* 2018; **83**: 215-232.
- [61] SAALBACH I, GIERSBERG M, CONRAD UDO. High-level expression of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *J Plant Physiol* 2001; **158**: 529-533.
- [62] SCHILLBERG S, RAVEN N, FISCHER R, TWYMAN RM, SCHIERMEYER A. Molecular Farming of Pharmaceutical Proteins Using Plant Suspension Cell and Tissue Cultures. *Curr Pharm Des* 2013; **19**: 5531-5542.
- [63] SCHILLBERG S, TWYMAN RM, FISCHER R. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants—technology assessment. *Vaccine* 2005; **23**: 1764-1769.
- [64] SCHMIDT JA, MCGRATH JM, HANSON MR, LONG SP, AHNER BA. Field-grown tobacco plants maintain robust growth while accumulating large quantities of a bacterial cellulase in chloroplasts. *Nat. Plants* 2019; **5**: 715-721 (2019).
- [65] SHAALTIEL Y, BARTFELD D, HASHMUELI S, BAUM G, BRILL-ALMON E, GALILI G, DYM O, BOLDIN-ADAMSKY SA, SILMAN I, SUSSMAN JL, FUTERMAN AH, AVIEZER D. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J* 2007; **5**: 579-590.
- [66] SHAALTIEL Y, GINGIS-VELITSKI S, TZABAN S, FIKS N, TEKOA H Y, AVIEZER D. Plant-based oral delivery of b-glucocerebrosidase as an enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *Plant Biotechnol J* 2015; **13**: 1033-1040.
- [67] SHANMUGARAJ B, BULAON CJ, PHOOLCHAROEN W. Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production. *Plants* 2020; **9**: 842.
- [68] STELTER S, PAUL MJ, TEH AY, GRANDITS M, ALTMANN F, VANIER J, BARDOR M, CASTILHO A, ALLEN RL, MA JK. Engineering the interactions between a plant-produced HIV antibody and human Fc receptors. *Plant Biotechnol J* 2020; **18**: 402-414.
- [69] STREATFIELD SJ, LANE JR, BROOKS CA, BARKER DK, POAGE ML, MAYOR JM, LAMPHEAR BJ, DREES CF, JILKA JM, HOOD EE, HOWARD JA. Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* 2003; **21**: 812-815.
- [70] STROTBEK C, KRINNINGER S, FRANK W. The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *Int J Dev Biol* 2013; **57**: 553-564.
- [71] TREMBLAY R, WANG D, JEVNIKAR AM, MA S. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnol Adv* 2010; **28**: 214-221.
- [72] VITALE A, PEDRAZZINI E. Recombinant pharmaceuticals from plants: the plant endomembrane system as bioreactor. *Mol Interv* 2005; **5**: 216-225.
- [73] WASĄG P, LENARTOWSKI R. Macierz jądrowa – struktura, funkcja i patogenez. *Postępy Hig Med Dośw* 2016; **70**: 1206-1219.
- [74] WDOVIKOWSKA A. Charakterystyka sekwencji promotorowych w genach roślinnych i rola czynników transkrypcyjnych w odpowiedzi na stres abiotyczny i biotyczny. *Post Biol Kom* 2018; **45**: 247-264.

- [75] WILSON SA, ROBERTS SC. Recent Advances Towards Development and Commercialization of Plant Cell Culture Processes for the Synthesis of Biomolecules. *Plant Biotechnol J* 2012; **10**: 249-268.
- [76] WU F, ZHAO S, YU B, CHEN YM, WANG W, SONG ZG, HU Y, TAO ZW, TIAN JH, PEI YY, YUAN ML, ZHANG YL, DAI FH, LIU Y, WANG QM, ZHENG JJ, XU L, HOLMES EC, ZHANG YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; **579**: 265-269.
- [77] WU J, YU L, LI L, HU J, ZHOU J, ZHOU X. Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnol J* 2007; **5**: 570-578.
- [78] XU J, GE X, DOLAN MC. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension culture. *Biotechnol Adv* 2011; **29**: 278-299.
- [79] XU J, ZHANG N. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect. *Pharm Bioprocess* 2014; **2**: 499-518.
- [80] ZHONG G-Y, PETERSON D, DELANEY DE, BAILEY M, WITCHER DR, REGISTER III JC, BOND D, LI C-P, MARSHALL L, KULISEK E, RITLAND D, MEYER T, HOOD EE, HOWARD JA. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol Breed* 1999; **5**: 345-356.
- [81] ZWIERZINA H, BERGMANN L, FIEBIG H, AAMDAL S, SCHÖFFSKI P, WITTHOHN K, LENTZEN H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: a potential anticancer drug. *Eur J Cancer* 2011; **47**: 1450-1457.
- [82] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02233816> (dane z dnia 15.01.2020)
- [83] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02236052> (dane z dnia 15.01.2020)
- [84] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02363322> (dane z dnia 15.01.2020)
- [85] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02923999> (dane z dnia 15.01.2020)
- [86] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03719586> (dane z dnia 15.01.2020)

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 17.01.2021

Przyjęto: 11.02.2021

Anna Wdowikowska

Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin

Uniwersytet Wrocławski

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

e-mail: anna.wdowikowska@uwr.edu.pl

tel.: 071 3754112

fax: 071 3754118

PŁYNNA BIOPSJA JAKO NIEINWAZYJNA METODA OCENY WYBRANYCH MUTACJI GENOWYCH W NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKU PŁUCA

LIQUID BIOPSY AS AN NON-INVASIVE METHOD OF SELECTED GENE MUTATION ASSESSMENT IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Karolina BUSZKA^{1,2}, Paula KAMIŃSKA¹, Joanna BUDNA-TUKAN¹

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

²Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie: Rak płuca jest wysoce śmiertelnym nowotworem wśród pacjentów obu płci na świecie. Wśród jego licznych typów histologicznych dominuje niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC). Leczeniem, które w porównaniu z chemioterapią opartą na pochodnych platyny zapewnia lepszą jakość życia oraz wydłużenie całkowitego czasu przeżycia jest terapia celowana z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (TKI). Jej stosowanie zasadne jest wyłącznie w przypadku wystąpienia w tkance guza zmian genetycznych w obrębie genów takich jak *EGFR* czy *ALK*. Alternatywą dla klasycznej biopsji tkankowej może być zastosowanie „płynnej biopsji”, obejmującej analizy genetyczne jej elementów tj. krążących komórek nowotworowych (CTC), krążącego wolnego DNA (cfDNA) oraz egzosomów. Precyzyjne metody oceny mutacji aktywujących i opornościowych w genach elementów „płynnej biopsji” przyczynią się do odpowiedniego doboru i monitoringu terapii celowanej u pacjentów z NSCLC bez konieczności wykonywania inwazyjnej biopsji tkankowej.

Słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy rak płuca, mutacje *EGFR*, fuzje *ALK*, inhibitory kinazy tyrozynowej, terapia celowana, płynna biopsja, krążące komórki nowotworowe (CTC), krążące wolne DNA (cfDNA), egzosomy

Summary: Lung cancer is a highly lethal cancer among patients of both sexes worldwide. Among its numerous histological types, non-small cell lung cancer (NSCLC) dominates. Targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKI) is a treatment that, compared to chemotherapy based on platinum derivatives, provides a better quality of life and prolongs overall survival. Its use is justified only in the case of genetic changes in genes such as *EGFR* or *ALK* in the tumor tissue. An alternative to classical tissue biopsy can be the use of a “liquid biopsy” involving genetic analyzes of its elements,

i.e., circulating tumor cells (CTC), circulating free DNA (cfDNA), and exosomes. Accurate methods of assessing activating and resistance mutations in the genes of the “liquid biopsy” components will contribute to the appropriate selection and monitoring of targeted therapy in patients with NSCLC without the need for invasive tissue biopsy.

Keywords: non-small cell lung cancer, *EGFR* mutations, *ALK* fusions, tyrosine kinase inhibitors, targeted treatment, liquid biopsy, circulating tumor cells (CTC), circulating free DNA (cfDNA), exosomes

NIEDROBNOKOMÓRKOWY RAK PŁUCA

CHARAKTERYSTYKA CHOROBY

Rak płuca był w 2020 roku drugim najczęściej wykrywanym (11,4%) oraz najśmiertelniejszym nowotworem wśród pacjentów obu płci na świecie – z jego powodu zmarło prawie 1,8 miliona osób [6]. Rak płuca stanowi bardzo niejednorodną grupę, w której skład wchodzi ponad 50 podtypów histomorfologicznych [1-3]. Wśród nich dominują niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) oraz drobnokomórkowy rak płuca (ang. *small cell lung cancer*, SCLC). Znaczna przewaga, bo aż 85% chorych, jest dotkniętych NSCLC, z których najczęstszymi podtypami histologicznymi są gruczolakoraki (ang. *lung adenocarcinoma*, LUAD) i raki płaskonabłonkowe (ang. *lung squamous cell carcinoma*, LUSC). Podczas gdy gruczolakoraki wywołane są czynnikami środowiskowymi i uwarunkowane genetycznie, raki płaskonabłonkowe są bardzo silnie skorelowane z paleniem tytoniu [10, 18, 33].

Liczne badania przyczyniły się do polepszenia diagnostyki raka płuca, jednakże nadal ponad połowa pacjentów diagnozowana jest w stadium przerzutów. Na wczesnym etapie zaawansowania klinicznego (I lub II stopień), kiedy możliwa jest całkowita resekcja guza, NSCLC jest wykrywany u niewielkiej liczby pacjentów. W znacznie przeważającej części przypadków (ponad 60% chorych) rozpoznanie choroby następuje w momencie, kiedy choroba jest już miejscowo zaawansowana lub przerzutowa (III i IV stopień) [33]. Obecność przerzutów znacznie obniża szansę na skuteczne wyleczenie choroby, z 5-letnim czasem przeżycia wynoszącym mniej niż 6% [24]. Ponadto, 5-letni czas przeżycia wynosi zaledwie 57% nawet u pacjentów zdiagnozowanych przed wystąpieniem przerzutów [43]. Przyczyną późnej diagnozy raka płuca są niespecyficzne objawy na wczesnym etapie choroby oraz brak skutecznych metod diagnostycznych i przesiewowych. Dlatego też, nadrzędnym celem jest poszukiwanie narzędzi wczesnej i precyzyjnej diagnostyki raka płuca w celu poprawy skuteczności leczenia pacjentów.

TERAPIA

Metodą leczenia NSCLC w I i II stopniu zaawansowania choroby jest chirurgiczne usunięcie guza. Taka metoda leczenia nie jest często praktykowana w stopniu III i IV ze względu na obniżoną szansę przeżycia zabiegu u pacjentów z tak

zaawansowaną formą choroby. W ich przypadku przeżywalność kolejnych 5 lat wynosi 25%, z kolei pacjentów z pierwszej grupy – 70%. U pacjentów, u których choroba jest bardziej zaawansowana standardowym postępowaniem jest leczenie ogólnoustrojowe lekami cytotoksycznymi. Niestety obecnie stosowana standardowa chemioterapia oparta na pochodnych platyny przynosi niewielkie korzyści w zakresie przeżycia pacjentów z zaawansowanym NSCLC, wynoszącym mniej niż 2 lata [53].

Leczeniem, które w porównaniu z chemioterapią opartą na pochodnych platyny zapewnia lepszą jakość życia, poprawę przeżycia wolnego od progresji, a nieraz wydłużenie całkowitego czasu przeżycia jest terapia celowana z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (ang. *tyrosine kinase inhibitor*, TKI). Odmienne działanie TKI w porównaniu z chemioterapią powoduje odmienny profil toksyczności. Występowanie skutków ubocznych po terapii TKI obserwuje się 70% chorych. Niemniej jednak, zmiany skórne, biegunka, osłabienie i hepatotoksyczność, będące najczęściej występującymi działaniami niepożądanymi, mają łagodne lub umiarkowane nasilenie i są odwracalne. Efekty uboczne, charakterystyczne dla chemioterapii (wymioty, zahamowanie czynności szpiku kostnego) są tutaj znacznie rzadziej obserwowane. Jedynym, potencjalnie śmiertelnym skutkiem ubocznym terapii TKI jest śródmiąższowa choroba płuc (ang. *interstitial lung disease*, ILD) ale występuje ona bardzo rzadko [38].

Najczęściej stosowanymi lekami z grupy TKI są odwracalne inhibitory (gefitynib i erlotynib), inhibitor drugiej generacji (afatynib), który poprzez kowalencyjne wiązanie nieodwracalnie blokuje przenoszenie sygnałów z receptorów EGFR, HER2 i HER4, a także inhibitor trzeciej generacji (ozymetrynib), który może być z powodzeniem stosowany u pacjentów z mutacją opornościową *EGFR*. Wszystkie powyższe TKI zostały zatwierdzone do użytku przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) [32, 41, 46].

MUTACJE GENÓW *EGFR* ORAZ *ALK*

Wśród zidentyfikowanych zmian genetycznych uznawanych za czynniki indukujące powstawanie guzów w NSCLC, kaskada ERK/MAPK stanowi jedną z najważniejszych. Do złośliwej transformacji i zmian ekspresji genów u pacjentów z rakiem płuca prowadzą m.in. występujące w tej kaskadzie mutacje aktywujące genu *EGFR* [32, 42].

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) jest receptorem transbłonowym, który po dimeryzacji aktywuje kinazy tyrozynowe, odgrywając ważną rolę w procesach biologicznych takich jak proliferacja, migracja komórek czy apoptoza. W wyniku wystąpienia mutacji w *EGFR* następuje utrata kontroli komórki nad tymi procesami, prowadząc do transformacji nowotworowej. Dlatego też u pacjentów chorujących na NSCLC z obecną mutacją *EGFR* chemioterapia zastępowana jest leczeniem celowanym z zastosowaniem TKI [12].

Wśród dotąd opisanych mutacji *EGFR* największe znaczenie mają delecja w egzonie 19 genu, L858R oraz T790M. Delecja w egzonie 19 zachodzi w ramce zawierającej reszty aminokwasowe 746-750 białka, mutacja L858R polega na substytucji jednego nukleotydu, powodując zastąpienie leucyny arginina w kodonie 858 egzonu 21 [26], z kolei mutacja T790M polega na zastąpieniu treoniny metioniną w pozycji 790 egzonu 20 [47]. Obecność ostatniej z nich jest głównym mechanizmem nabytej oporności na leczenie afatynibem. W takim wypadku konieczna staje się zmiana środka leczniczego na ozymertynib, który w przypadku *EGFR* T790M dodatnich potencjalnie umożliwia przedłużenie leczenia bez konieczności włączenia chemoterapii [19,44]. Niemniej jednak, niebezpieczeństwem tego schematu leczenia jest możliwość wystąpienia kolejnej mutacji opornościowej w *EGFR* – L792, polegającej na zastąpieniu leucyny w kodonie 792 egzonu 20 fenyloalaniną, tyrozyną lub histydyną [8].

U około 5% chorych na NSCLC dochodzi również do rearanżacji genu *ALK* (ang. *anaplastic lymphoma kinase*). Polegają one najczęściej na inwersji chromosomu 2, która prowadzi do fuzji z genem *EML4* (ang. *echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) – *EML4-ALK*. Oprócz *EML4* w NSCLC wykryto ponad 19 różnych genów, mogących tworzyć fuzję z *ALK*. Są to m.in. *KIF5B*, *KLC1* i *TPR* [15]. U większości pacjentów z NSCLC, będących nosicielami tych fuzji, zastosowanie znajduje TKI kryzotynib. W przypadku najczęstszej fuzji *EML4-ALK* stosuje się ponadto certynib, brygatynib i alektynib. Leki te charakteryzują się wyższym odsetkiem odpowiedzi na leczenie w stosunku do klasycznej chemioterapii (np. 74% względem 45% w przypadku kryzotynibu) i znacznym złagodzeniem objawów choroby [45].

Materiałem do identyfikacji wszystkich opisanych wyżej mutacji jest tkanka guza. Aby ją pozyskać konieczne są inwazyjne biopsje, które mogą być niekorzystne dla zdrowia pacjenta i trudne do wykonania oraz zabiegi operacyjne [13, 17, 20, 37, 54].

PŁYNNĄ BIOPSJA ORAZ METODY JEJ DETEKCJI I CHARAKTERYSTYKI

Wczesne wykrycie choroby oraz określenie jej stadium zwiększa szanse pacjentów nowotworowych na skuteczne leczenie, a co za tym idzie długie życie. Trafne postawienie diagnozy zależy od zastosowania odpowiednich metod diagnostycznych. Istotne jest, aby cechowały się one jak najwyższą czułością, specyficznością oraz małą inwazyjnością. W raku płuca najczęściej stosuje się biopsje tkankowe. Ich wadą jest jednak inwazyjność, niejednokrotnie niejednoznaczność oraz ryzyko odmy opłucnowej lub krwotoku. Dlatego też poszukiwane są alternatywne metody diagnostyczne. Rozwiązaniem może okazać się zastosowanie tzw.

„płynnej biopsji”, która zamiast we fragmencie tkanki nowotworowej pozwala na wykrycie choroby, dobór terapii oraz monitorowanie jej efektów w próbce krwi obwodowej pacjenta. Metoda ta obejmuje detekcję oraz charakterystykę krążących komórek nowotworowych (ang. *circulating tumor cells*, CTC), wolnych krążących kwasów nukleinowych (ang. *circulating free DNA*, cfDNA), egzosomów oraz płytek krwi edukowanych przez nowotwór (ang. *tumor-educated platelets*, TEP). W aspekcie oceny mutacji najczęściej wykorzystywane są CTC, cfDNA oraz egzosomy [22, 39].

KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Obecność CTC w krwiobieg pacjenta, wynikająca z oderwania ich od guza pierwotnego może być wykorzystana do wczesnej diagnozy choroby, doboru terapii oraz monitorowania jej efektywności [1, 2, 27, 34, 35].

Metody detekcji CTC najczęściej bazują na wykrywaniu obecności charakterystycznych dla nowotworu markerów powierzchniowych. Najczęściej wykorzystywanym antygenem jest EpCAM (ang. *epithelial cell adhesion molecule*), charakterystyczny dla nowotworów pochodzenia nabłonkowego, czyli raków. Do tego rodzaju metod możemy zaliczyć CellSearch[®], AdnaTest, czy metody oparte na analizie PCR. Z kolei metody niezależne od markerów powierzchniowych opierają się na właściwościach fizycznych CTC, takich jak rozmiar i odkształcalność (technologia ISET, Cluster-Chip), właściwościach dielektrycznych (DEP Array[™], Apo-Stream[®]), gęstości (OncoQuick[®], Ficoll-Paque[®]) oraz na jednoczesnym połączeniu kilku cech (GEDI chip, RosetteSep system, EPIDROP) [2, 5, 14, 22, 28].

Powyższe techniki są metodami oceny *in vitro* i bazują na analizie krwi obwodowej pobranej od pacjenta. Większość technik opiera się na analizie niewielkich (zazwyczaj 10 ml) próbek krwi. Istnieją jednak metody umożliwiające analizę CTC w warunkach *in vivo*. Pierwszą na świecie komercyjną metodą przeznaczoną do tego typu analizy jest detektor – CellCollector[®] (Gilupi GmbH). Polega ona na wychwytywaniu CTC bezpośrednio z krwiobieg pacjenta, poprzez umieszczenie w żyłę przedramienia drutu medycznego ze stali nierdzewnej pokrytego złotem oraz hydrożelową warstwą kowalencyjnie wiążącą przeciwciała anti-EpCAM. Podczas 30-minutowej analizy detektor ma kontakt z ok. 1 litrem krwi, co znacznie zwiększa szanse na izolację rzadkich komórek jakimi są CTC [48].

KRAŻĄCE WOLNE DNA

Kolejnym źródłem informacji o mutacjach i zmianach genetycznych w obrębie guza jest cfDNA. Głównym jego źródłem jest krwiobieg, jednakże jest on również obecny w innych płynach ustrojowych, tj. płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu czy płynie wysiękowym jamy opłucnej. Analizę cfDNA pochodzącego z krwi obwodowej można przeprowadzać zarówno na osoczu, jak i surowicy. Badania wykazały, że surowica charakteryzuje się wyższymi stężeniami cfDNA,

niemniej jednak nie jest ona jego preferowanym źródłem ze względu na potencjalne zanieczyszczenie genomowym DNA [29]. Pomimo, że cfDNA jest szybko degradowane przez nukleazy [52], może odzwierciedlać bieżące, genetyczne zmiany w guzie. Wykazano, że ilość cfDNA korelowała ze stadiem nowotworu [3], rozmiarem guza [21] oraz obecnością przerzutów [36]. Sugeruje to, że zarówno pierwotne, jak i wtórne zmiany genetyczne w guzie znajdują swoje odzwierciedlenie w cfDNA. Informacja ta jest szczególnie cenna w aspekcie monitorowania przebiegu i efektywności zastosowanej terapii. Technikami stosowanymi do izolacji i analiz cfDNA są metody tj. FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*), ddPCR (ang. *droplet digital PCR*) oraz NGS (ang. *next generation sequencing*).

EGZOSOMY

Egzosomy to zewnątrzkomórkowe pęcherzyki o wielkości od 30 do 100 nm. Wykrywane są we krwi pacjentów z różnymi typami nowotworów i składają się m.in. z białek i kwasów nukleinowych. Poprzez analizę zmian molekularnych w ich elementach (mutacje, fuzje genów lub warianty splicingu) można określić m.in. progresję guza. Podwójna warstwa lipidowa egzosomów utrudnia ich oczyszczenie w porównaniu z CTC i cfDNA, jednakże wpływa ona na stabilność ich zawartości, co teoretycznie pozwala na lepszą identyfikację pochodzenia guza, zmian genetycznych w jego obrębie oraz potencjalnej oporności na leczenie. Inną zaletą egzosomów jest ich znacznie wyższe stężenie w płynach biologicznych, w tym we krwi, w porównaniu z CTC czy cfDNA [4]. Egzosomy mogą być izolowane poprzez ultrawirowanie, wirowanie na gradiencie gęstości lub na podstawie obecności specyficznych markerów błony egzosomalnej (białka tetraspaniny – CD63, CD9 oraz CD81) [39]. Analizę wyizolowanych egzosomów można przeprowadzić w sposób szybki i dokładny przy użyciu elektrochemicznych i fluorescencyjnych technologii, wykorzystujących wiązanie z użyciem przeciwciał, aptamerów czy nanomateriałów, z różnymi platformami testowymi [4].

UŻYTECZNOŚĆ WYBRANYCH ELEMENTÓW PŁYNNEJ BIOPSJI W ANALIZIE MUTACJI GENÓW *EGFR* I *ALK*

KRAŻĄCE KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Analizę mutacji w genie *EGFR* przeprowadzono zarówno w pojedynczych CTC jak i większej ich liczbie. DNA wyizolowany z CTC został namnożony przy użyciu WGA (ang. *whole genome amplification*), a następnie przeanalizowany pod względem występowania mutacji w obrębie *EGFR* przy użyciu dPCR (ang. *digital polymerase chain reaction*) oraz ARMS (ang. *amplification refractory mutation system*). Sama obecność CTC okazała się być skorelowana z wystąpieniem raka płuc. W badaniu wykryto je u 61,5% chorych w wysokim stopniu zaawan-

sowania choroby, podczas gdy wśród pacjentów z jej łagodnym przebiegiem lub zdrowych ochotników nie wykryto ich wcale. Na poziomie pojedynczych CTC wskaźnik wykrywalności mutacji *EGFR* był niski (16,67%). Niemniej jednak, czułość wykrycia tej mutacji wzrastała proporcjonalnie do liczby CTC w analizowanej próbce. Na poziomie 10 CTC u 4 badanych pacjentów wykryto mutacje *EGFR*, które były spójne z mutacjami wykrytymi w pobranych tradycyjnymi metodami tkankach (**Tab. 1**) [54].

Identyfikacja mutacji *EGFR* szczególnie przydatna jest podczas terapii NSCLC z zastosowaniem TKI w celu stwierdzenia potencjalnej oporności na dany lek i zastąpienia go innym, skuteczniejszym [19]. Mutację opornościową T790M w NSCLC można w sposób nieinwazyjny wykryć poprzez analizę RNA zawartego w CTC. Do ilościowego określenia transkryptów we wzbogaconych CTC stosuje się metodę ddPCR z odwrotną transkryptazą (ang. *reverse transcription ddPCR*, RT-ddPCR). Wykonane analizy potwierdziły status mutacji stwierdzony za pomocą metod diagnostycznych opartych na klasycznych biopsjach tkankowych [49].

TABELA 1. Analiza spójności mutacji *EGFR* w CTC i tkance guza [54]

TABLE 1. Analysis of the consistency of *EGFR* mutations between CTCs and tumor tissue [54]

| Pacjent | Ilość CTC | Rodzaj mutacji <i>EGFR</i> | | Dopasowanie |
|---------|-----------|----------------------------|-------|-------------|
| | | tkanka | CTC | |
| 1 | 10 | L858R | L858R | Tak |
| | 9 | L858R | L858R | Tak |
| 2 | 10 | 19del | 19del | Tak |
| | 4 | 19del | N | Nie |
| 3 | 10 | N | N | Tak |
| | 3 | N | N | Tak |
| 4 | 10 | L858R | L858R | Tak |
| | 3 | L858R | G719X | Nie |

Konkretne mutacje można też wykrywać w pojedynczych CTC pozyskanych z krwi pacjentów, poprzez zastosowanie laserowej mikrodysekcji komórek (ang. *laser cell microdissection*, LCM). Wykrycie delecji w egzonie 19 umożliwia technika WGS (ang. *whole genome sequencing*), zaś detekcji mutacji L858R i T790M dokonuje się poprzez PCR sekwencyjny. W 95% pojedynczych CTC otrzymanych przy użyciu LCM udało się zidentyfikować jedną z powyższych, trzech mutacji. Delecję egzonu 19 stwierdzono w 55% przypadków, mutację L858R w 85%, zaś T790M – 45%. Niemniej jednak, sekwencjonowanie wykazało, że w przebiegu reakcji dochodzi do wypadania alleli (ang. *allelic drop-out*), co uniemożliwia wy-

krycie mutacji w 80% amplifikonów. Wskazuje to na przewagę analiz pojedynczych CTC względem ich grup [40].

Dokładnej detekcji mutacji w egzonie 19 i 21 *EGFR* w CTC dokonać można również przy użyciu sekwencjonowania metodą Sangera. Proces ten jest poprzedzony potwierdzeniem obecności mutacji w *EGFR* poprzez PCR z odpowiednio zaprojektowanymi starterami oraz elektroforezą [50].

KRAŻĄCE WOLNE DNA

Analiza mutacji *EGFR* w cfDNA może charakteryzować się nawet większą użytecznością kliniczną niż w CTC [51]. W badaniach przeprowadzonych przez Li i wsp. mutację *EGFR* wykrywano w cfDNA pacjentów z zaawansowanym rakiem płuca. Zastosowanie ddPCR oraz ARMS-PCR (ang. *amplification refractory mutation system PCR*), charakteryzujących się wysoką specyficznością, okazało się być dobrą metodą genotypowania, uzupełniającą lub nawet alternatywną dla biopsji tkankowej. Ponadto, genotypowanie osocza z użyciem ddPCR, charakteryzujące się minimalną liczbą wyników fałszywie dodatnich, może okazać się łatwym rozwiązaniem w praktyce klinicznej [25].

Wykazano również, że cfDNA może służyć do wykrycia mutacji opornościowej L792 w *EGFR*, za pomocą NGS. Detekcja tej mutacji jest istotna w przypadku pacjentów z NSCLC leczonych TKI ozymetrynibem, gdyż jej obecność może skutkować opornością na ten preparat [16].

Kolejną zaletą analizy cfDNA jest możliwość wykrycia fuzji genu *ALK*. Za pomocą NGS, w badaniu przeprowadzonym przez Cui i wsp., fuzję *EML4-ALK* wykrywano z czułością na poziomie 54,2%, swoistością 100% i dokładnością 71,8%. Czuość w przypadku pacjentów bez odległych przerzutów wynosiła 28,6%, natomiast w przypadku pacjentów z odległymi przerzutami – 64,7%. Dowodzi to, że ta nieinwazyjna metoda stanowi dobrą alternatywę dla trudnych do wykonania biopsji tkankowych, w zakresie wykrywania fuzji genu *ALK* u pacjentów w zaawansowanym stadium NSCLC [11].

Wykazano, że NGS jest trafionym narzędziem do detekcji fuzji *ALK* nie tylko z genem *EML4*. U pacjentów z zaawansowanym NSCLC dokonano detekcji fuzji *ALK* z zastosowaniem klinicznego testu Guardant360® (Guardant Health, Inc.), opartego na sekwencjonowaniu cfDNA nowej generacji. Najczęściej identyfikowanym genem, który ulegał fuzji z *ALK* był *EML4* (85,4%), jednakże badanie umożliwiło także identyfikację innych genów, łączących się z *ALK*, tj. *STRN* (6%) oraz *KCNQ*, *KLC1*, *KIF5B*, *PPM1B* i *TGF* (łącznie 8,3%). Badanie to potwierdziło, że kompleksowe sekwencjonowanie cfDNA pozwala na szeroką identyfikację fuzji *ALK* [30].

EGZOSOMY

Ze względu na ich wysokie stężenie we krwi, do detekcji mutacji *EGFR* charakterystycznych dla NSCLC mogą posłużyć także egzosomy [4]. Istnieje możliwość połączenia w trakcie analizy egzosomalnego RNA/DNA z cfDNA,

w celu otrzymania tzw. exoNA. Takie połączenie może mieć szczególne znaczenie w momencie, gdy ilość kopii cfDNA w krwiobiegu pacjentów jest zbyt niska, aby zidentyfikować mutację. Do analizy exoNA może być wykorzystana technika NGS lub qPCR. W przypadku NGS (EXO1000) czułość przy detekcji mutacji aktywujących *EGFR* wyniosła 98%, zaś w przypadku mutacji opornościowej *EGFR* T790M – 90%. Przy zastosowaniu qPCR do wykrycia mutacji T790M *EGFR* czułość wynosiła aż 92% [7, 23].

Egzosomalne RNA pochodzące od pacjentów z NSCLC posłużyło również do identyfikacji transkryptów fuzyjnych *EML4-ALK*. Poza zastosowaniem exoRNA badania sugerują, że analiza konkretnych mikro RNA (miRNA), pochodzących z egzosomów może dostarczać informacji prognostycznych w zaawansowanym stadium NSCLC [31]. Wykazano, że profil ekspresji miRNA jest powiązany z postępem choroby i rokowaniem [9]. Obecność miRNA-208a oraz miRNA-1246 powiązано z opornością na radioterapię, obecność miRNA-221-3p i 222-3p – z dobrą odpowiedzią na ozymetrynib u pacjentów z mutacją *EGFR*, natomiast zmniejszoną ilość (ang. *downregulation*) miRNA-373 i miRNA-512 ze złym rokowaniem w chorobie [31]. Ponadto, podwyższony poziom miRNA-181a powiązано z wrażliwością NSCLC na cisplatynę, podczas gdy podwyższony poziom miRNA-630 z opornością na ten typ leczenia. Obecnie brak jest jednak danych wiążących ekspresję poszczególnych miRNA z opornością na leczenie inhibitorami ALK (ang. *anaplastic lymphoma kinase inhibitors*, ALKi) [9].

PODSUMOWANIE

„Płynna biopsja” jest coraz powszechniej stosowanym narzędziem diagnostycznym, które umożliwia wczesne rozpoznanie NSCLC, trafny dobór terapii celowanej oraz ocenę jej skuteczności. Starania badaczy koncentrują się obecnie na rozwoju technik izolacji i charakterystyki elementów płynnej biopsji, ze szczególnym uwzględnieniem CTC, cfDNA oraz egzosomów. Precyzyjne metody oceny mutacji aktywujących i opornościowych w genie *EGFR* elementów „płynnej biopsji” przyczynią się do odpowiedniego doboru i monitoringu terapii celowanej pacjentów z NSCLC bez konieczności wykonywania inwazyjnej biopsji tkankowej.

LITERATURA

- [1] ALIX-PANABIÈRES C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* 2012; **195**: 69-76.
- [2] ALIX-PANABIÈRES C, SCHWARZENBACH H, PANTEL K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu. Rev. Med.* 2012; **63**: 199-215.
- [3] BETTEGOWDA C, SAUSEN M, LEARY RJ, KINDE I, WANG Y, AGRAWAL N, BARTLETT BR, WANG H, LUBER B, ALANI RM, ANTONARAKIS ES, AZAD NS, BARDELLI A, BREM H,

- CAMERON JL, I WSP. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 2014; **6**: 224ra24.
- [4] BU H, HE D, HE X, WANG K. Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 2019; **20**: 451-461.
- [5] BUDNA J, ŚWIERCZEWSKA M, JANKOWIAK A, ZABEL M. Detekcja krążących komórek nowotworowych przy zastosowaniu techniki EpiSPOT. *Post Biol Komórki* 2015; **42(3)**: 401-416.
- [6] CANCER TODAY – IACR. <https://gco.iarc.fr/today>.
- [7] CASTELLANOS-RIZALDOS E, GRIMM DG, TADIGOTLA V, HURLEY J, HEALY J, NEAL PL, SHER M, VENKATESAN R, KARLOVICH C, RAPONI M, KRUG A, NOERHOLM M, TANNOUS J, TANNOUS BA, RAEZ LE, I WSP. Exosome-Based Detection of EGFR T790M in Plasma from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2018; **24**: 2944-2950.
- [8] CHEN K, ZHOU F, SHEN W, JIANG T, WU X, TONG X, SHAO YW, QIN S, ZHOU C. Novel Mutations on EGFR Leu792 Potentially Correlate to Acquired Resistance to Osimertinib in Advanced NSCLC. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 2017; **12**: 65-68.
- [9] CHEN Y, GUO W, FAN J, CHEN Y, ZHANG X, CHEN X, LUO P. The applications of liquid biopsy in resistance surveillance of anaplastic lymphoma kinase inhibitor. *Cancer Manag. Res.* 2017; **9**: 801-811.
- [10] COUDRAY N, OCAMPO PS, SAKELLAROPOULOS T, NARULA N, SNUDERL M, FENYÖ D, MOREIRA AL, RAZAVIAN N, TSIRIGOS A. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using deep learning. *Nat. Med.* 2018; **24**: 1559-1567.
- [11] CUI S, ZHANG W, XIONG L, PAN F, NIU Y, CHU T, WANG H, ZHAO Y, JIANG L. Use of capture-based next-generation sequencing to detect ALK fusion in plasma cell-free DNA of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 2771-2780.
- [12] DA CUNHA SANTOS G, SHEPHERD FA, TSAO MS. EGFR mutations and lung cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 2011; **6**: 49-69.
- [13] DEL RE M, CRUCITTA S, GIANFILIPPO G, PASSARO A, PETRINI I, RESTANTE G, MICHELUCCI A, FOGLI S, DE MARINIS F, PORTA C, CHELLA A, DANESI R. Understanding the Mechanisms of Resistance in EGFR-Positive NSCLC: From Tissue to Liquid Biopsy to Guide Treatment Strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**.
- [14] DIANAT-MOGHADAM H, AZIZI M, ESLAMI-S Z, CORTÉS-HERNÁNDEZ LE, HEIDARIFARD M, NOURI M, ALIX-PANABIÈRES C. The Role of Circulating Tumor Cells in the Metastatic Cascade: Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. *Cancers* 2020; **12**.
- [15] DU X, SHAO Y, QIN HF, TAI YH, GAO HJ. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac. Cancer* 2018; **9**: 423-430.
- [16] FAIRCLOUGH SR, KIEDROWSKI LA, LIN JJ, ZELICHOV O, TARCIC G, STINCHCOMBE TE, ODEGAARD JI, LANMAN RB, SHAW AT, NAGY RJ. Identification of osimertinib-resistant EGFR L792 mutations by cfDNA sequencing: oncogenic activity assessment and prevalence in large cfDNA cohort. *Exp. Hematol. Oncol.* 2019; **8**: 24.
- [17] HEITZER E, ULZ P, GEIGL JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin. Chem.* 2015; **61**: 112-123.
- [18] HERBST RS, HEYMACH JV, LIPPMAN SM. Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008; **359**: 1367-1380.
- [19] HOCHMAIR MJ, BUDER A, SCHWAB S, BURGHUBER OC, PROSCH H, HILBE W, CSEH A, FRITZ R, FILIPITS M. Liquid-Biopsy-Based Identification of EGFR T790M Mutation-Mediated Resistance to Afatinib Treatment in Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive NSCLC, and Subsequent Response to Osimertinib. *Target. Oncol.* 2019; **14**: 75-83.
- [20] HOFMAN P. ALK in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathobiology, Epidemiology, Detection from Tumor Tissue and Algorithm Diagnosis in a Daily Practice. *Cancers* 2017; **9**.
- [21] KAMAT AA, BISCHOFF FZ, DANG D, BALDWIN MF, HAN LY, LIN YG, MERRITT WM, LANDEN CN, LU C, GERSHENSON DM, SIMPSON JL, SOOD AK. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 2006; **5**: 1369-1374.

- [22] KAMIŃSKA P, BUSZKA K, BUDNA J. Wybrane metody izolacji i detekcji krążących komórek nowotworowych w różnych typach nowotworów. *Post Biol Komórki* 2020; **47**: 141-160.
- [23] KRUGAK, ENDERLE D, KARLOVICH C, PRIEWASSER T, BENTINK S, SPIELA, BRINKMANN K, EMENEGGER J, GRIMM DG, CASTELLANOS-RIZALDOS E, GOLDMAN JW, SEQUIST LV, SORIA JC, CAMIDGE DR, GADGEEL SM, I WSP. Improved EGFR mutation detection using combined exosomal RNA and circulating tumor DNA in NSCLC patient plasma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2018; **29**: 700-706.
- [24] LAI YH, CHEN WN, HSU TC, LIN C, TSAO Y, WU S. Overall survival prediction of non-small cell lung cancer by integrating microarray and clinical data with deep learning. *Sci. Rep.* 2020; **10**: 4679.
- [25] LI C, HE Q, LIANG H, CHENG B, LI J, XIONG S, ZHAO Y, GUO M, LIU Z, HE J, LIANG W. Diagnostic Accuracy of Droplet Digital PCR and Amplification Refractory Mutation System PCR for Detecting EGFR Mutation in Cell-Free DNA of Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* 2020; **10**: 290.
- [26] LI WQ, CUI JW. Non-small cell lung cancer patients with ex19del or exon 21 L858R mutation: distinct mechanisms, different efficacies to treatments. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2020; **146**: 2329-2338.
- [27] LIANIDOU ES, MARKOU A, STRATI A. The Role of CTCs as Tumor Biomarkers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; **867**: 341-367.
- [28] MALY V, MALY O, KOLOSTOVA K, BOBEK V: Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *In Vivo* 2019; **33**: 1027-1037.
- [29] MARTIGNANO F. Cell-Free DNA: An Overview of Sample Types and Isolation Procedures. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2019; **1909**: 13-27.
- [30] MCCOACH CE, BLAKELY CM, BANKS KC, LEVY B, CHUE BM, RAYMOND VM, LE AT, LEE CE, DIAZ J, WAQAR SN, PURCELL WT, AISNER DL, DAVIES KD, LANMAN RB, SHAW AT, I WSP. Clinical Utility of Cell-Free DNA for the Detection of ALK Fusions and Genomic Mechanisms of ALK Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2018; **24**: 2758-2770.
- [31] MOLINA-VILA MA, MAYO-DE-LAS-CASAS C, GIMÉNEZ-CAPITÁN A, JORDANA-ARIZANA N, GARZÓN M, BALADA A, VILLATORO S, TEIXIDÓ C, GARCÍA-PELÁEZ B, AGUADO C, CATALÁN MJ, CAMPOS R, PÉREZ-ROSADO A, BERTRAN-ALAMILLO J, MARTÍNEZ-BUENO A, I WSP. Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front. Med.* 2016; **3**: 69.
- [32] NAYLOR CE, DESANI JK, CHUNG PK. Targeted Therapy and Immunotherapy for Lung Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2016; **25**: 601-609.
- [33] 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; **52**: 103-109.
- [34] PANTEL K, HILLE C, SCHER HI. Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: From Discovery to Clinical Utility. *Clin. Chem.* 2019; **65**: 87-99.
- [35] PAOLETTI C, HAYES DF. Circulating Tumor Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; **882**: 235-258.
- [36] PARKINSON CA, GALE D, PISKORZ AM, BIGGS H, HODGKIN C, ADDLEY H, FREEMAN S, MOYLE P, SALA E, SAYAL K, HOSKING K, GOUNARIS I, JIMENEZ-LINAN M, EARL HM, QIAN W, I WSP. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLoS Med.* 2016; **13**: 1002198.
- [37] PASIC MD, SAMAAN S, YOUSEF GM. Genomic Medicine: New Frontiers and New Challenges. *Clin. Chem.* 2013; **59**: 158-167.
- [38] PŁUŻAŃSKI A, PIÓREK A. Side effects of tyrosine kinase inhibitors — management guidelines. *Oncol. Clin. Pract.* 2016; **12**: 113-118.
- [39] POULET G, MASSIAS J, TALY V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol.* 2019; **63**: 449-455.
- [40] RAN R, LI L, WANG M, WANG S, ZHENG Z, LIN PP. Determination of EGFR mutations in single cells microdissected from enriched lung tumor cells in peripheral blood. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; **405**: 7377-7382.
- [41] REMON J, STEUER CE, RAMALINGAM SS, FELIPE E. Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2018; **29**: 20-27.

- [42] ROBERTS PJ, DER CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; **26**: 3291-3310.
- [43] SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016: Table 15.14 Non-small cell cancer of the lung and, bronchus (Invasive). *National Cancer Institute. Bethesda, MD*. 2018.
- [44] SEQUIST L, WU YL, SCHULER M, KATO T, YANG JCH, TANAKA H, HIDA T, LU S, PARK K, LAURIE S, BENNOUNA J, SIBILOT DM, MÄRTEN A, PEIL B, EHRNROOTH E, I WSP. Subsequent therapies post-afatinib among patients (pts) with EGFR mutation-positive (EGFRm+) NSCLC in LUX-Lung (LL) 3, 6 and 7. *Ann. Oncol.* 2017; **28**: 482-483.
- [45] SHROFF GS, DE GROOT PM, PAPANIMITRAKOPOULOU VA, TRUONG MT, CARTER BW. Targeted Therapy and Immunotherapy in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Radiol. Clin. North Am.* 2018; **56**: 485-495.
- [46] ŚWINIUCH D, RAMLAU R. Afatynib w leczeniu zaawansowanego raka gruczołowego płuca. *Onkol. W Prakt. Klin. – Eduk.* 2018; **4**: 16-19.
- [47] TAN CS, GILLIGAN D, PACEY S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2015; **16**: 447-459.
- [48] GORGES TM, PENKALLA N, SCHALK T, JOOSSE SA, RIETHDORF S, TUCHOLSKI J, LÜCKE K, WIKMAN H, JACKSON S, BRYCHTA N, VON AHSEN O, SCHUMANN C, KRAHN T, PANTEL K. Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2015; **22**: 2197-2206.
- [49] WANG J, SUN N, LEE YT, NI Y, KOOCHEKPOUR R, ZHU Y, TSENG HR, WANG S, JIANG L, ZHU H. A circulating tumor cell-based digital assay for the detection of EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J. Mater. Chem. B* 2020; **8**: 5636-5644.
- [50] WANG SG, ZHANG B, LI CG, ZHU JQ, SUN BS, WANG CL. Sorting and gene mutation verification of circulating tumor cells of lung cancer with epidermal growth factor receptor peptide lipid magnetic spheres. *Thorac. Cancer* 2020; **11**: 2887-2895.
- [51] YANAGITA M, REDIG AJ, PAWELETZ CP, DAHLBERG SE, O'CONNELL A, FEENEY N, TAIBI M, BOUCHER D, OXNARD GR, JOHNSON BE, COSTA DB, JACKMAN DM, JÄNNE PA. A Prospective Evaluation of Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Erlotinib on a Phase II Trial. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2016; **22**: 6010-6020.
- [52] YAO W, MEI C, NAN X, HUI L. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene* 2016; **590**: 142-148.
- [53] YONEDA K, IMANISHI N, ICHIKI Y, TANAKA F. Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with EGFR-mutations. *J. UOEH* 2019; **41**: 153-163.
- [54] ZHANG Q, NONG J, WANG J, YAN Z, YI L, GAO X, LIU Z, ZHANG H, ZHANG S. Isolation of circulating tumor cells and detection of EGFR mutations in patients with non-small-cell lung cancer. *Oncol. Lett.* 2019; **17**: 3799-3807.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 25.01.2021

Przyjęto: 11.02.2021

Joanna Budna-Tukan

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

e-mail: jbudna@ump.edu.pl

tel.: 61 854 64 28

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

Pełne wersje artykułów opublikowanych w „Postęпах Biologii Komórki” do 2017 roku są dostępne *on line* pod: <http://www.pbkom.eu/pl/pbk-publicacje>. Artykuły opublikowane w roku 2018, 2019 oraz 2020 są podane w wersji skróconej, a zainteresowana osoba może uzyskać darmowy dostęp wyłącznie do streszczenia. Aby uzyskać pełen dostęp do prac z ostatnich dwóch lat należy dokonać opłaty w internetowym sklepie dostępnym pod ww. adresem.

Artykuły **przyjęte do druku** w „Postęпах Biologii Komórki” w języku polskim mogą być umieszczone dodatkowo w języku angielskim w wersji elektronicznej „Postępów” (*Advances in Cell Biology*) po przysłaniu w ciągu miesiąca do Redakcji angielskiego tłumaczenia tekstu. Ta wersja „Postępów” jest indeksowana w AGROS.

Przygotowanie publikacji do umieszczenia jej w *Advances in Cell Biology* (ACB):

1. Pracę przyjętą do „Postępów Biologii Komórki” Autor może umieścić na półce MetaPress w j. angielskim. Dostęp do tej wersji pracy jest bezpłatny i wiele osób korzysta z tej wersji. Szczególnie artykuły przeglądowe, a takie publikują „Postępy”, są bardzo cenione, gdy są dostępne bez dodatkowych opłat

2. Tytuł pracy, streszczenie oraz bibliografia pozostają takie same jak w wersji polskiej. Treść pracy w j. angielskim Autor przygotowuje tak, aby odpowiadało to wersji w j. polskim. Ilustracje kolorowe są mile widziane nawet, gdy w wersji polskiej były czarno/białe

3. Przetłumaczoną przez Autora wersję pracy: tekst (ryciny – oddzielnie) należy wysłać pocztą e-mailową do prof Michała Nowickiego na adres: mnowicki@ump.edu.pl

4. Prof Nowicki wysyła ten tekst do odpowiedniego korektora j. angielskiego. Korektor językowy powinien w ciągu 1-2 tyg. odesłać poprawiony tekst prof Nowickiemu, który będzie prosić Autora o akceptację korekty

5. Poprawiony tekst po akceptacji Autora prof Nowicki przekazuje do składu a następnie jest umieszczany na stronie *Advances in Cell Biology*

6. Autor nie ponosi kosztów korekty j. angielskiego ani publikacji rycin kolorowych, jak też wersji artykułu w j. angielskim

Dotychczas opublikowane w tej wersji artykuły są dostępne pod adresem: <http://www.degruyter.com/printahead/j/acb>

Warunki otrzymywania czasopisma

- złożenie zamówienia: faxem, pocztą itp.
- jednoczesne dokonanie wpłaty na konto:

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Poznaniu

Nr konta w BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

- po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

W sytuacji, kiedy wpłata nastąpi w trakcie trwania prenumeraty, wysyłamy wszystkie zeszyty (numery) czasopisma, które ukazały się w okresie objętym prenumeratą.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty na rok 2020 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań; tel. (61) 854-64-58, fax. (61) 854-64-40

email: zpodemsk@ump.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań; BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Cena prenumeraty rocznika wynosi na rok 2020

dla instytucji (bibliotek) 230 zł + 8% VAT

dla odbiorców indywidualnych 83 zł + 8% VAT

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2020

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland

+48 61 854-64-58, fax. +48 61 854-64-40, email: zpodemsk@ump.edu.pl

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland, BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Price per year 80 dollars USA or 55 euro

Cennik dla Autorów rycin i druku w 2020 r.

| | publikacja pracy | str. druku (ponad 15) |
|---------|------------------|-----------------------|
| Cena zł | 1500,00 | 1 str. 50,00 |

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI (PBK) drukują artykuły przeglądowe w języku polskim lub angielskim z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym oraz Słownikiem Biologii Komórki PAU 2008. Artykuły drukowane w PBK bez zgody redakcji nie mogą być publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

- 1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 5000 słów (do sumy tej nie wlicza się strony tytułowej, streszczenia, podziękowań, tabel wraz z opisami, opisów rycin oraz literatury) i do 100 pozycji bibliograficznych ze szczególnym uwzględnieniem ostatnich 5 lat;
- 2) doniesienia z ostatniej chwili nie przekraczające 1500 słów z maksymalnie 10 pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);
- 3) listy do redakcji (do 350 słów).

Wszystkie artykuły, wyłącznie w wersji elektronicznej, należy kierować na adres mailowy mnowicki@ump.edu.pl

Sposób przygotowania artykułów:

1. list przewodni – kierowany przez autora prowadzącego korespondencję do kolegium redakcyjnego Postępów Biologii Komórki musi zawierać
 - i. informację, że artykuł, jak dotąd, nie został opublikowany w innym czasopiśmie (z wyjątkiem streszczenia), jak i nie został wysłany do innego czasopisma celem rozważenia możliwości jego publikacji
 - ii. oświadczenie autora zajmującego się korespondencją, że wszyscy współautorzy zapoznali się z treścią artykułu i zaakceptowali jego treść
 - iii. oświadczenie o występowaniu lub braku konfliktu interesów autora/autorów artykułu
 - iv. przedstawienie zakresu pracy (ang. contribution) włożonego przez każdego z autorów artykułu w przygotowanie manuskryptu
 - v. oświadczenie, że artykuł po przyjęciu do druku w PBK przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji
2. strona tytułowa musi zawierać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona i nazwiska autorów z afiliacją, liczbę słów znajdujących się w artykule (z zastrzeżeniami podanymi wyżej), liczbę tabel i rycin, słowa kluczowe (3 – 5 słów zgodnych z Medical Subject Headings), skrót tytułu pracy (maks. 40 znaków), informację o finansowaniu artykułu oraz dane autora prowadzącego korespondencję (adres pocztowy, e-mail, numer telefonu oraz numer faxu)
3. streszczenie artykułu w języku polskim i angielskim – maksymalnie 300 słów
4. w tytule i streszczeniu można wprowadzać jedynie powszechnie przyjęte skróty (np. DNA)
5. zasadniczy tekst (Times New Roman 12 pkt., odstęp 1,5 wiersza) należy podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały (należy przyjąć następujący sposób numeracji rozdziałów i podrozdziałów: 1, 1.1, 1.1.1, 1.1.2 itd.)
6. ostateczna wersja tekstu powinna być zapisane w formacie doc. lub docx.
7. tabele wraz z opisami należy umieszczać na końcu artykułu; jednostki miar muszą być zgodne z układem SI;
8. ryciny i schematy należy zapamiętywać w formacie tiff. lub jpg. w jakości minimum 300 dpi; w przypadku publikowania mikrofotografii należy zamieszczać na nich podziałkę (scale bar); wartość podziałki należy podać w opisie mikrofotografii; jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, a zamieszcza się je w niezmienionej formie, należy podać skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na ich reprodukcję;
9. objaśnienia i podpisy rycin, zdjęć i w tabelach powinny być podane w j. polskim i angielskim
10. sposób przygotowania literatury: skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus; cytowanie literatury w tekście – z zastosowaniem nawiasu kwadratowego (np. [5]); spis literatury należy zestawzić alfabetycznie według następującego wzoru:
[1] BEN-CHETRIT E, CHAN EK, SULLIVAN KF, TAN EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; **167**: 1560-1571.
[2] BEUTLER B. Toll-like receptors and their place in immunology. *Nature* 2004; **430**: 498-518.
[3] ELSTON CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In Page DL and Anderson TJ eds. *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987;300-311.

Opłatność (kwoty brutto)

1. opłata za wydrukowanie artykułu nieprzekraczającego 15 stron druku – 1500 zł
2. strona druku (powyżej 15) – dodatkowo 50 zł za jedną stronę

Skierowanie pracy do PBK celem rozważenia możliwości jej publikacji jest tożsame z akceptacją przez autorów pracy regulaminu przyjmowania, oceny i publikowania artykułów naukowych w tym czasopiśmie.

Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji maksymalnie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni od chwili otrzymania recenzji nie odpowiedzą na list redaktora.

Autor zobowiązany jest do wykonywania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 48 godzin do redakcji. Koszty spowodowane większymi zmianami tekstu, wprowadzanymi w korekcie autorskiej poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów i zmian w manuskrypcie.

Po zaksięgowaniu kwoty związanej z publikacją artykułu w Postępkach Biologii Komórki na koncie fundacji wszyscy autorzy otrzymują 1 egzemplarz zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz plik PDF zawierający opracowany przez redakcję manuskrypt (wydrukowane zeszyty oraz plik PDF są wysyłane odpowiednio na adres pocztowy oraz e-mail autora zajmującego się korespondencją). Autorzy mogą również zamówić większą liczbę wydrukowanych reprintów swojej pracy, a ich koszt będzie podany do wiadomości autorów na stosownym druku zamówienia.

TREŚĆ – CONTENTS

| | |
|--|-----|
| MICHAŁEK K., SEŃKO P., BERNACIAK M., MAŁKOWSKA P., DYGUŚ SZ., JANKOWSKI W., LEPCZYŃSKI A.: | 339 |
| Akwaporyny w gruczole mlekowym oraz ich rola w syntezie mleka Aquaporins in mammary gland and their role in milk synthesis | |
| IŻYCKA N., NOWAK-MARKWITZ E., STERZYŃSKA K.: | 353 |
| Wybrane markery nowotworowych komórek macierzystych (CSCs) w raku jajnika Selected cancer stem cells (CSCs) markers in ovarian cancer | |
| CHMIELEWSKA S., ZAMBRZYCKA A., CZYŻEWSKA U., CZERNIECKA M., TYLICKI A.: | 365 |
| Nowoczesne terapie celowane w leczeniu nowotworów jako alternatywa dla konwencjonalnej chemioterapii Modern targeted therapies for cancer treatment as an alternative for conventional chemotherapy | |
| MICHAŁAK A., WADOWIKOWSKA A.: | 391 |
| Potencjał aplikacyjny roślin transgenicznych w produkcji rekombinowanych białek o właściwościach farmakologicznych Transgenic plants as a source of recombinant proteins with pharmacological properties | |
| BUSZKA K., KAMIŃSKA P., BUDNA-TUKAN J.: | 413 |
| Płynna biopsja jako nieinwazyjna metoda oceny wybranych mutacji genowych w niedrobnokomórkowym raku płuca Liquid biopsy as a non-invasive method of selected gene mutation assessment in non-small cell lung cancer | |
| Informacje | 425 |