



WYBRANE CHOROBY NOWOTWOROWE

DIAGNOSTYKA I LECZENIE

Redakcja: Kinga Kalbarczyk, Monika Maciąg

Lublin 2021

Wybrane choroby nowotworowe – diagnostyka i leczenie

Wybrane choroby nowotworowe – diagnostyka i leczenie

Redakcja:
Kinga Kalbarczyk
Monika Maciąg

Lublin 2021

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdecznie podziękowania
dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. Ewa Grzybowska
- prof. dr hab. Jolanta Rzymowska
- dr hab. n. med. Lubomir Bodnar, prof. UWM
- dr hab. Beata Urszula Kotowicz, prof. NIO
- dr hab. Monika Naumowicz, prof. UwB
- dr n. med. Agnieszka Bartoszek
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr n. med. Marta Łuczyk
- dr Magdalena Mizerska-Kowalska
- dr inż. Anna Platta
- dr n. med. Joanna Romejko-Jarosińska
- dr n. med. Marcin Rząca
- dr Dawid Stefaniuk
- dr Wioletta Izabela Wujcicka

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

Korekta:
Agnieszka Grubska

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o.o.

ISBN 978-83-66489-90-5

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Magdalena Chlabicz, Paweł Ławicki, Joanna Motyka, Paweł Sowa, Małgorzata Chlabicz, Sławomir Ławicki <i>Ocena przydatności MMP-9 oraz VEGF w diagnostyce raka piersi</i>	7
Paweł Ławicki, Magdalena Chlabicz, Joanna Motyka, Paweł Sowa, Małgorzata Chlabicz, Sławomir Ławicki <i>Ocena mocy diagnostycznej cytokiny VEGF oraz metaloproteinazy MMP-9 w diagnostyce raka piersi</i>	16
Magdalena Szpunar, Marian Cholewa, Dorota Bartusik-Aebisher <i>Contrast Enhanced MRI w tkance nowotworowej piersi in vitro</i>	26
Joanna Motyka, Sylwia Sibicka, Aleksandra Kicman, Paweł Ławicki, Sławomir Ławicki <i>Znaczenie chemokiny CXCL12 w raku piersi</i>	43
Joanna Gustalik-Nowicka, David Aebisher, Dorota Bartusik-Aebisher <i>Histopatologiczna ocena raka piersi, wykorzystanie rezonansu magnetycznego w diagnostyce raków piersi oraz terapia fotodynamiczna jako obiecująca metoda leczenia</i>	64
Weronika Stańczyk, Oliwia Susło, Aleksandra Odjas <i>Rola układu odpornościowego w patogenezie nowotworów jajnika</i>	71
Katarzyna Grzywok, Anna Strzelec, Marta Smycz-Kubańska <i>Ocena stężenia interleukiny-21 i interleukiny-22 w surowicy kobiet z nowotworem macicy</i>	86
Sandra Chmielewska, Ewa Grabowska, Urszula Czyżewska, Adam Tylicki <i>Grzybnice oportunistyczne w dobie nowotworów</i>	98
Marta M. Fudalej, Anna M. Badowska-Kozakiewicz <i>Czynniki wpływające na rozwój nowotworów przewodu pokarmowego</i>	113
Dorota Nieciecka, Magdalena Osiał, Joanna Celej <i>Wpływ leku przeciwnowotworowego epirubicyny na sposób organizacji lipidów w membranach biomimetycznych</i>	120
Anita Stanjek-Cichoracka <i>Diagnostyka zakażeń wirusem Epstein-Barr i jego rola w rozwoju wybranych chorób nowotworowych</i>	130

Mateusz Mielnik, Marian Cholewa, Dorota Bartusik-Aebisher <i>Contrast Enhanced MRI w tkance nerki in vitro</i>	140
Piotr Przyczyna, Dorota Bartusik-Aebisher, David Aebisher <i>Diagnostyka raka nerki za pomocą czasów relaksacji rezonansu magnetycznego i metody fotodynamicznej</i>	153
Miśkiewicz Joanna, Gola Joanna <i>Znaczenie cząsteczek mikroRNA jako biomarkerów w patogenezie, diagnostyce i terapii chłoniaka rozlanego z dużych komórek B</i>	162
Elżbieta Ostańska, David Aebisher, Dorota Bartusik-Aebisher <i>Histopatologiczna ewaluacja tkanki raka piersi po chemioterapii</i>	177
Michał Osuchowski, Dorota Bartusik-Aebisher, David Aebisher <i>Terapia fotodynamiczna jako metoda przyszłości w leczeniu raka prostaty</i>	187
Klaudia Kister, Jakub Laskowski, Joanna Nurzyńska-Flak <i>Obustronny guz Wilmsa – wczesne rozpoznanie gwarancją sukcesu</i>	196
Elżbieta Ostańska, David Aebisher, Dorota Bartusik-Aebisher <i>Interdyscyplinarne diagnozowanie raka piersi</i>	210
Małgorzata Rogalińska <i>Profilaktyka zdrowia przeciwdziała rozwojowi nowotworów w Polsce</i>	220
Indeks Autorów	227

Ocena przydatności MMP-9 oraz VEGF w diagnostyce raka piersi

1. Wstęp

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet i stanowi poważny problem na całym świecie [1]. Główną przyczyną zgonów z jego powodu są przerzuty do miejsc odległych, najczęściej rozwijające się w kościach i w płucach. Pięcioletnie przeżycie pacjentów z chorobą przerzutową sięga jedynie 21%, podczas gdy u pacjentów z rozpoznaniem raka piersi we wczesnym stadium szacowane jest na około 89-100% [2]. Dlatego też w leczeniu choroby nowotworowej ważne jest jak najszybsze rozpoznanie raka w jak najniższym stadium zaawansowania oraz wczesne wykrycie wznowy lub przerzutów [3, 4].

Metaloproteiny macierzy (MMPs) to rodzina endopeptydaz zależnych od cynku, które mają zdolność degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), ale także składników niemacierzowych. MMPs wykazują jednak wyraźne różnice w specyficzności substratowej, lokalizacji komórkowej i tkankowej, wiązaniu z błoną oraz ich regulacji. Ekspresja MMP jest regulowana transkrypcyjnie przez komórkowe cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu, stres hormonalny, interakcje komórka-komórka i komórka-ECM, endotoksyny bakteryjne oraz transformację onkogeną. MMPs to wszechstronna rodzina enzymów o wielu funkcjach fizjologicznych, jak i patologicznych. MMP-9 odgrywa istotną rolę w inwazji komórek nowotworowych i przerzutowaniu guzów, dlatego jest jedną z najszerzej badanych MMP, a wraz z MMP-2 należy do podgrupy żelatynaz. Nadekspresja MMP-9 jest często obserwowana w różnych nowotworach złośliwych, a zwłaszcza w ich zaawansowanych stadiach, sugerując tym samym możliwą użyteczność kliniczną tej metaloproteiny w procesie diagnostycznym oraz późniejszej terapii [5].

¹ chlabcz.m@gmail.com, Koło Naukowe przy Zakładzie Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

² pawellawicki04@gmail.com, Koło Naukowe przy Zakładzie Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

³ joanna.motyka@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁴ pawel.sowa@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁵ malgorzata.chlabcz@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁶ slawicki@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

W rozwoju każdej zmiany nowotworowej wyróżnia się dwa etapy – wzrost guza pierwotnego i przerzuty, a oba te etapy są możliwe, między innymi dzięki procesom angiogenezy, które zależą od proporcji pomiędzy negatywnymi i pozytywnymi regulatorami śródbłonna [6,7]. Proces angiogenezy jest procesem wieloetapowym, głównie z udziałem cytokin, zwłaszcza VEGF oraz niektórych MMP (np. MMP-9), a jednym z takich etapów jest degradacja błony podstawnej komórek śródbłonna przez enzymy proteolityczne. Enzymy te biorą udział w rozwoju, powstawaniu przerzutów i angiogenezie, wpływając tym samym na rokowanie i przeżycie pacjentów [7].

Angiogeneza jest ważnym elementem procesu karcynogenezy, progresji i przerzutowania w wielu nowotworach złośliwych u ludzi. Uważa się, że czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) jest głównym mediatorem angiogenezy, który promuje proliferację komórek nowotworowych oraz nasila inwazję i przerzuty poprzez aktywację szlaku PI3K/AKT [8-10]. Ponadto udowodniono, że gęstość naczyń krwionośnych w guzach, w tym w raku piersi, jest ściśle skorelowana z rokowaniem [11].

Dane o przydatności klinicznej tych parametrów dostępne w publikowanych pracach potrafią jednak być ze sobą sprzeczne, jednak większość z nich sugeruje możliwość ich wykorzystania w procesach diagnostycznych. Dlatego też, celem badań była ocena przydatności diagnostycznej MMP-9 oraz VEGF jako nowych kandydatów na markery nowotworowe raka piersi, oznaczane osobno w łącznej analizie z markerem CA 15-3.

2. Materiał i Metodyka

2.1. Grupa badana i kontrolna

Badaniom poddano 50 chorych kobiet na raka piersi (*adenocarcinoma ductale*) w stadium małozaawansowanym (I + II stopień wg TNM), leczonych w Białostockim Centrum Onkologii. Poszczególne grupy badane oraz kontrolne przedstawione zostały w tabeli 1.

Pacjentki zarówno z nowotworem piersi, jak i zmianą łagodną zostały poddane kwalifikacji przez lekarza specjalistę w zakresie chirurgii onkologicznej bądź też onkologa z wykorzystaniem badań obrazowych (tj. USG, mammografii i/lub MRI) oraz badań laboratoryjnych. Kobiety zdrowe natomiast ocenione zostały wstępnie przez lekarza medycyny rodzinnej oraz ginekologa podczas okresowych badań.

Wyznaczono grupę kontrolną, tj. pacjentki z małymi zmianami łagodnymi piersi (25 chorych) oraz 25 zdrowych kobiet. Taki dobór grupy kontrolnej spotykany jest w populacji kobiet bez raka, a brak jakichkolwiek zmian w piersiach spotyka się wyjątkowo rzadko lub nie spotyka się w ogóle.

Tabela 1. Podział pacjentek na grupy badane i kontrolne

	Grupa	Stopień zaawansowania i liczba chorych	Wiek
			Mediana (zakres)
Chore na raka piersi	I stopień	T1N0M0 - 25	50 (48-70)
	II stopień	stopień IIA: - T2N0M0 - 3, stopień IIB: - T2N1M0 - 12, - T3N0M0 - 10	50 (47-71)
	Cała grupa badana (I+II) – 50 chorych		50 (47-71)

Grupa kontrolna	Chore ze zmianami łagodnymi piersi (torbiele, <i>fibroadenoma</i> , gruczolaki) – 25 chorych	49 (43-60)
	Osoby zdrowe – 25 kobiet	49 (44-61)

Źródło: Opracowanie własne

2.2. Materiał do badań

Krew żylna pobrana została do probówek z antykoagulantem (heparyna sodowa), a następnie wirowana z prędkością 3500 obrotów/minutę w czasie 20 minut, w celu uzyskania osocza ubogopłytkowego. Osocze następnie przechowywano w temperaturze -85°C do dnia wykonania oznaczeń. VEGF i MMP-9 oznaczano z wykorzystaniem metod immunoenzymatycznej (ELISA) z użyciem odczynników firmy R&D, CA 15-3 – metodą chemiluminescencyjną (CMIA) na analizatorze biochemicznym firmy Abbott.

3. Analiza wyników badań

Przydatność diagnostyczna została określona w oparciu o parametry matematyczno-diagnostycznej analizy wyników badań takich jak: czułość i swoistość diagnostyczna, wartość predykcyjna wyniku dodatniego i ujemnego (PPV, NPV). Punkt odcięcia (*cut off*) określono w oparciu o wartość 95. percentyla grupy kontrolnej (osób zdrowych). *Cut off* wyniósł w przypadku VEGF – 440,95 pg/ml; MMP-9 – 374,54 ng/ml; zaś dla CA 15-3 – 24,44 U/ml.

3.1. Ocena czułości diagnostycznej

Czułość diagnostyczna (SE) jest to stosunek wyników prawdziwie dodatnich (wynik dodatni u osób z potwierdzoną chorobą) do sumy wyników prawdziwie dodatnich oraz fałszywie ujemnych (wszystkie wyniki wśród osób chorych). Czułość określa zdolność testu do wykrycia choroby oraz prawidłowe zaklasyfikowanie osób do grupy chorych.

$$\text{Czułość (\%)} = \frac{PD}{PD + FU} \times 100\% \quad (1)$$

gdzie: PD – liczba wyników prawdziwie dodatnich, FU – liczba wyników fałszywie ujemnych.

Zdolność do rozpoznania raka piersi na podstawie dodatniego wyniku testu, w całej grupie badanej była najwyższa w przypadku VEGF (50%) i była wyższa od MMP-9 (45%) i od markera CA 15-3 (30%). Łączna analiza badanych parametrów z markerem wyraźnie zwiększyła czułość diagnostyczną do 55% (VEGF + CA 15-3) i 52% (MMP-9 + CA 15-3), osiągając najwyższą wartość (80%) przy jednoczesnej analizie MMP-9 z VEGF i z CA 15-3 (wyk. 1).

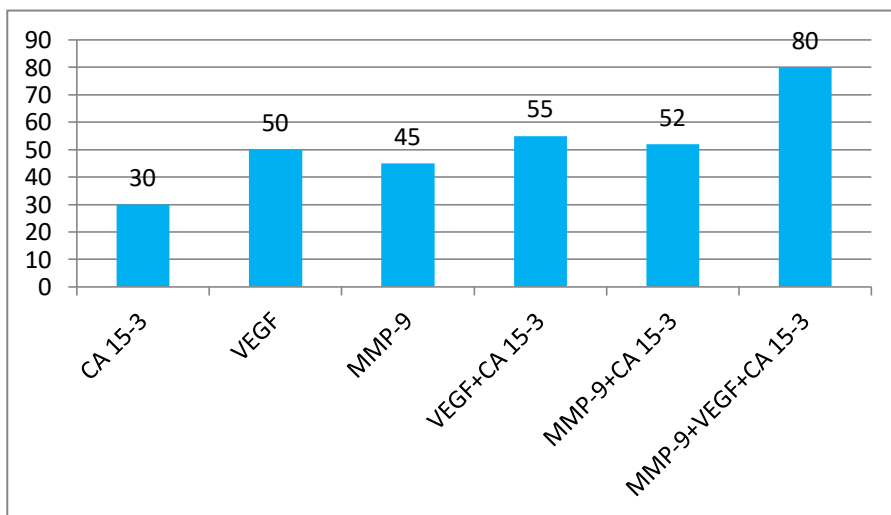
3.2. Ocena swoistości diagnostycznej

Swoistość diagnostyczna (SP) jest to stosunek wyników prawdziwie ujemnych (wynik ujemny wśród osób prawdziwie zdrowych) do sumy wyników prawdziwie ujemnych oraz fałszywie dodatnich (wszystkie wyniki u osób zdrowych). Swoistość określa zdolność testu do wykluczenia choroby oraz prawidłowe zaklasyfikowanie osób do grupy zdrowych.

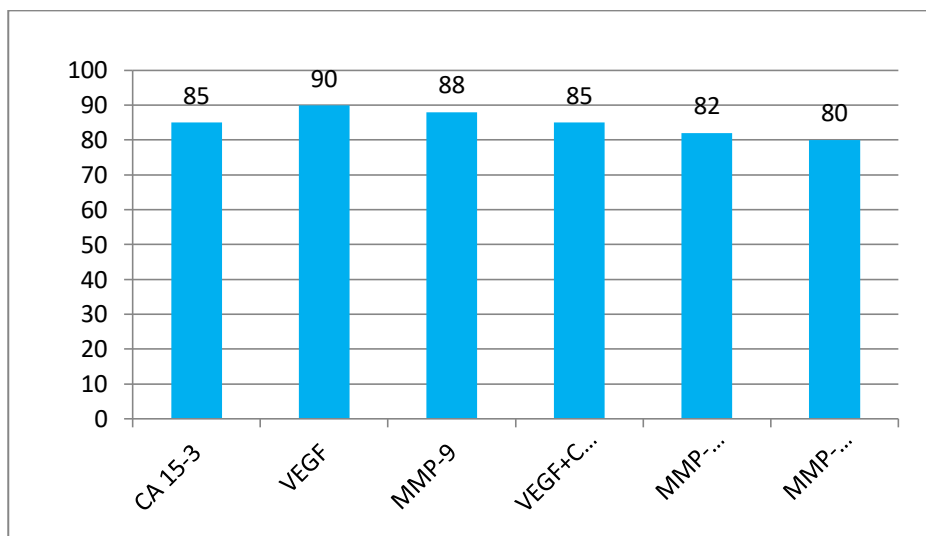
$$\text{Swoistość (\%)} = \frac{PU}{PU + FD} \times 100\% \quad (2)$$

gdzie: PU – liczba wyników prawdziwie ujemnych, FD – liczba wyników fałszywie dodatnich.

Zdolność wykluczenia raka piersi na podstawie ujemnego wyniku testu, przyjęła najwyższą wartość dla VEGF (90%) i była ona wyższa od MMP-9 (88%) i od CA 15-3 (85%). Zauważono, iż w wyniku łącznej analizy badanych parametrów z CA 15-3 nie uzyskano wzrostu wartości swoistości diagnostycznej (wyk. 2).



Wykres 1. Czulość diagnostyczna w całej grupie badanej chorych na raka piersi [opracowanie własne]



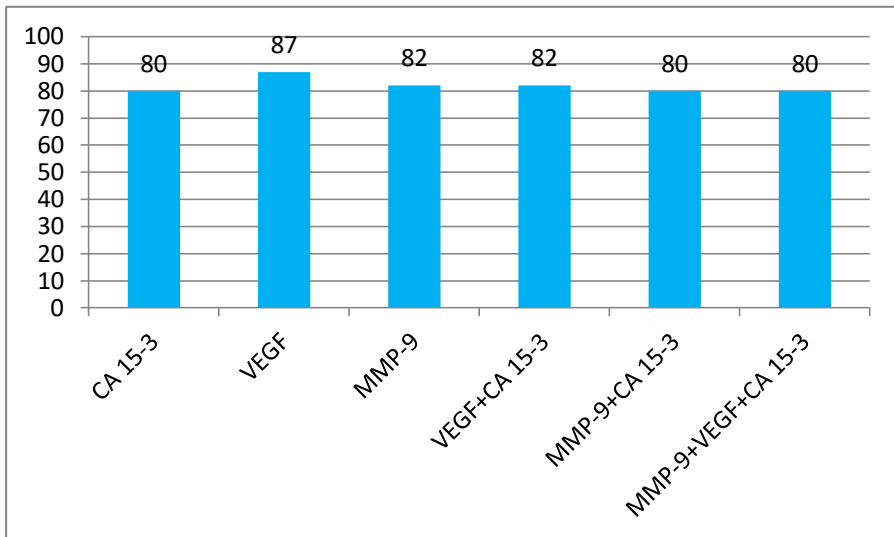
Wykres 2. Swoistość diagnostyczna badanych parametrów i CA 15-3 w grupie kontrolnej (osoby zdrowe) [opracowanie własne]

3.3. Ocena dodatniej wartości predykcyjnej (PPV)

Wartość predykcyjna wyniku dodatniego (PPV) jest to stosunek wyników prawdziwie dodatnich do wszystkich wyników dodatnich, zarówno prawdziwych, jak i fałszywych. Służy do szacowania prawdopodobieństwa wykrycia danej choroby wśród osób z dodatnim wynikiem testu.

$$\text{Dodatnia wartość predykcyjna (PPV) (\%)} = \frac{PD}{PD + FD} \times 100\% \quad (3)$$

Prawdopodobieństwo rozpoznania raka piersi na podstawie dodatniego wyniku badania w całej grupie badanej raka piersi było najwyższe w przypadku VEGF (87%) i była to wartość również wyższa od MMP-9 (82%) i CA 15-3 (80%). Zauważono, iż łączna analiza badanych parametrów nie spowodowała wzrostu wartości PPV (wyk. 3).



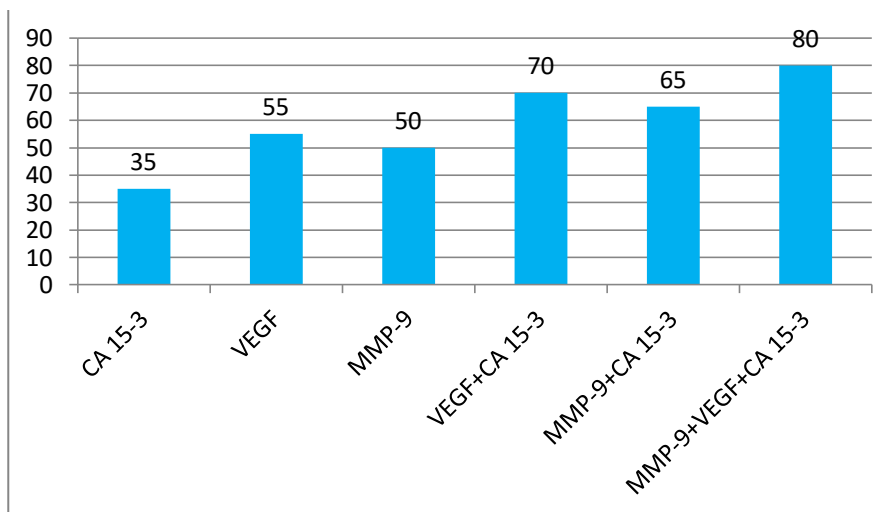
Wykres 3. Dodatnia wartość predykcyjna (PPV) w całej grupie badanej chorych na raka piersi [opracowanie własne]

3.4. Ocena ujemnej wartości predykcyjnej

Wartość predykcyjna wyniku ujemnego (NPV) jest to stosunek wyników prawdziwie ujemnych do wszystkich wyników ujemnych, zarówno prawdziwych, jak i fałszywych. Służy do oszacowania prawdopodobieństwa wykluczenia choroby wśród osób z ujemnym wynikiem testu.

$$\text{Ujemna wartość predykcyjna (NPV) (\%)} = \frac{PU}{PU + FU} \times 100\% \quad (4)$$

Prawdopodobieństwo wykluczenia raka endometrium na podstawie ujemnego wyniku badania w całej grupie badanej raka piersi przyjęło najwyższą wartość dla VEGF (55%) i była ona wyższa od MMP-9 (50%) i markera CA 15-3 (35%) (wyk. 4). Wyraźny wzrost wartości NPV osiągnięto w łącznej analizie badanych parametrów z CA 15-3 (z VEGF – 70%, z MMP-9 – 65%), a najwyższą wartość 80% uzyskano w łącznej analizie trójczynnikowej (MMP-9 + VEGF + CA 15-3).



Wykres 4. Ujemna wartość predykcyjna w całej grupie badanej chorych na raka piersi [opracowanie własne]

4. Dyskusja

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet nie tylko w Polsce, ale również na całym świecie, a wykrywalność tego schorzenia jest ciągle zbyt niska [12-14]. W diagnostyce raka piersi możemy wymienić badania obrazowe, tj. badanie ultrasonograficzne (USG), mammografię oraz oznaczanie klasycznych markerów nowotworowych, głównie CA 15-3. Markery te nie są wystarczająco specyficzne, dlatego też ciągle poszukuje się nowych parametrów, które mogłyby zająć miejsce współczesnych markerów nowotworowych oraz znacząco zwiększyć prawdopodobieństwo wczesnego wykrycia raka piersi, co poprawiłoby rokowanie wśród pacjentek z tym typem nowotworu [15]. Takimi markerami mogą być metaloproteiny (MMPs) oraz niektóre cytokiny, np. VEGF, uczestniczące w rozwoju procesu nowotworzenia, poprzez wpływ na angiogenezę, limfangiogenezę, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej oraz degradację błony podstawnej (BM) komórek śródbłonna naczyń krwionośnych [16]. Stwierdzono, że wysoki poziom tych czynników (w tym również VEGF), wpływa znacząco na złe rokowanie pacjentek z rakiem piersi [17].

Dlatego też, celem niniejszej pracy była ocena przydatności diagnostycznej VEGF oraz wybranej MMP-9 u chorych w mało zaawansowanym stadium raka piersi.

Grupę badaną stanowiło 50 pacjentek z rozpoznaniem rakiem piersi (*adenocarcinoma ductale*) w stadium mało zaawansowanym nowotworu według TNM, tj. I i II stopień. Grupę kontrolną stanowiło 25 pacjentek z małymi zmianami łagodnymi piersi (cysty, fibroadenoma, gruczolaki) oraz 25 osób zdrowych. Taki dobór grupy porównawczej najlepiej odzwierciedla populację kobiet bez raka, a samych piersi bez żadnych zmian nie spotyka się w ogóle lub bardzo rzadko. Dobór grup badanych oraz sposób porównania z grupą kontrolną są zgodne z wytycznymi innych autorów [18, 19].

W przypadku czułości diagnostycznej najwyższe wartości uzyskano dla VEGF i były one wyraźnie wyższe od uzyskanych dla rutynowego markera. Łączna analiza badanych parametrów z CA 15-3 skutkowałą znacznym podwyższeniem wartości czułości diagnostycznej i była najwyższa w analizie trójczynnikowej. W badaniach Ławickiego i wsp. [20] oraz Zajkowskiej i wsp. [21] VEGF również uzyskał najwyższe

wartości dla badanych parametrów w I i II stopniu zaawansowania raka. Natomiast w całej grupie badanej, wartość czułości dla CA 15-3 była wyższa w obu publikacjach. Ta niezgodność może być spowodowana doborem grupy badanej (ze względu na rozbieżności w stadiach zaawansowania) oraz kontrolnej, co wpływa znacząco na wyznaczenie punktu odcięcia stosowanego do wyliczeń statystycznych. Podobne doniesienia znaleziono w pracy Metwally i wsp. [22]. Łączna analiza CA 15-3 z badanymi parametrami w przypadku pracy Ławickiego i wsp. [20] oraz Zajkowskiej i wsp. [21] również wykazały najwyższe wartości dla połączenia analizy markera z cytokiną VEGF.

Najwyższą wartość swoistości diagnostycznej wśród wszystkich badanych parametrów, niezależnie czy w analizie pojedynczej czy łącznej z markerem CA 15-3, uzyskał VEGF. Podobne wyniki zostały przedstawione w pracy Ławickiego i wsp. [20] w przebiegu raka piersi, Cao i wsp. [23] w przebiegu raka płuc, Bunger i wsp. [24] w przebiegu raka okrężnicy oraz Li i wsp. [25] i Lubowickiej i wsp. [26] w przebiegu raka jajnika.

Wartość PPV była najwyższa dla cytokiny VEGF. Łączna analiza z CA 15-3, podobnie jak w przypadku swoistości diagnostycznej, nie przyczyniła się do wzrostu opisywanego parametru. Natomiast najwyższa wartość NPV również została zaobserwowana dla VEGF. Wzrastała ona przy łącznej analizie z CA 15-3. W badaniach Ławickiego i wsp. [20, 27], VEGF również wyróżniał się niezwykle wysoką wartością predykcyjną wyniku dodatniego i ujemnego, a łączna analiza, zwłaszcza trójczynnikowa, potwierdza wysoką przydatność diagnostyczną tej cytokiny. Podobne wartości dla VEGF zostały uzyskane przez zespół Cao i wsp. [23] (odpowiednio 90,9% i 69,6%) w przebiegu raka płuc.

Analiza trójczynnikowa wydaje się być najbardziej użyteczna w diagnostyce raka piersi, ponadto jest nowatorska, gdyż w piśmiennictwie nie znaleziono podobnych badań.

5. Wnioski

Podsumowując uzyskane wyniki należy podkreślić, że przeprowadzone badania sugerują przydatność diagnostyczną wszystkich badanych parametrów (VEGF oraz MMP-9) w diagnostyce raka piersi, jednakże tylko w kombinowanej analizie trójczynnikowej z rutynowo stosowanym markerem CA 15-3 jako nowy panel diagnostyczny.

Literatura

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*, Int J Cancer, 144(8), 2019, s. 1941-1953.
2. Kitamura T., Pollard J.W., *Therapeutic potential of chemokine signal inhibition for metastatic breast cancer*, Pharmacol Res., 100, 2015, s. 266-270.
3. Harris L., Fritsche H., Mennel R., Norton L., Ravdin P., Taube S., Somerfield M.R., Hayes D.F., Bast R.C., Jr. *American Society of Clinical Oncology update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*, J Clin Oncol., 25(33), 2007, s. 5287-5312.
4. Cedolini C., Bertozzi S., Londero A.P., Bernardi S., Seriau L., Concina S., Cattin F., Risaliti A., *Type of breast cancer diagnosis, screening, and survival*, Clin Breast Cancer, 14(4), 2014, s. 235-40.
5. Huang H., *Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances*, Sensors (Basel), 2018, 18(10), 3249, 2018 Sep 27, doi:10.3390/s18103249

6. Lohela M., Bry M., Tammela T., Alitalo K., *VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis*, *Curr Opin Cell Biol*, 21(2), 2009, s. 154-65.
7. Jones A., Harris A.L., *New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy*, *Cancer J Sci Am.*, 4, 1998, s. 209-17.
8. Choi J.W., Kim H.A., Nam K., Na Y., Yun C.O., Kim S., *Hepatoma targeting peptide conjugated bio-reducible polymer complexed with oncolytic adenovirus for cancer gene therapy*, *J Control Release*, 220, 2015, s. 691-703.
9. Arcondéguy T., Lacazette E., Millevoi S., Prats H., Touriol C., *VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level*, *Nucleic Acids Res.*, 41, 2013, s. 7997-8010.
10. Tang N., Shi L., Yu Z., Dong P., Wang C., Huo X., Zhang B., Huang S., Deng S., Liu K., Ma T., Wang X., Wu L., *Gambufotalin, a major derivative of bufadienolide, inhibits VEGF-induced angiogenesis by suppressing VEGFR-2 signaling pathway*, *Oncotarget*, 7, 2016, s. 3533-3547, doi: 10.18632/oncotarget.6514.
11. Vumbaca F., Phoenix K.N., Rodriguez-Pinto D., Han D.K., Claffey K.P., *Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis*, *Mol Cell Biol*, 28, 2008, s. 772-783.
12. Didkowska J., Wojciechowska U., *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2015 roku*, Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2017.
13. Szewczyk K., *Epidemiologia i profilaktyka raka piersi*, [w:] Kornafel J. (red.), *Rak piersi*, CMKP, Warszawa 2011.
14. Wojciechowska U., Didkowska J., *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce*, Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, <http://onkologia.org.pl/raporty/> dostęp z dnia 01/12/2018.
15. Ławicki S., Mroczko B., Szmitkowski M., *Markery nowotworowe raka piersi*, *Postepy Hig Med Dosw.*, 58, 2004, s. 292-300.
16. Lohela M., Bry M., Tammela T., Alitalo K., *VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis*, *Curr Opin Cell Biol.*, 21(2), 2009, s. 154-65.
17. Karna E., Szoka L., Palka J.A., *Betulinic acid inhibits the expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells*, *Mol Cell Biochem.*, 340(1-2), 2010, s. 15-20.
18. Lubowicka E., Przyłipiak A., Zajkowska M., Piskór B.M., Malinowski P., Fiedorowicz W., Ławicki S., *Plasma Chemokine CCL2 and Its Receptor CCR2 Concentrations as Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer Patients*, *Biomed Res Int.*, 2018:2124390.
19. Zajkowska M., Zbucka-Krętowska M., Sidorkiewicz I., Lubowicka E., Gacuta E., Szmitkowski M., Chrostek L., Ławicki S., *Plasma levels and diagnostic utility of macrophage-colony stimulating factor, matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as tumor markers in cervical cancer patients*, *Tumour Biol.*, 40(7),1010428318790363, 2018.
20. Ławicki S., Zajkowska M., Głazewska E.K., Będowska G.E., Szmitkowski M., *Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-9, and TIMP-1 in the diagnosis of patients with breast cancer*, *Onco Targets Ther.*, 9, 2016, s. 911-9.
21. Zajkowska M., Głazewska E.K., Będowska G.E., Chorąży P., Szmitkowski M., Ławicki S., *Diagnostic Power of Vascular Endothelial Growth Factor and Macrophage Colony-Stimulating Factor in Breast Cancer Patients Based on ROC Analysis*, *Mediators Inflamm.*, 5962946, 2016.
22. Metwally F.M., El-mezayen H.A., Ahmed H.H., *Significance of vascular endothelial growth factor, interleukin-18 and nitric oxide in patients with breast cancer: correlation with carbohydrate antigen 15.3*, *Med Oncol.*, 28(1), 2011, s. 15-21.
23. Cao C., Sun S.F., Lv D., Chen Z.B., Ding Q.L., Deng Z.C., *Utility of VEGF and sVEGFR-1 in bronchoalveolar lavage fluid for differential diagnosis of primary lung cancer*, *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(4), 2013, s. 2443-6.

24. Bünger S., Haug U., Kelly F.M., Klempt-Giessing K., Cartwright A., Posorski N., Dibbelt L., Fitzgerald S.P., Bruch H.P., Roblick U.J., *Toward standardized high-throughput serum diagnostics: multiplex-protein array identifies IL-8 and VEGF as serum markers for colon cancer*, J Biomol Screen, 16(9), 2011, s. 1018-26.
25. Li L.N., Zhou X., Gu Y., Yan J., *Prognostic value of MMP-9 in ovarian cancer: a meta-analysis*, Asian Pac J Cancer Prev, 14(7), 2013, s. 4107-13.
26. Lubowicka E., Gacuta E., Zajkowska M., Głażewska E.K., Przyłipiak A., Chrostek L., Zbucka-Krętowska M., Ławicki S., *The plasma levels and diagnostic utility of matrix metalloproteinase-9 and CA 125 in cervical cancer patients*, Pol Merkur Lekarski, 43(253), 2017, s. 10-14.
27. Ławicki S., Zajkowska M., Głażewska E.K., Będkowska G.E., Szmitkowski M., *Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 in the diagnostics of breast cancer patients*, Biomarkers, 22(2), 2017, s. 157-164.

Ocena przydatności MMP-9 oraz VEGF w diagnostyce raka piersi

Streszczenie

Rak piersi jest obecnie najczęstszym nowotworem złośliwym występującym u kobiet. Jest heterogennym typem nowotworu o dużym zróżnicowaniu typu histopatologicznego oraz molekularnego, co dostarcza wielu problemów podczas procesu diagnostycznego oraz monitorowania leczenia, co skutkuje jego wysoką śmiertelnością, szczególnie w przypadku zaawansowanych stadiów choroby. Obecnie nie istnieje marker nowotworowy, który zdiagnozowałby toczący się proces nowotworowy w bardzo wczesnym jego etapie. Dlatego też ciągle poszukuje się nowych markerów nowotworowych, szczególnie w grupach związków mających znaczną rolę w procesie nowoworzenia, do których można zaliczyć między innymi cytokiny, metaloproteiny (MMPs) i ich tkankowe inhibitory.

Celem pracy była ocena przydatności diagnostycznej MMP-9 oraz VEGF w osoczu chorych na raka piersi. Badaniami objęto grupę 50 chorych na raka piersi we wczesnych stopniach zaawansowania nowotworu (I i II stopień). Do grupy kontrolnej zaliczono pacjentki z małymi zmianami łagodnymi piersi oraz grupę kobiet zdrowych (po 25 osób).

MMP-9 i VEGF oznaczono metodą ELISA, zaś marker CA 15-3 – metodą CMIA. Przydatność diagnostyczną określono za pomocą SE, SP, PPV, NPV.

Najwyższą przydatnością diagnostyczną cechowały się oznaczenia VEGF, a jego wskaźniki diagnostyczne wzrastały wyraźnie w łącznej analizie z CA 15-3, zwłaszcza w analizie trójczynnikowej.

Przeprowadzone badania sugerują przydatność diagnostyczną badanych parametrów w diagnostyce raka piersi, zwłaszcza VEGF z MMP-9 w analizie kombinowanej z markerem nowotworowym CA 15-3 jako nowy panel diagnostyczny.

Słowa kluczowe: przydatność diagnostyczna, VEGF, MMP-9, CA 15-3, rak piersi

Evaluation of the diagnostic utility of MMP-9 and VEGF in diagnostic process of breast cancer

Abstract

Breast cancer is currently the most common malignancy in women. It is a heterogeneous type of cancer with high histopathological and molecular diversity, which causes many problems during diagnostic process and treatment, resulting in high mortality rate, especially in advanced stages of the disease. Currently, there is no tumor marker that would diagnose an ongoing neoplastic process at a very early stage. Therefore, new tumor markers are constantly being searched for, especially in the group of agents that have a significant role in the tumorigenesis, which include cytokines, metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors.

The aim of this study was to evaluate the diagnostic utility of MMP-9 and VEGF in the plasma of breast cancer patients. The study included a group of 50 breast cancer patients in early stages of cancer (stage I and II). Control groups included patients with benign breast lesions and a group of healthy women (25 each). MMP-9 and VEGF were determined by ELISA and CA 15-3 by CMIA. The diagnostic utility was determined by SE, SP, PPV, NPV.

VEGF assays had the highest diagnostic utility, and its diagnostic indices increased markedly with cancer progression and in a combined analysis with CA 15-3, especially in three-factor analysis.

The performed studies suggest diagnostic usefulness of the examined parameters in breast cancer diagnosis, especially VEGF with MMP-9 in combined analysis with tumor marker CA 15-3 as a new diagnostic panel.

Keywords: diagnostic usefulness, VEGF, MMP-9, CA 15-3, breast cancer

Ocena mocy diagnostycznej cytokiny VEGF oraz metaloproteinazy MMP-9 w diagnostyce raka piersi

1. Wstęp

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym narządu rodnego. Cechuje go wysokie zróżnicowanie pod względem typu histopatologicznego oraz molekularnego, wysoka zachorowalność i śmiertelność, szczególnie w zaawansowanych stadiach klinicznych rozwoju choroby. Szacuje się, że pięcioletnia przeżywalność pacjentek we wczesnym stadium tego nowotworu sięga prawie 90%, natomiast w przypadku występowania przerzutów liczba ta drastycznie spada do około 20% [1]. Liczby te tylko podkreślają znaczenie wczesnej diagnostyki zmiany nowotworowej jako kluczowego elementu całego procesu terapeutycznego. Obecnie ciągle nie znaleziono markera, który pozwalał by wykryć pierwsze oznaki toczącego się procesu nowotworzenia. Dlatego też naukowcy stale poszukują nowych metod diagnostycznych i parametrów, w tym markerów nowotworowych, przydatnych we wczesnej diagnostyce raka piersi.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) to rodzina proteaz zależnych od cynku. Metaloproteinaza 9. (MMP-9) stanowi jeden z głównych enzymów rodziny MMPs [2, 3]. Jest wydzielana w postaci zymogenu przede wszystkim przez komórki zrębu tkanki łącznej, a także przez komórki nowotworowe. W wyniku procesu hydrolizy dochodzi do aktywacji MMP-9, która następnie jest zdolna do degradacji kolagenu typu IV błony podstawnej, co, jak się uważa, wpływa niekorzystnie na zdolność błony podstawnej do hamowania inwazji komórek nowotworowych [4]. Kolagen typu IV jest głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej naczyń, a wydzielane z guza MMP-9 może uszkadzać te bariery tkankowe i nasilać inwazję, i przerzuty komórek nowotworowych, zarówno miejscowe, jak i odległe.

¹ pawellawicki04@gmail.com, Koło Naukowe przy Zakładzie Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

² chlabicz.m@gmail.com, Koło Naukowe przy Zakładzie Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

³ joanna.motyka@umb.edu.pl, doktorantka, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁴ pawel.sowa@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁵ malgorzata.chlabicz@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁶ slawicki@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

Zwiększona ekspresja MMP-9 została udokumentowana w wielu różnych typach histologicznych nowotworów złośliwych i ich przerzutów, takich jak nowotwory jamy ustnej, krtani, żołądka, płuc, wątroby, piersi, kości, skóry czy szyjki macicy [3-9]. Dlatego MMP-9 i pozostałe MMPs, np. MMP-2, uważane są za potencjalnie nowe biomarkery prognostyczne, które mogą być przydatne w diagnostyce różnych nowotworów.

Śródbłonkowo-naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF) jest czynnikiem, który ma ogromne znaczenie w procesie angiogenezy. Dane przedkliniczne wskazują na kluczową rolę VEGF w proliferacji, migracji i inwazji komórek śródbłonka. Ponadto VEGF wywiera silny efekt apoptotyczny na komórki śródbłonka, a także jest silnym regulatorem przepuszczalności naczyń krwionośnych. Ostatnie dane sugerują, że komórki nowotworowe wykazujące nadekspresję VEGF i tym samym są zdolne do wywołania zaburzeń w obrębie błony podstawnej komórek śródbłonka, co być może przyczynia się do skutecznego tworzenia przerzutów przez komórki raka piersi [10].

Rola VEGF w raku piersi była badana zarówno w modelach przedklinicznych, jak i w praktyce klinicznej. W modelach przedklinicznych, komórki raka piersi z nadekspresją VEGF mają zarówno większy potencjał wzrostu, jak i większy potencjał przerzutowy w modelach ksenograficznych ludzkich guzów. W badaniach klinicznych nadekspresja VEGF we wczesnym stadium raka piersi wiąże się ze zwiększonym potencjałem przerzutowym, mierzonym przeżyciem wolnym od choroby odległej oraz z widoczną opornością na systemowe terapie adjuwantowe, tj. zarówno chemioterapię, jak i terapię hormonalną. Co ciekawe, nadekspresja HER2 w raku piersi indukuje nadekspresję VEGF, co sugeruje, że indukcja angiogenezy może przyczyniać się do zwiększenia śmiertelności w przebiegu tych nowotworów [10].

Dlatego też korzystając z dostępnych doniesień literaturowych oraz badań własnych, celem pracy była ocena mocy diagnostycznej MMP-9 oraz VEGF jako przyszłych markerów raka piersi, w oparciu o analizę pola pod krzywą ROC (AUC), dla każdego parametru osobno oraz w łączonej analizie ze standardowo oznaczanym markerem raka piersi tj. CA 15-3 (analiza trójczynnikowa).

2. Materiał i Metodyka

2.1. Grupy badane i kontrolne

Badaniami objęto 50 chorych na raka piersi (*adenocarcinoma ductale* – rak przewodowy), leczonych w Białostockim Centrum Onkologii. Charakterystykę grupy badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

Grupa		Stopień zaawansowania i liczba chorych	Wiek
			Mediana (zakres)
Rak piersi	I stopień	T1N0M0 - 25	50 (48-70)
	II stopień	stopień IIA: - T2N0M0 - 3, stopień IIB: - T2N1M0 - 12, - T3N0M0 - 10	50 (47-71)
	Cała grupa badana (I+II) – 50 chorych		50 (47-71)

Grupa kontrolna	Chore ze zmianami łagodnymi piersi (<i>torbiele, fibroadenoma, gruczolaki</i>) – 25 chorych	49 (43-60)
	Osoby zdrowe – 25 kobiet	49 (44-61)

Źródło: Opracowanie własne

Pacjentki podzielono na grupy w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według TNM, tj. chore w stopniu I i II zaawansowania raka piersi.

Dobór pacjentek do badań (chore na raka piersi oraz pacjentki ze zmianami łagodnymi) dokonano w oparciu o badanie specjalistyczne lekarza chirurgii onkologicznej lub onkologa, z wykorzystaniem badań dodatkowych, tj. USG, mammografii, a także w wybranych przypadkach innych badań obrazowych, tj. np. MRI, a także z wykorzystaniem badań laboratoryjnych. U wszystkich kobiet grupy badanej i kontrolnej wykluczono stan zapalny. Dobór osób zdrowych dokonał lekarz specjalista medycyny rodzinnej, a następnie lekarz specjalista ginekolog podczas badań okresowych.

Grupę kontrolną stanowiło 25 chorych ze zmianami łagodnymi piersi (*fibroadenoma*) oraz 25 zdrowych kobiet. Taki dobór kobiet do grupy kontrolnej w wiarygodny sposób odzwierciedla realne zmiany w piersiach, spotykane u pacjentek bez raka, a samo znalezienie gruczolów piersiowych bez żadnych zmian w okresie pomonopauzalnym jest mało prawdopodobne.

Wszystkie kobiety w grupie badanej i kontrolnej były w statusie postmenopauzalnym.

2.2. Materiał do badań

Krew pobierano do próbek z heparyną sodową, a następnie wirowano z prędkością 3500 obrotów/minutę w czasie 20 minut, w celu uzyskania osocza ubogopłytkowego, które przechowywano w temperaturze minus 85°C. VEGF i MMP-9 oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA z użyciem odczynników firmy R&D Systems, CA 15-3 – metodą chemiluminescencyjna (CMIA).

2.3. Analiza statystyczna wyników

Ocenę mocy diagnostycznej badań wykonano w oparciu o analizę pola pod krzywą ROC (AUC – *area under curve*), wykorzystując program statystyczny GraphRoc. Pole powierzchni pod wykresem funkcji ROC (AUC) określa moc diagnostyczną testu, tj.: 0.9-1.0 = bardzo dobry; 0.8-0.9 = dobry; 0.7-0.8 = satysfakcjonujący; 0.6-0.7 = średni; 0.5-0.6 = niedostateczny [11, 12].

2.4. Ocena mocy diagnostycznej badań u chorych w I stopniu zaawansowania raka piersi

W tabeli 2 zaprezentowano wartości analizy funkcji ROC, dotyczące badanych parametrów i markera porównawczego CA 15-3 w grupie chorych w I stopniu zaawansowania na raka piersi. Najwyższą wartość AUC w grupie badanej chorych w I stopniu zaawansowania raka piersi otrzymano w przypadku VEGF (0,6973) i była to wartość wyższa od markera porównawczego CA 15-3 (0,6652) i MMP-9 (0,5941), (wyk. 1). Wykazano ponadto, iż wartość AUC w przypadku VEGF, identycznie jak CA 15-3, była znamienne statystycznie większa od AUC = 0,5, tj. granicy przydatności diagnostycznej testu (odpowiednio: $p = 0,0004$; $p = 0,0043$).

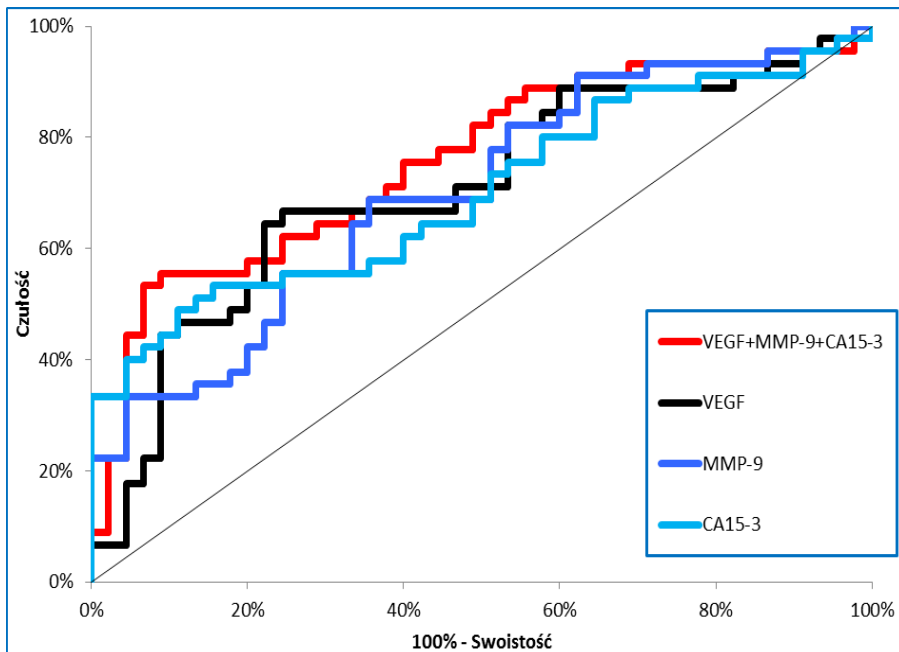
Łączna analiza wszystkich badanych parametrów i CA 15-3 w grupie badanej chorych w I stopniu zaawansowania raka piersi zwiększyła wyraźnie pole pod krzywą ROC (AUC), osiągając najwyższą wartość AUC = 0,7272 i również była ona znacznie wyższa od AUC = 0,5 ($p < 0,0001$).

Tabela 2. Analiza pola pod krzywą ROC (AUC) badanych parametrów i CA 15-3 u chorych w I stopniu zaawansowania raka piersi

Zmienna	AUC	SE	95% C.I. (AUC)	p (AUC = 0,5)
CA15-3	0,6652	0,0574	(0,552-0,779)	0,0043
VEGF	0,6973	0,0554	(0,588-0,807)	0,0004
MMP9	0,5941	0,0604	(0,475-0,713)	0,1207
VEGF+MMP-9 +CA15-3	0,7272	0,0551	(0,598-0,817)	0,0002

* **pogrubieniem** zaznaczono różnice istotne statystycznie przy porównaniu pola pod krzywą ROC (AUC) do wartości AUC= 0,5, tj. granicy przydatności diagnostycznej testu.

Źródło: Opracowanie własne



Wykres 1. Analiza krzywych ROC badanych parametrów i CA 15-3 w grupie chorych w I stopniu zaawansowania raka piersi [opracowanie własne]

2.5. Ocena mocy diagnostycznej badań u chorych w II stopniu zaawansowania raka piersi

Wartości analizy funkcji ROC badanych parametrów i markera porównawczego CA 15-3 w grupie badanej chorych w II stopniu zaawansowania na raka piersi przedstawiono w tabeli 3.

Zauważono, iż najwyższą wartość AUC w grupie badanej pacjentek w II stopniu zaawansowania na raka piersi otrzymano w przypadku MMP-9 (0,7304) i były to wartości wyższe lub podobne jak markera CA 15-3 (0,7123).

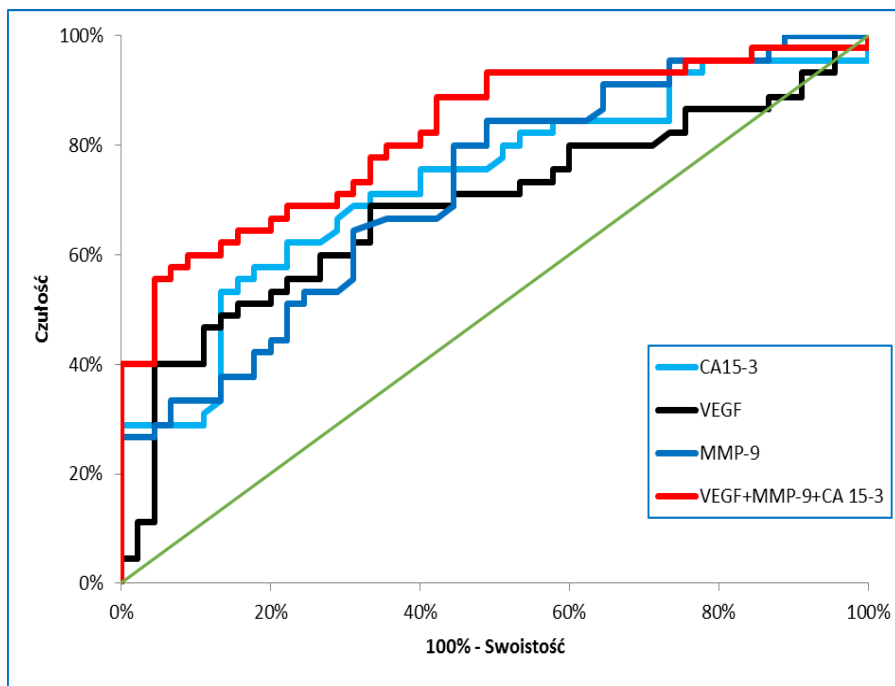
Wykazano ponadto, iż wartości AUC prawie wszystkich badanych parametrów, tj. VEGF i MMP-9, identycznie jak CA 15-3 były istotnie statystycznie większe od AUC = 0,5, tj. granicy przydatności diagnostycznej testu (odpowiednio: $p = 0,0013$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$). Wzrost mocy diagnostycznej badań zaobserwowano wraz z zaawansowaniem raka piersi, oraz w przypadku łącznej analizy wszystkich parametrów, osiągając najwyższą wartość AUC=0,8224 i była ona również wyższa od AUC = 0,5 ($p < 0,0001$) (wyk. 2).

Tabela 3. Analiza pola pod krzywą ROC (AUC) badanych parametrów i CA 15-3 u chorych w II stopniu zaawansowania raka piersi

Zmienna	AUC	SE	95% C.I. (AUC)	p (AUC = 0,5)
CA15-3	0,7123	0,0533	(0,627-0,837)	< 0,0001
VEGF	0,7004	0,0578	(0,573-0,800)	0,0013
MMP9	0,7304	0,0534	(0,616-0,825)	< 0,0001
VEGF+MMP-9 +CA15-3	0,8224	0,0456	(0,723-0,901)	< 0,0001

* **pogrubieniem** zaznaczono różnice istotne statystycznie przy porównaniu pola pod krzywą ROC (AUC) do wartości AUC= 0,5, tj. granicy przydatności diagnostycznej testu.

Źródło: Opracowanie własne



Wykres 2. Analiza krzywych ROC badanych parametrów i CA 15-3 w grupie chorych w II stopniu zaawansowania raka piersi [opracowanie własne]

2.6. Ocena mocy diagnostycznej badań w całej grupie badanej

Wartości z analizy funkcji ROC badanych parametrów i markera CA 15-3 w całej grupie badanej chorych na raka piersi przedstawiono w tabeli 4. Zaobserwowano, iż najwyższą wartość AUC w całej grupie badanej (I+II stopień) chorych na raka piersi otrzymano w przypadku VEGF (0,7002) i były to wartości nieznacznie niższe od markera porównawczego (0,6999), ale znamienne statystycznie wyższe od $AUC = 0,5$, tj. granicy przydatności diagnostycznej testu.

Wyraźny wzrost wartości pola pod krzywą ROC (AUC), zaobserwowano w przypadku łącznej analizy badanych parametrów, osiągając najwyższą wartość (0,7765) w przypadku jednoczesnej analizy VEGF, MMP-9 z CA 15-3 (wyk. 3).

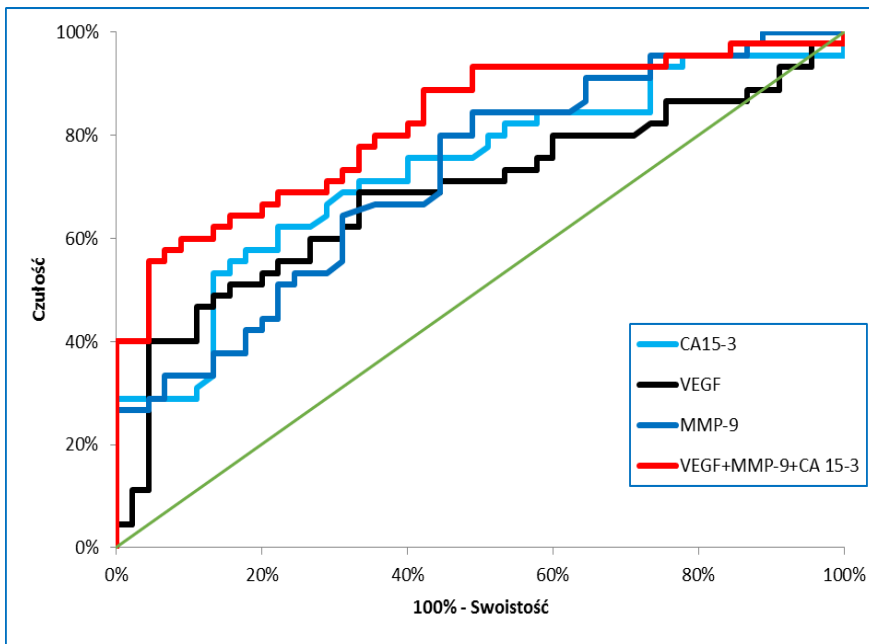
Ponadto wartości AUC każdego badanego parametru (VEGF, MMP-9) w łącznej analizie z markerem CA 15-3 były znamienne wyższe od $AUC = 0,5$ ($p < 0,0001$ w każdym przypadku).

Tabela 4. Analiza pola pod krzywą ROC (AUC) badanych parametrów i CA 15-3 u chorych w całej grupie badanej raka piersi

Zmienna	AUC	SE	95% C.I. (AUC)	p (AUC = 0,5)
CA15-3	0,6999	0,0464	(0,608-0,789)	< 0,0001
VEGF	0,7002	0,0462	(0,601-0,783)	< 0,0001
MMP9	0,6574	0,0492	(0,561-0,753)	0,0013
VEGF+MMP-9 +CA15-3	0,7765	0,0402	(0,682-0,840)	< 0,0001

* **pogrubieniem** zaznaczono różnice istotne statystycznie przy porównaniu pola pod krzywą ROC (AUC) do wartości $AUC = 0,5$, tj. granicy przydatności diagnostycznej testu.

Źródło: Opracowanie własne



Wykres 3. Analiza krzywych ROC badanych parametrów i CA 15-3 w całej grupie badanej (I+II stopień) chorych na raka piersi [opracowanie własne]

3. Dyskusja

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet nie tylko w Polsce, ale również na całym świecie. Uważa się, że obecnie wykrywalność tego schorzenia jest na zbyt niskim poziomie, co spowodowane jest niedostateczną diagnostyką [13-15].

W diagnostyce raka piersi możemy wymienić badania obrazowe, tj. np. mammografię oraz badanie ultrasonograficzne (USG), a także oznaczanie klasycznych markerów nowotworowych, głównie CA 15-3. Nie wykazuje on jednak wystarczająco wysokiej czułości i swoistości diagnostycznej, zwłaszcza w początkowych stadiach zaawansowania raka piersi. Jednak markery te nie są wystarczająco specyficzne, dlatego też ciągle poszukuje się nowych parametrów, które mogłyby zająć miejsce współczesnych markerów nowotworowych oraz znacząco zwiększyć prawdopodobieństwo wczesnego wykrycia raka piersi, co poprawiłoby rokowanie wśród pacjentek z tym typem nowotworu [16]. Takimi markerami mogą być MMPs oraz niektóre cytokiny, np. VEGF, uczestniczące w rozwoju procesu nowotworzenia, poprzez wpływ na angiogenezę, limfangiogenezę, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej oraz degradację błony podstawnej naczyń krwionośnych [17]. Stwierdzono, że wysoki poziom stężenia tych czynników, wpływa znacząco na złe rokowanie chorych na raka piersi [18].

Dlatego też, celem niniejszej pracy była ocena mocy diagnostycznej VEGF oraz wybranej MMP-9 u chorych w małozaawansowanym stadium raka piersi. Moc diagnostyczną badań określono w oparciu o analizę pola pod krzywą ROC (AUC).

Grupę badaną stanowiło 50 pacjentek z rozpoznaniem rakiem piersi (*adenocarcinoma ductale*). Pacjentki zostały podzielone na dwie podgrupy w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według TNM, tj. I i II stopień. Dobór grup badanych oraz sposób porównania z grupami kontrolnymi są zgodne z wytycznymi w pracach badawczych innych autorów [19, 20].

Analizę mocy diagnostycznej badań wykonano w oparciu o analizę pola powierzchni pod krzywą ROC (AUC). Krzywa ROC oraz pole powierzchni pod krzywą (AUC) służą do określenia przydatności diagnostycznej markera nowotworowego [11].

Najwyższe wartości AUC spośród wszystkich badanych parametrów w I stopniu zaawansowania uzyskał VEGF, a łączna analiza wykazała najwyższą wartość dla połączenia tej cytokiny z MMP-9 oraz CA 15-3. Podobne wyniki zostały zaobserwowane w pracy Zajkowskiej i wsp. [21]. Zbliżone wartości AUC dla VEGF i CA 15-3 (wyższe dla markera rutynowego) oraz potwierdzenie wysokiej wartości dla łącznej analizy zostały zaobserwowane w pracy Ławickiego i wsp. [22-24]. W pracy Zajkowskiej i wsp. [25] w przebiegu nowotworu szyjki macicy, również wykazano wysoką wartość AUC dla VEGF we wszystkich stadiach tego nowotworu. Badania Ławickiego i wsp. [24] wykazały podobną wartość AUC dla VEGF w analizie pojedynczej, jednak wartości dla CA 15-3 były nieznacznie wyższe. Różnice mogą być spowodowane tym, iż praca ta przedstawia tylko i wyłącznie dane dla całej grupy badanej. W całej grupie badanej, najwyższe i bardzo zbliżone wartości AUC osiągnęły VEGF i CA 15-3, a ich łączna analiza charakteryzowała się znacznym wzrostem i osiągnęła wartość $AUC = 0,7765$ w podwójnej analizie. Brak jednak porównań w piśmiennictwie analizy potrójnej (VEGF+MMP-9+CA 15-3), a uzyskane wyniki były wyraźnie wyższe aniżeli w analizie dwuczynnikowej u innych autorów.

Dlatego też analiza trójczynnikowa wydaje się być bardziej przydatna w diagnostyce małozaawansowane stadium raka piersi. Sam dobór nowych kandydatów na markery nowotworowe z różnych grup, tj. MMPs oraz cytokin jest analizą nowatorską i bardzo pożądaną jeśli chodzi o diagnostykę nie tylko raka piersi, ale być może innych nowotworów.

4. Wnioski

Podsumowując należy podkreślić, iż przeprowadzone badania sugerują przydatność diagnostyczną wszystkich badanych parametrów, a zwłaszcza VEGF, w diagnostyce raka piersi, jednakże tylko w łącznej analizie z rutynowo stosowanym markerem CA 15-3 i MMP-9, jako nowy panel diagnostyczny.

Literatura

1. Kitamura T., Pollard J.W., *Therapeutic potential of chemokine signal inhibition for metastatic breast cancer*, Pharmacol Res., 100:266-270, 2015, doi:10.1016/j.phrs.2015.08.004.
2. Im N.K., Jang W.J., Jeong C.H., Jeong G.S., *Delphinidin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the NF- κ B activation through MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells*, [published correction appears in J Med Food. 2017 Apr;20(4):425], J Med Food, 17(8), 2014, s. 855-861, doi:10.1089/jmf.2013.3077.
3. Zhou R., Xu L., Ye M., Liao M., Du H., Chen H., *Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 through PI3K/AKT signaling pathways*, Horm Metab Res., 46(11), 2014, s. 753-760, doi:10.1055/s-0034-1376977.
4. Pittayapruerk P., Meephansan J., Prapapan O., Komine M., Ohtsuki M., *Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis*, Int J Mol Sci., 2016, 17(6):868, Published 2016 Jun 2, doi:10.3390/ijms17060868.
5. Venugopal A., UmaMaheswari T.N., *Expression of matrix metalloproteinase-9 in oral potentially malignant disorders: A systematic review*, J Oral Maxillofac Pathol., 20(3) 2016, s. 474-479, doi:10.4103/0973-029X.190951.
6. Gong L., Wu D., Zou J., *Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis*, Oncotarget., 7(14), 2016, 18458-18468, doi:10.18632/oncotarget.7607
7. Grzelczyk W.L., Szmraj J., Józefowicz-Korczyńska M., *The matrix metalloproteinase in larynx cancer*, Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016, 70(0), 1190-1197, Published 2016 Dec 8.
8. Dasari S., Wudayagiri R., Valluru L., *Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment*, Clin Chim Acta., 445, 2015, s. 7-11, doi:10.1016/j.cca.2015.03.005.
9. Yu D.C., Chen J., Ding Y.T., *Hypoxic and highly angiogenic non-tumor tissues surrounding hepatocellular carcinoma: the 'niche' of endothelial progenitor cells*, Int J Mol Sci, 11(8), 2010, s. 2901-2909, Published 2010 Aug 9, doi:10.3390/ijms11082901.
10. Sledge G.W.Jr., *VEGF-targeting therapy for breast cancer*, J Mammary Gland Biol Neoplasia, 10(4), 2005, s.319-323. doi:10.1007/s10911-006-9005-5.
11. DeCotiis C., Hu Y., Greenberg A.K., Huie M., Tsay J.C., Pass H., Goldberg J.D., Rom W.N., *Inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer in a CT-scan screening cohort: Background review of the literature*, Cancer Biomark, 16(2), 2016, 219-33.
12. Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitkowski M., *The role of metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer*, Postepy Hig Med Dosw., 62, 2008, s. 141-7.

13. Dembinska-Kieć A., Naskalski J.W., *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2009.
14. Swetha R., Gayen C., Kumar D., Singh T.D., Modi G., Singh S.K., *Biomolecular basis of matrix metallo proteinase-9 activity*, *Future Med Chem.*, 10(9), 2018, s. 1093-1112.
15. Winters S., Martin C., Murphy D., Shokar N.K., *Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening*, *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 151, 2017, s. 1-32.
16. Ławicki S., Głazewska E.K., Sobolewska M., Będkowska G.E., Szmitkowski M., *Plasma Levels and Diagnostic Utility of Macrophage Colony-Stimulating Factor, Matrix Metalloproteinase-9, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 as New Biomarkers of Breast Cancer*, *Ann Lab Med.*, 36(3), 2016, s. 223-9.
17. Liu Y.E., Wang M., Greene J., Su J., Ullrich S., Li H., Sheng S., Alexander P., Sang QA., Shi YE., *Preparation and Characterization of Recombinant Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4 (TIMP-4)*, *J Biol Chem.*, 272(33), 1997, s. 20479-83.
18. Kamińska J., *Rola i znaczenie cytokin u chorych na nowotwory złośliwe*, *Diagnostyka laboratoryjna*, 4, 2006, s. 403-413.
19. Lubowicka E., Gacuta E., Zajkowska M., Głazewska E.K., Przyłipiak A., Chrostek L., Zbucka-Krętowska M., Ławicki S., *The plasma levels and diagnostic utility of matrix metalloproteinase-9 and CA 125 in cervical cancer patients*, *Pol Merkur Lekarski*, 43(253), 2017, s. 10-14.
20. Zajkowska M., Zbucka-Krętowska M., Sidorkiewicz I., Lubowicka E., Będkowska G.E., Gacuta E., Szmitkowski M., Ławicki S., *Human Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinase 9, and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 and Their Applicability as Tumor Markers in Diagnoses of Cervical Cancer Based on ROC Analysis*, *Cancer Control*, 25(1), 2018, 1073274818789357.
21. Zajkowska M., Gacuta E., Kozłowska S., Lubowicka E., Głazewska E.K., Chrostek L., Szmitkowski M., Pawłowski P., Zbucka-Krętowska M., Ławicki S., *Diagnostic power of VEGF, MMP-9 and TIMP-1 in patients with breast cancer. A multivariate statistical analysis with ROC curve*, *Adv Med Sci.*, 64(1), 2018, s. 1-8.
22. Lubowicka E., Przyłipiak A., Zajkowska M., Piskór B.M., Malinowski P., Fiedorowicz W., Ławicki S., *Plasma Chemokine CCL2 and Its Receptor CCR2 Concentrations as Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer Patients*, *Biomed Res Int.*, 2018, 2124390.
23. Ławicki S., Zajkowska M., Głazewska E.K., Będkowska G.E., Szmitkowski M., *Plasma Levels and Diagnostic Utility of M-CSF, MMP-2 and its Inhibitor TIMP-2 in the Diagnostics of Breast Cancer Patients*, *Clin Lab*, 62(9), 2016, s. 1661-1669.
24. Ławicki S., Zajkowska M., Głazewska E.K., Będkowska G.E., Szmitkowski M., *Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-9, and TIMP-1 in the diagnosis of patients with breast cancer*, *Onco Targets Ther*, 9, 2016, s. 911-9.
25. Zajkowska M., Lubowicka E., Fiedorowicz W., Szmitkowski M., Jamiołkowski J., Ławicki S., *Human Plasma Levels of VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, their Soluble Receptor - VEGFR-2 and Applicability of these Parameters as Tumor Markers in the Diagnostics of Breast Cancer*, *Pathol Oncol Res.*, 2018.

Ocena mocy diagnostycznej cytokiny VEGF oraz metaloproteinazy MMP-9 w diagnostyce raka piersi

Streszczenie

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet i cechuje się wysoką oraz wciąż wzrastającą zachorowalnością i śmiertelnością, a obecna diagnostyka jest ciągle niedoskonała, dlatego też nowotwór ten wykrywany jest często w zaawansowanym stadium. Dlatego też obecnie poszukuje się nowych metod diagnostycznych, w tym markerów nowotworowych, które umożliwiłyby rozpoznanie tego raka w stadium małozaawansowanym, które cechuje się najlepszym rokowaniem. Do nowych kandydatów na markery raka piersi możemy zaliczyć między innymi cytokiny i metaloproteinazy (MMPs), dlatego też celem pracy była ocena mocy diagnostycznej VEGF i wybranej metaloproteinazy 9. (MMP-9). Badania wykonano w osoczu chorych na raka piersi w stadium małozaawansowanym, tj. w I i II stopniu zaawansowania raka. VEGF i MMP-9 oznaczono metodą immunoenzymatyczną (ELISA), CA 15-3 – metodą chemiluminescencyjną (CMIA). Moc diagnostyczną określono w oparciu o analizę pola pod krzywą ROC (AUC). Najwyższą mocą diagnostyczną w całej grupie badanej cechowały się oznaczenia VEGF, a wartości AUC dla MMP-9 wyraźnie wzrastały wraz z zaawansowaniem raka, a zwłaszcza w łącznej analizie obu cytokin z CA 15-3. Przeprowadzone badania sugerują przydatność diagnostyczną badanych parametrów w diagnostyce raka piersi, jednakże w łącznej analizie, jako nowy panel diagnostyczny (VEGF+MMP-9+CA 15-3).
Słowa kluczowe: MMP-9, VEGF, rak piersi, moc diagnostyczna, CA 15-3

Evaluation of the diagnostic power of cytokine VEGF and metalloproteinase MMP-9 in breast cancer management

Abstract

Breast cancer is the most common malignant neoplasm in women worldwide and is characterized by high and still increasing morbidity and mortality. Current diagnostics remains imperfect, therefore, this cancer is often detected at an advanced stage. Therefore, new diagnostic methods, including searches of tumor markers, are being sought that would enable the diagnosis of this cancer in a low-advanced stage, which is characterized by the best prognosis. Among the new candidates for breast cancer markers we can include molecular markers of carcinogenesis, cytokines and metalloproteinases (MMPs).

The aim of this study was to evaluate the diagnostic power of VEGF and selected MMP-9. The study was performed in the plasma of patients with breast cancer, i.e., stage I and II tumors. VEGF and MMP-9 were determined by immunoenzymatic method (ELISA), CA 15-3 - by chemiluminescent method (CMIA). The diagnostic power values were established by analyzing the area under the ROC curve (AUC).

VEGF assays had the highest diagnostic power, and the MMP-9's AUC values increased significantly with cancer progression, especially in a combined analysis of both cytokines with CA 15-3.

This study suggests the diagnostic utility of the studied parameters in the diagnosis of breast cancer, however in a combined analysis as a new diagnostic panel (VEGF+MMP-9+CA 15-3).

Keywords: MMP-9, VEGF, breast cancer, diagnostic power, CA 15-3

Contrast Enhanced MRI w tkance nowotworowej piersi *in vitro*

1. Wprowadzenie

Rak piersi jest nieustannie przedmiotem wielu badań naukowych, głównie ze względu na bardzo dużą częstość występowania. Ciągłe poszukuje się nowych, bardziej skutecznych, czulszych metod wczesnego wykrywania go, aby móc zapewnić pacjentkom (ale także i pacjentom, bo rak piersi również dotyka mężczyzn) szanse na całkowite wyleczenie. Jednocześnie poszukuje się alternatywnych metod leczenia, które pozwoliłyby uniknąć okaleczających operacji niosących za sobą znaczne obniżenie komfortu życia.

W pracy przedstawione zostały podstawy teoretyczne dotyczące powstawania nowotworów piersi, ich klasyfikacja oraz metody najczęściej stosowane w diagnostyce raka piersi. Skupiono się również na fizycznych podstawach obrazowania metodą rezonansu magnetycznego oraz zjawisk towarzyszących badaniu. Przedstawiono metody polegające na kontrastowaniu badań przy różnych czasach relaksacji T_1 i T_2 oraz ich zastosowania.

Jednym z dwóch problemów badawczych jest charakterystyka parametrów fizykochemicznych ognisk komórek rakowych w wycinku tkankowym raka piersi metodą obrazowego rezonansu magnetycznego. Drugi to różnicowanie obszaru komórek zdrowych i chorych co stanowi istotną procedurę chirurgiczną w zapobieganiu wycinania tkanek zdrowych. Badanie to może przyczynić się do poprawy wykrywalności nowotworów złośliwych piersi co ułatwi prawidłową ocenę stopnia zaawansowania choroby i pozwoli podjąć właściwą decyzję co do planowanej metody terapeutycznej.

2. Nowotwór piersi

Najczęstszą chorobą nowotworową występującą u kobiet jest rak piersi. W 2018 roku, według danych Breast Cancer Research Foundation na całym świecie zdiagnozowano prawie 2 miliony nowych przypadków raka piersi. Krajowy Rejestr Narodowy podaje, iż w Polsce, w 2017 roku, na raka piersi zachorowało 18 529 kobiet. U mężczyzn ta liczba wyniosła 138. Rak piersi w Polsce jest drugą najczęstszą, zaraz po raku płuca, przyczyną zgonów nowotworowych wśród kobiet. W 2017 roku, liczba zgonów wyniosła 6670 [1-3]. W latach późniejszych w literaturze brak porównywalnych zestawień. Wykonanie porównań nie wchodzi w zakres tej pracy, dlatego podaję rok 2017.

Dokładne przyczyny zachorowań w większości przypadków są nieznane. Istnieje jednak kilka czynników podwyższających ryzyko wystąpienia nowotworów piersi. Do najważniejszych czynników ryzyka można zaliczyć: płeć żeńską, rosnący wiek, nosi-

¹ szpunarmag@gmail.com, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, <https://www.ur.edu.pl/kolegia/kolegium-nauk-przyrodniczych>.

² mcholewa@ur.edu.pl, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, <https://www.ur.edu.pl/kolegia/kolegium-nauk-przyrodniczych>.

³ dbartusik-aebisher@ur.edu.pl, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, <https://www.ur.edu.pl/kolegia/kolegium-nauk-medycznych>.

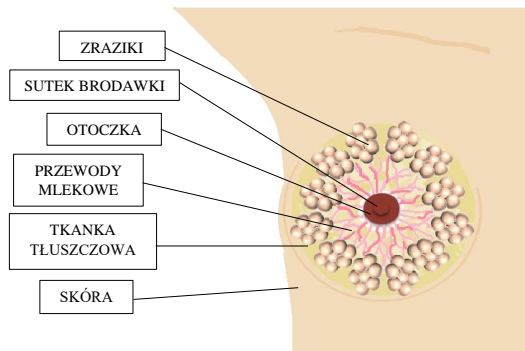
cielstwo mutacji niektórych genów (przede wszystkim BRCA1 i BRCA2), rodzinne występowanie raka piersi, późny wiek pierwszego porodu lub jego brak, długotrwałe działanie estrogenów (wczesna pierwsza miesiączka i późno występująca ostatnia miesiączka), długotrwała hormonalna terapia zastępcza, nadwaga i otyłość, alkohol, narażenie na działanie promieniowania jonizującego i niektóre łagodne choroby rozrostowe piersi występujące w przeszłości [2-5].

Diagnostyka dotycząca raka piersi jest bardzo rozbudowana, istnieje wiele metod pozwalających w różnym stopniu zobrazować ogniska nowotworowe. Proces diagnostyki zaczyna się od badań lekarskich, następnie wykonywane są badania obrazowe i biopsje przy podejrzeniu raka piersi. W ramach rutynowego badania lekarskiego wykonuje się badanie palpacyjne, polegające na dotykowym zbadaniu piersi pod kątem zgrubień, twardości i innych łatwych do rozpoznania zmian. Do najbardziej skutecznych metod obrazowych pozwalających wykryć raka piersi we wczesnym stadium są przesiewowe badania mammograficzne (MMG). Badania te pozwalają w znacznym stopniu ograniczyć umieralność związaną z rakiem piersi poprzez wcześniejsze rozpoznanie choroby i możliwość jej wyleczenia we wczesnej fazie. Badanie MMG wykonuje się w dwóch projekcjach: skośnej i górno-dolnej, dzięki temu możliwe jest dokładne zobrazowanie piersi i ewentualnych zmian w nich występujących. Duże znaczenie dla tego typu badania ma ogólnodostępność dla kobiet z większym ryzykiem zachorowalności [2, 4-6].

Wczesne zdiagnozowanie raka piersi i jego leczenie prowadzi do całkowitego wyleczenia, aktualnie nawet zaawansowane stadia nowotworowe można wyleczyć lub przynajmniej przedłużyć życie chorych oraz poprawić jakość ich życia.

2.1. Powstawanie nowotworu

Dopuszcza się do publikacji opracowania o charakterze przeglądowym. W budowie anatomicznej piersi kobiety (rys. 1) możemy wyróżnić tkanki tłuszczowe, tkanki gruczołowe, naczynia krwionośne i limfatyczne, nerwy oraz przewody mleczne. Jej głównymi elementami są płaty w ilości 15-20, nazywane inaczej zrazikami – są to skupiska gruczołów pęcherzykowych produkujących mleko. Płaty połączone są przewodami mlecznymi z zatoką mleczną i w końcowym etapie na zewnątrz brodawki sutkowej. Tkanka tłuszczowa oraz włóknista wypełniają przestrzeń pomiędzy zrazikami i ich przewodami. Cały gruczoł piersiowy otoczony jest tkanką tłuszczową i mięśniową, które nadają piersi kształt i gęstość [7-9].



Rysunek 1. Budowa anatomiczna kobiecej piersi [wykonanie własne]

W trakcie rozwoju i życia prawidłowe komórki piersi rosną dzielą się i tworzą nowe komórki kiedy zaistnieje taka potrzeba. Przykładem powstawania nowych komórek może być zamiana starzejących i obumierających komórek na nowe. Zmiana nowotworowa powstaje, gdy podczas procesu tworzenia komórek skutkiem błędu genetycznego dzielą się one w niekontrolowany sposób i nie różnicują się w potrzebne komórki oraz gdy stare lub uszkodzone nie obumierają. Na brak kontroli w podziałach komórkowych wpływ mają mutacje genów kodów białek biorących udział w procesie kariokinezy (cykl komórkowy). Nagromadzenie niepotrzebnych organizmowi komórek prowadzi do powstania masy tkanek, którą nazywa się nowotworem lub guzem. Nowotworowe w przeciwieństwie do komórek prawidłowych nie posiadają procesu samoniszczenia, nie odbierają lub źle interpretują sygnały wytwarzane przez organizm nie reagując na nie [7-9].

Nowotwory mogą być łagodne – wtedy nie nazywamy ich rakiem lub złośliwe i wtedy mamy do czynienia z rakiem. Łagodne nowotwory zazwyczaj są niegroźne, rzadko zajmują otaczające tkanki, nie mają przerzutów i po usunięciu zwykle nie odrastają. Nowotwory złośliwe mogą stać się zagrożeniem dla życia. Rak piersi rozwija się miejscowo, ale ma skłonność do przerzutów do węzłów chłonnych i odległych narządów oraz do naciekania na tkanki znajdujące się w pobliżu. Najczęstszymi węzłami chłonnymi będącymi celem przerzutów są węzły pachowe po stronie zmiany nowotworowej. Następnie zajmowane są zmostkowe węzły chłonne oraz węzły nadobojczykowe i podobojczykowe. Rak piersi często jest operowalny, ale niestety u niektórych chorych może odrosnąć. Rozprzestrzenianie się raka piersi do dalszych części ciała wiąże się z powstaniem kolejnych ognisk nowotworowych, niezależnie jednak od ich umiejscowienia są to przerzuty nowotworu piersi i powinny być leczone jak pierwotny rak piersi [7-9].

Nowotwory piersi najczęściej wywodzą się z przewodów mlekowych – rak przewodowy, około 70-75% chorych kobiet posiada właśnie ten typ nowotworu. Powstaje z komórek znajdujących się w przewodach. Kolejnym typem jest rak zrazikowy, dotyka on około 10-15% kobiet, wywodzi się on z gruczołów mleknych zrazików. Kolejne typy nowotworów występują stosunkowo rzadko. Niektóre z nich powstają jako rak mieszany – przewodowo-zrazikowy lub z innych tkanek, z których składa się pierś na przykład z tkanki mięśniowej – mięsak [7-9].

2.2. Klasyfikacja raka piersi

Klinicznie raka piersi można podzielić na dwie grupy: przedinwazyjny – *in situ* czyli zmiany nowotworowe bez właściwości naciekających oraz inwazyjny – naciekający [4, 7].

Przewodowy rak przedinwazyjny (DCIS) charakteryzuje się występowaniem tylko w przewodach mlekowych, nie powodując przerzutów do zdrowych tkanek. Jego wykrywanie wzrasta wraz z lepszą i szerszą dostępnością do mammograficznych badań przesiewowych. W DCIS możemy wskazać cztery podgrupy dzielące go pod względem budowy i rozrostu: lity, sitowaty, mikrobrodawkowaty oraz brodawkowaty. Określa się także stopień błędów jąder komórkowych i występowania martwicy. Przedinwazyjny rak zrazikowy (LCIS) zajmuje końcowe odcinki w układzie zrazikowo-pęcherzykowym. Nie jest on jednoznacznie określany jako nowotwór złośliwy, jednak może wiązać się z ryzykiem przekształcenia się w raka o typie inwazyjnym lub jego wytworzenie

w przyszłości. Jest on zazwyczaj wykrywany przypadkowo podczas niezwiązanych z podejrzeniem nowotworowym badań diagnostycznych. LCIS ma jednolity obraz komórek [4, 7, 9].

Naciekającym rakiem nazywa się rak piersi, który rozrósł się poza przewody – naciekający rak przewodowy i poza zraziki – naciekający zrazikowy rak piersi. Istnieją również rzadziej występujące podtypy histopatologiczne naciekającego raka piersi: rak cewkowy (tabularny), rak rdzeniasty, rak śluzowy i rak płaskonabłonkowy. Naciekający rak przewodowy charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem komórek nowotworowych oraz występowaniem struktur cewkowych lub gruczołowych. Można wyróżnić trzy stopnie złośliwości naciekającego raka: niski, pośredni i wysoki. Nowotwory te naciekają na tkanki otaczające gruczoł piersiowy, naczynia krwionośne i limfatyczne [4, 7, 9].

3. Diagnostyka raka piersi

Do wstępnych badań diagnostycznych u chorych na raka piersi zaliczamy badania podmiotowe i przedmiotowe. Podmiotowe badanie, czyli wywiad lekarski. Dotyczy rozmowy i wstępnego wywiadu na temat dolegliwości i zmian w obrębie piersi, przebytych chorób piersi oraz występowania nowotworów złośliwych w rodzinie. Istotnymi informacjami zbieranymi podczas wywiadu powinna być też historia miesiączkowania, historia przebytych ciąż oraz informacje dotyczące zażywania leków hormonalnych. Przedmiotowe badanie, czyli badanie fizykalne skupia się na ocenie stanu sprawności, pomiarze masy ciała i wzrostu, ocenę narządów oraz badanie ginekologiczne. Zawiera dokładne badanie palpacyjne obu piersi w pionowej i poziomej pozycji tułowia, ocenę wyglądu skóry i brodawek oraz ich symetrii, ocenę umiejscowienia guza oraz jego ruchomość. Osoba przeprowadzająca badanie powinna ocenić pachowe i nadobojczykowe węzły chłonne pod kątem cech charakteryzujących występowanie ewentualnych przerzutów [2, 4, 6].

Duże znaczenie w diagnostyce mają badania obrazowe. Mammografia (MMG) jest badaniem wykorzystującym promienie rentgenowskie do zobrazowania struktury piersi. Jest ona podstawową metodą diagnostyczną przy badaniach przesiewowych. Badanie polega na wykonaniu zdjęć piersi podczas ucisku przez dwie płyty, w dwóch projekcjach: górno-dolnej oraz skośnej. Stosując MMG możliwa jest około 85% wykrywalność zmian nowotworowych, zakres mieści się w przedziale 50-90%. Niższa wykrywalność jest u kobiet młodych, z wysoką gęstością piersi. Mammografia pozwala na zobrazowanie mikrozwapnień [2, 4, 6].

Ultrasonografia (USG) to technika wykorzystująca ultradźwięki – fale dźwiękowe o wysokiej częstotliwości do obrazowania tkanek i narządów. Badanie USG piersi uzupełniane jest obrazowaniem węzłów chłonnych pach. Jest ono często dopełnieniem standardowego badania mammograficznego. Stosowane jest do różnicowania guzków litych i torbieli, ponieważ cechuje się najlepszą dokładnością diagnostyczną. Ultrasonografia najczęściej wykonywana jest u młodych kobiet między 20. a 25. rokiem życia, które cechują się dużą gęstością piersi oraz u kobiet w ciąży. Trudność występuje przy ocenie dużych piersi, które gorzej uwidaczniają się przy użyciu ultradźwięków niż mniejsze piersi. USG uznawane jest za w pełni bezpieczne i nieinwazyjne badanie, w którym nie stosuje się promieniowania rentgenowskiego [2, 4, 6].

Rezonans magnetyczny (MRI) jest uznawany za najczulszą technikę obrazowania. Wykorzystuje pole magnetyczne oraz fale radiowe. Obrazowanie w wysokiej

przestrzennej i czasowej rozdzielczości tkankowej pozwala na dokładne przedstawienie struktury morfologicznej piersi, występujące zmiany patologiczne i nieprawidłowości. Zalecane jest jako badanie przesiewowe dla kobiet obciążonych zachorowalnością na raka piersi w rodzinie, zwłaszcza bliskiej – matka lub siostra, z mutacjami genów BRCA1 i BRCA2 oraz u kobiet poniżej 30 roku życia, które przeszły radioterapię klatki piersiowej. Technika ta używana jest przy poszukiwaniu pierwotnego ogniska, kiedy występują przerzuty w pachowych węzłach chłonnych. MRI ma również zastosowanie w kontroli zmiany nowotworowej w trakcie leczenia oraz w planowaniu dalszej terapii [2, 4, 6].

Ważna jest również metoda opisywania badanych obrazów. Stworzony przez Amerykańskie Towarzystwo Radiologiczne (ACR) system oceny „Breast Imaging Reporting and Data System” – „BIRADS”, powinien być standardem dla wszystkich opisów mammograficznych, a także ultrasonografii oraz badania z użyciem rezonansu magnetycznego. W badaniu MRI powinna być również informacja o wzmocnieniu kontrastowym tkanki gruczołowej podścieliska [2]. Aby ustalić stopień wiarygodności uzyskanego wyniku istotne jest zawarcie informacji o budowie piersi w opisie badania obrazowego. System BIRADS utworzony przez ACR wyróżnia cztery typy budowy piersi (Tabela 1.)

Tabela 1. System BIRADS zawierający cztery typy budowy piersi, opracowany przez Amerykańskie Towarzystwo Radiologiczne

TYP 1.	TYP 2.	TYP 3.	TYP 4.
budowa tłuszczowa (tkanka tłuszczowa zajmuje > 75% piersi)	budowa tłuszczowo-gruczołowa z rozproszonymi obszarami tkanki włóknisto-gruczołowej	budowa gruczołowo-tłuszczowa (tkanka gruczołowa stanowi 51–75% piersi; czułość MMG obniżona);	budowa gruczołowa (tkanka gruczołowa stanowi > 75% piersi; czułość MMG wyraźnie obniżona)

Źródło: opracowanie własne na podstawie [2]

4. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

Zjawisko rezonansu magnetycznego opiera się na mechanice kwantowej. Podstawą do obrazowania metodą jądrowego rezonansu są magnetyczne właściwości jąder atomowych. Najliczniejszym atomem ludzkiego ciała jest wodór, dlatego też jądra wodoru są najistotniejsze w obrazowaniu. Każde jądro z nieparzystą liczbą protonów i neutronów posiada moment pędu nazywany spinem – jest to wewnętrzna właściwość rotacji wokół własnej osi. Jądra posiadające spin stają się źródłem pola magnetycznego. Proton posiada również masę i ładunek, co razem daje mu właściwości: obrotowy moment siły i moment magnetyczny [10, 11].

Moment magnetyczny jądra proporcjonalny jest do swojego spinu:

$$\mu = \gamma \cdot s \quad (1)$$

gdzie: μ – moment magnetyczny jądra, γ – stała magnetyczna, s – spin jądra.

Kierunki rotacji w zewnętrznym polu magnetycznym o indukcji B układają się wzdłuż linii pola, a wektor momentu magnetycznego μ zaczyna wykonywać ruch obrotowy w kierunku pola. Rotację określa się mianem precesji (ruchu wirowego)

Larmora, a jej częstotliwość f_L zależnie od wartości B indukcji magnetycznej mierzonej w Teslach [T], opisywana jest przez równanie częstości precesji Larmora, zgodnie ze wzorem:

$$f_L = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (2)$$

gdzie: f_L – częstotliwość precesji, γ – stała magnetyczna, B – indukcja pola magnetycznego.

Magnetyzacja protonów jest za słaba i ułożona w tym samym kierunku co pole magnetyczne, dlatego nie ma możliwości zmierzenia magnetyzacji protonów. Do zmierzenia magnetyzmu spinu potrzebna jest zmiana ich kierunku. Impuls częstotliwości radiowej nazywany impulsem RF (RF, *Radio Frequency*) wysłany w kierunku protonów zmienia stan energetyczny spinów, jego działanie jest krótkotrwałe [10, 11].

Impuls ten musi mieć określoną częstotliwość równą częstotliwości precesji Larmora, przy indukcji 1.5 Tesla wynosi ona 63,8 MHz (dla porównania – pole Ziemi wynosi 1 kHz). Zjawisko to, polegające na wchłonięciu impulsu o ściśle określonej częstotliwości, nazywane jest rezonansem. Protony, które pochłonęły energię impulsu o częstotliwości Larmora zmieniają kierunek rotacji (flip) i wychylenie o 90°. Po wyłączeniu impulsu następuje powrót do stanu równowagi. Protony posiadają dwa rodzaje magnetyzacji: podłużną i poprzeczną [10, 11].

Proces w którym tracona jest energia impulsu i następuje powrót do stanu pierwotnego zanim protony osiągną stan wyjściowy, nazywamy relaksacją. Istnieją dwa czasy relaksacji: relaksacja podłużna (T1) oraz relaksacja poprzeczna (T2).

Relaksacja podłużna (T1) polega na wymianie energii między jądrami w stanie wzbudzenia oraz ich otoczeniem, określanym jako sieć. W związku z tym zjawiskiem relaksacja podłużna nosi również nazwę relaksacji spin-sieć. Czas T1 określany jest jako czas, w którym 63% magnetyzacji początkowej zostanie odbudowane i czas potrzebny by magnetyzacja podłużna wróciła do wartości początkowej [10, 11].

Impuls powoduje zanik magnetyzacji podłużnej i jest odpowiedzialny za wzrost magnetyzacji poprzecznej. Relaksacja poprzeczna (T2) to czas, w którym tracona jest spójność między oddziałującymi na siebie spinami oraz ich powrót do równowagi termodynamicznej, czyli czas zaniku magnetyzacji poprzecznej do zera – określana jako relaksacja spin-spin. T2 jest skutkiem powrotu cząstek do ustawienia równoległego lub antyrównoległego w polu magnetycznym [10, 11].

Po ustaniu impulsu radiowego magnetyzacja poprzeczna obniża się i zanika oraz wzrasta magnetyzacja podłużna. Relaksacje są dwoma różnymi zjawiskami co wpływa na to, że ich wartość jest inna dla różnych tkanek.

Czas relaksacji T1 jest wydłużony dla istoty szarej, płynu mózgowo-rdzeniowego, mięśni, łąkoteczek oraz powierzchni stawowych – te struktury w obrazie MRI są ciemne. Natomiast istota biała, więzadła i tkanka tłuszczowa mają krótki czas relaksacji podłużnej, dlatego uwidaczniają się jako jasne a nawet białe struktury.

Wydłużony czas relaksacji poprzecznej T2 można zaobserwować dla istoty białej, mięśni oraz krążków międzykręgowych co obrazuje je jako ciemne powierzchnie. Krótki czas T2 ma płyn mózgowo-rdzeniowy, istota szara i rdzeń kręgowy – są jasne na obrazach MRI [10, 11].

4.1. Otrzymywanie obrazu w MRI

Otrzymywanie obrazu w MRI jest efektem rejestracji zmian wektorów magnetyzacji, które odpowiednio wpływają na zmiany energii. Cewki odbiorcze wykrywają sygnał pochodzący od pobudzonych impulsem RF protonów z konkretnej warstwy ciała pacjenta. Jasność każdego woksela zależy od magnetyzacji poprzecznej, która pochodzi z danego woksela. W celu otrzymania sygnału z różnych warstw pacjenta stosuje się gradienty pola magnetycznego. Różnicują one przestrzennie i czasowo pole magnetyczne we wszystkich jego punktach. W MRI wykorzystuje się trzy typy pól gradientowych wytwarzanych przez konkretne cewki gradientowe, przez które przepływa prąd o specyficznym natężeniu. Znajdują się one wewnątrz magnesu po jego obwodzie. Wyróżniamy: gradient wyboru warstwy, gradient kodujący częstotliwość oraz gradient kodujący fazę, który określa precesję spinów. Nieznaczna zmiana natężenia pola magnetycznego pozwala na uzyskanie innej częstotliwości precesji, która zależna jest od natężenia pola magnetycznego. Dokonując analizy częstotliwości tego sygnału możliwe jest znalezienie jego źródła [10, 11].

Analiza komputerowa wartości sygnału i rekonstrukcja obrazu zachodzi przy zastosowaniu transformaty Fouriera. Jest to funkcja matematyczna, która przetwarza sygnał cyfrowy w obraz medyczny.

Parametry takie jak czas echa (TE) i czas repetycji (TR) są również istotne podczas obrazowania rezonansem magnetycznym. Czas echa jest to odstęp czasu pomiędzy działaniem impulsu RF a sygnałem powrotnym (sygnałem echa) – pomiarem. Czas repetycji to czas, który upływa między dwoma kolejnymi impulsami, czyli powtórzeniami sekwencji [13, 16].

W zależności od czasu jaki upłynie między pomiarem sygnału TE lub wysłaniem kolejnych impulsów TR otrzymuje się obrazy T1-zależne gdy TE trwa do około 20 ms a TR do 700 ms lub T2-zależne gdzie TE trwa powyżej 60-80 ms a TR od 2000 ms. Można więc wyróżnić dwa rodzaje kontrastów (obrazów): T1 – jak szybko protony ulegają relaksacji oraz T2 – jak szybko zmniejszony zostaje sygnał. Jest również trzeci kontrast nazywany „Gęstością Protonów” i zależy on od ilości pobudzonych protonów (tab. 2) [10, 11].

Tabela 2. Zastosowanie czasu echa i czasu repetycji przy różnej długości ich trwania

	TE krótkie	TE długie
TR krótkie	T_1	bez zastosowania
TR długie	Gęstość Protonów	T_2

Źródło: opracowanie własne na podstawie [11]

5. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

Podczas wykonywania części badań metodą rezonansu magnetycznego potrzebne jest podanie dożylnie środka kontrastowego. Mechanizm środków kontrastowych polega na gromadzeniu się w danych tkankach powodując wzmocnienie lub osłabienie odbieranego sygnału. Pozwala to na rozróżnienie tkanek i narządów, w szczególności zobrazowanie różnic między tkankami patologicznymi i prawidłowymi. Zastosowanie środków kontrastowych wpływa na zmianę czasu relaksacji podłużnej lub poprzecznej protonów. Zależnie od stosowanej sekwencji pomiarowej tkanka w której kumulowany

jest środek kontrastowy może wykazywać hiperintensywność sygnału (są to wtedy obrazy T_1 -zależne) lub hipointensywność (obrazy T_2 -zależne) Środki kontrastowe można podzielić na podstawie ich właściwości magnetycznych na pozytywne i negatywne [12, 13].

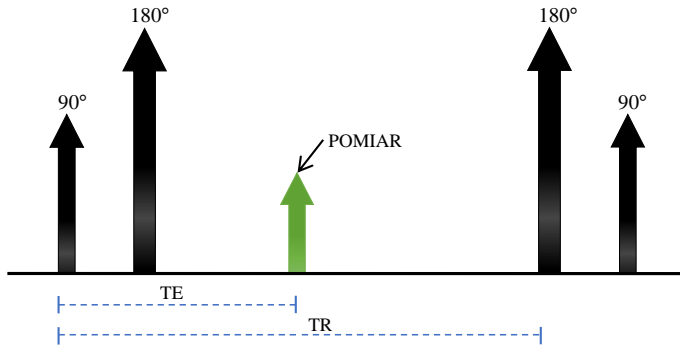
Do pozytywnych środków cieniujących zalicza się paramagnetyki, które wpływają na skrócenie czasu relaksacji T_1 . Wzmacniają one sygnał pochodzący z miejsca, które wypełniają. Paramagnetyki są substancjami dobrze rozpuszczalnymi w wodzie, które wchłaniane są z układu krążenia i przewodu pokarmowego do przestrzeni międzykomórkowych, następnie wydalane przez nerki w ekspresowym tempie. Najczęściej stosowanym paramagnetykiem do środków kontrastowych jest gadolin – należący do lantanowców, pierwiastek ziem rzadkich. Jego czysta postać jest jednak szkodliwa, dlatego stosuje się go w postaci związków chelatujących zawierających jony gadolinu. Podawany w taki sposób traci swoje toksyczne właściwości. Pozytywne środki kontrastowe można podzielić na trzy podstawowe grupy: środki zewnątrzkomórkowe, wewnątrzkomórkowe oraz do badania przewodu pokarmowego. Środki zewnątrzkomórkowe stosowane są do badań oceniających przepływ tkankowy. Zgodnie z nazwą działają one na zasadzie swobodnego przepływu – perfuzji przez narządy, nie wnikają do komórek, przeciwnie do wewnątrzkomórkowych środków. Ta druga grupa wiąże się z białkami wnikając do komórek. Są charakterystyczne dla konkretnych typów komórek, takich jak: hepatocyty (komórki wątrobowe), komórki nadnercza czy tkanki guza. Mają dobre zastosowanie w diagnostyce guzów, zmian niedokrwiennych i zapalnych oraz przy określaniu swobodnej perfuzji tkankowej. Przy stosowaniu pozytywnych środków cieniujących bardzo rzadko można zaobserwować skutki uboczne, a jeżeli już występują to są mało nasilone – zazwyczaj bóle głowy lub uderzenia gorąca [13, 14].

Negatywne środki kontrastowe skracają czas T_2 osłabiając intensywność sygnału pochodzącego z tkanki w której się znajdują. Na obrazie tkanka z kontrastem będzie ciemniejsza w stosunku do otoczenia. Tymi środkami nazywane są superparamagnetyki oraz ferromagnetyki na bazie żelaza. Podział środków negatywnych jest analogiczny do pozytywnych: zewnątrzkomórkowe, wewnątrzkomórkowe oraz do badania przewodu pokarmowego. Często diagnozowane są z zastosowaniem tych środków węzły chłonne, wątroba czy antygeny. Popularnym superparamagnetykiem jest magnetyt – Fe_3O_4 , jest on podawany doustnie lub dożylnie, najczęściej w obrazowaniu wątroby. Komórki Kupffera wychwytyują podany kontrast w różnym stopniu dla zdrowej i zmienionej tkanki, w efekcie pozwala na różnicowanie zmian ogniskowych w wątrobie. Negatywne środki mają swoje zastosowanie również przy doustnym cieniowaniu przewodu pokarmowego, zwiększając kontrast między światłem przewodu a otoczeniem. Związki dysprozu stosowane są do diagnostyki przy niedokrwieniu serca lub mózgu [13].

6. Pomiaru czasów relaksacji MRI

Sekwencje służące do pomiaru sygnału można uzyskać poprzez kombinację impulsów 90° i 180° .

Sekwencja SPIN ECHO (SE)



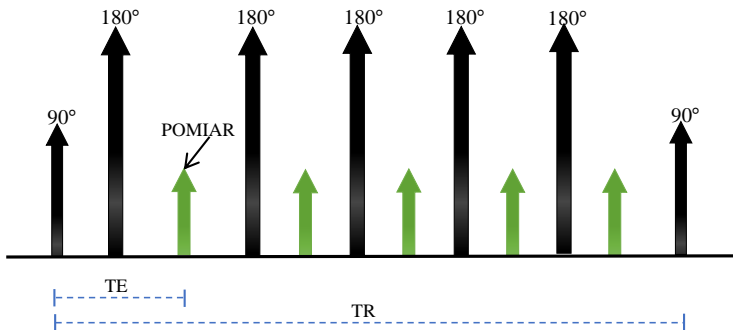
Rysunek 2. Schemat sekwencji Spin Echo opracowanie własne na podstawie [11]

Przebieg sekwencji Spin Echo:

- Wysyłany jest impuls pobudzający 90° ;
- Następnie impuls odwracający 180° ;
- Po upływie czasu echa (TE) wykonywany jest pomiar sygnału;
- Kiedy minie czas repetycji (TR) wysyłany jest następny impuls pobudzający.

Jest to bardzo często wykorzystywana sekwencja do badania głównie układu kostnego, układu mięśniowego oraz głowy [11].

Sekwencja FAST SPIN ECHO (FSE)

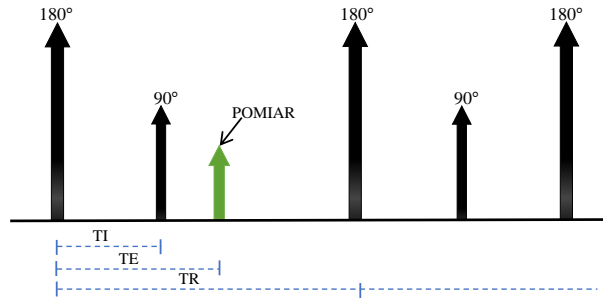


Rysunek 3. Schemat sekwencji Fast Spin Echo opracowanie własne na podstawie [11]

Przebieg sekwencji Fast Spin Echo:

- Wysyłany jest impuls pobudzający 90° ;
- Następnie impuls odwracający 180° ;
- Po upływie czasu echa (TE) wykonywany jest pomiar sygnału, kolejno wysyłane jest kilka impulsów 180° i pomiar sygnału wykonywany jest kilka razy do zakończenia czasu TR;
- Kiedy minie czas repetycji (TR) wysyłany jest następny impuls pobudzający 90° [11].

Sekwencja STIR (INVERSION RECOVERY)



Rysunek 4. Schemat sekwencji STIR opracowanie własne na podstawie [11]

Przebieg sekwencji STIR:

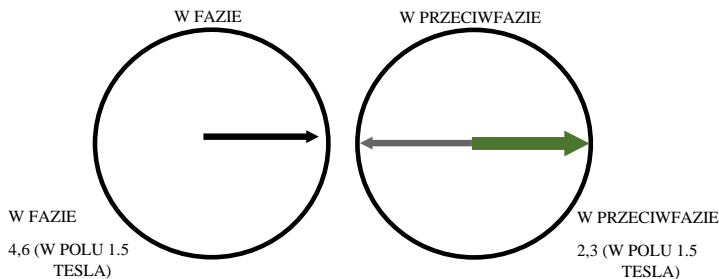
- Wysyłany jest impuls odwracający 180° ;
- Następnie po upływie czasu TI (zależnego od rodzaju tkanki i pola magnetycznego) wysyłany jest impuls pobudzający 90° ;
- Po upływie czasu echa (TE) wykonywany jest pomiar sygnału;
- Kiedy minie czas repetycji (TR) wysyłany jest następny impuls odwracający.

Sekwencja STIR (ang. *Short Tau Inversion Recovery*) jest szczególnie przydatna do obrazowania tkanek miękkich, korzystając z niej można wyłączyć sygnał pochodzący od niektórych tkanek. Przykładowo, chcąc wyłączyć sygnał pochodzący od tłuszczu czas TI w polu magnetycznym 1.5 Tesla wynosi 150 ms. Po tym czasie protony tłuszczu są na takim poziomie zrelaksowania, że posiadają relaksację poprzeczną. Po zastosowaniu impulsu 90° magnetyzacja zostaje kolejny raz odwrócona i wykonując pomiar po czasie TE – tłuszcz nie wysyła swojego sygnału. Na obrazach tłuszcz jest ciemny [11].

Sekwencja FLAIR

Sekwencja FLAIR (ang. *Fluid Attenuated Inversion Recovery*) zależna jest od czasu relaksacji poprzecznej T2. Obszary posiadające dużą zawartość płynów obrazowane są w jasnych odcieniach, obszary z małą ilością wody – w ciemnych. Pierwszy impuls – prepuls wysyłany jest 2000 ms przed typowym impulsem obrazującym. Sekwencja ta wykorzystywana jest najczęściej do obrazowania i oceny zmian wewnątrzczaszkowych oraz chorób demielinizacyjnych [10].

Sekwencje GRADIENT ECHO (GE)



Rysunek 5. Schemat sekwencji GRADIENT ECHO opracowanie własne na podstawie [11]

Przebieg sekwencji GRADIENT ECHO:

- Wysyłany jest impuls pobudzający 90° ;
- Następnie przełączane są bieguny gradientów powodujące zmianę kierunku protonów (daje to możliwość stosowania niższych kątów wychylenia spinów protonów);
- Zależnie od długości trwania czasu echa (TE) protony wody i tłuszczu mają takie same lub przeciwne fazy. Sygnał, który wysyłają jest sumowany (w fazie – *in phase*) lub odejmowany (w przeciwfazie – *out phase*).

W sekwencjach gradientowych impuls odwracający 180° nie jest wykorzystywany. Powoduje to niewyrównywanie się niejednorodności pola magnetycznego i wpływ zewnętrznego pola na czas relaksacji poprzecznej T2, który w sekwencjach oznaczany jest jako T2* – zawierający zależności od otaczających czynników [11].

W tych sekwencjach występuje również zjawisko chemical shift (z ang. przesunięcie chemiczne), jest wynikiem wpływu niejednorodności zewnętrznego pola magnetycznego. Inną nazwą tego zjawiska jest efekt opposed phase. Objawia się on na obrazach jako ciemne kontury organów. Ma to pozytywny wpływ na obrazowanie m.in. nadnerczy, które w innych sekwencjach są słabo widoczne, jednak może powodować artefakty utrudniające prawidłową ocenę obrazów. Sekwencje GE są szybkie i mniej podatne na artefakty od organów, które się poruszają. Najczęstsze zastosowanie mają w badaniu jamy brzusznej, klatki piersiowej i angiografii.

Zależność kontrastu obrazu T1 i T2* nie zależy od TE i TR, tylko od flip angle – kąta odchylenia namagnesowania. Wychylenie protonów poniżej kąta 50° skutkuje powstaniem obrazów T1-zależnych, jeżeli powyżej 50° to otrzymywane są obrazy T2* zależne [11].

7. Badania

Badania przeprowadzone zostały na nieutralizowanych przez formalinę fragmentach tkankowych. Wykorzystany został rezonans magnetyczny o polu 1.5 Tesla model Optima MR360 firmy General Electric Healthcare oraz dedykowane cewki gradientowe, nadawczo-odbiorcze pracujące przy zadanej częstotliwości. Urządzenie działało pod wersją oprogramowania SV23.

Badania na tkankach ludzkich uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie. Praca wykonana została zgodnie z Uchwałą Nr 11/11/2018 Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim z dnia 08/11/2018 „Ewaluacja diagnostyczna tkanki nowotworowej raka piersi przy zastosowaniu czasów relaksacji MRI *in vivo* i *in vitro* oraz terapii fotodynamicznej *in vitro*”

W pierwszym etapie wyznaczono relaksację podłużną i poprzeczną, co pozwoliło na charakterystykę badanej próbki. Na podstawie otrzymanego sygnału cyfrowego i rekonstrukcji obrazu, po zastosowaniu transformaty Fouriera otrzymano materiał do analizy. Użyto aplikacji pakietu oprogramowania VOLUME VIEWER na stacji roboczej AV4.6 (General Electric Healthcare) do pomiaru intensywności sygnału MR. Wartości czasu relaksacji T1 i T2 obliczono stosując nieliniowe korekty krzywych opisujących narastanie sygnału MR (dla T1) i utratę sygnału (dla T2). Kolejnym etapem była analiza danych, w której dokonano dokładnej oceny otrzymanych wyników, w celu wyznaczenia czasów relaksacji T1 i T2 w badanych próbkach. W kolejnym etapie, pod mikroskopem, oceniony został preparat histopatologiczny wykonany z prze-

badanego wycinka raka piersi. Wycinek zawierał komórki raka piersi oraz tkankę niezmienną nowotworowo. W ostatniej fazie eksperymentu zmiany widoczne w badaniu MRI zostały skorelowane z obrazem histopatologicznym w celu odnalezienia ewentualnych korelacji.

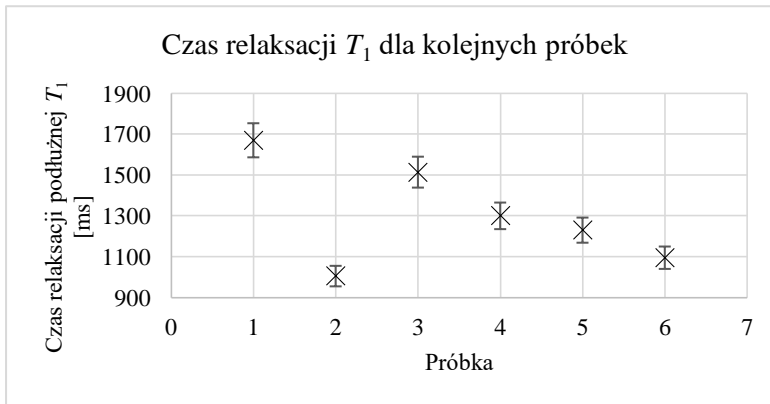
Podczas planowanych badań bazowano na zdobytej wiedzy i doświadczeniu w badaniach metodą rezonansu magnetycznego, jak również wyznaczaniu czasów relaksacji T1 i T2 w fragmentach tkankowych. Zwrócono uwagę na manewrowanie parametrami czasu echa (TE) i czasu repetycji (TR) oraz na starannym dobraniu wartości wyjściowych oraz kroku pomiarowego tak, aby uzyskać wiarygodne wyniki w jak najkorzystniejszym czasie. Kolejnym etapem była obróbka danych, w której wykonano analizę statystyczną i wyznaczono czasy relaksacji T1, T2 oraz mapy tych czasów w badanych wycinkach z raka piersi.

7.1. Wyniki pomiarów

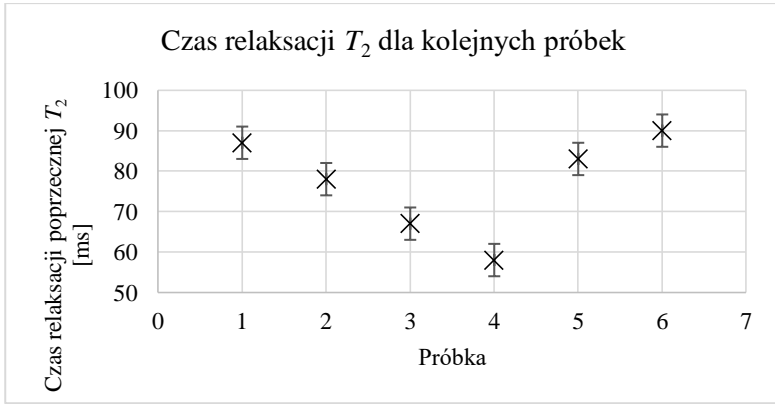
Wyniki pomiarów czasu relaksacji T1 i T2 dla sześciu próbek tkanek, odpowiednio: zmienionych nowotworowo i zdrowych, przedstawiono w tabelach (tab. 3 i 4) i na poniższych wykresach (wyk. 1-6).

Tabela 3. Czas relaksacji T_1 i T_2 sześciu przebadanych tkanek raka piersi. Wartości przedstawione w ms

Numer próbki	T_1 (ms)		T_2 (ms)	
1	1670	±81	87	±4
2	1005	±54	78	±4
3	1514	±82	67	±4
4	1300	±61	58	±4
5	1230	±23	83	±4
6	1095	±21	90	±4



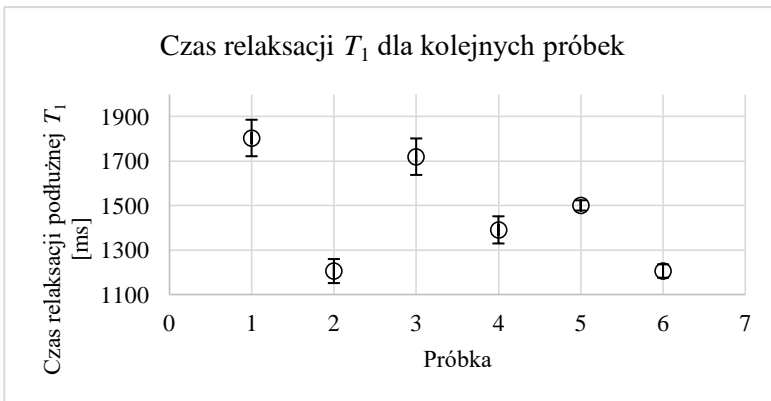
Wykres 1. Wykres przedstawiający wartość czasu relaksacji T_1 dla badanych sześciu próbek tkanek raka piersi



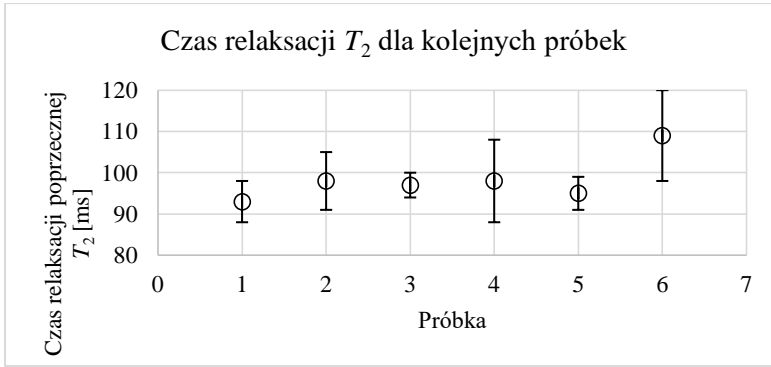
Wykres 2. Wykres przedstawiający wartość czasu relaksacji T_2 dla badanych sześciu próbek tkanek raka piersi

Tabela 4. Czas relaksacji T_1 i T_2 6 przebadanych zdrowych tkanek piersi. Wartości przedstawione w ms

Numer próbki	T_1 (ms)		T_2 (ms)	
	Wartość	± błędność	Wartość	± błędność
1	1803	±82	93	±5
2	1205	±54	98	±7
3	1719	±82	97	±3
4	1390	±61	98	±10
5	1500	±23	95	±4
6	1205	±30	109	±11

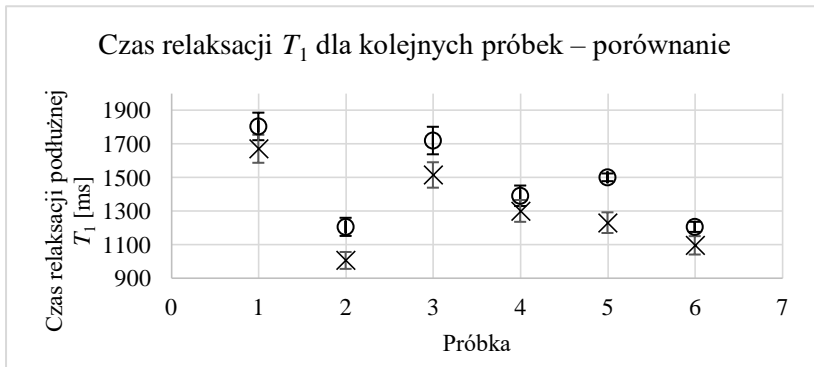


Wykres 3. Wykres przedstawiający wartość czasu relaksacji T_1 dla badanych sześciu próbek zdrowych tkanek piersi

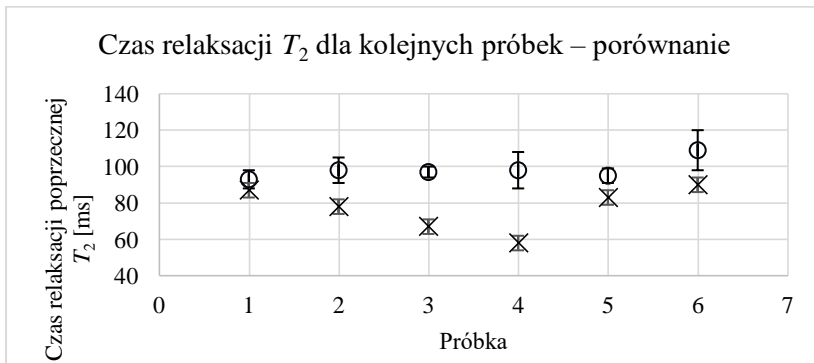


Wykres 4. Wykres przedstawiający wartość czasu relaksacji T_2 dla badanych sześciu próbek zdrowych tkanek piersi

Porównanie tkanek nowotworowych ze zdrowymi dla 6 próbek



Wykres 5. Wykres przedstawiający porównanie wartości czasu relaksacji T_1 dla badanych sześciu próbek tkanek raka piersi ze zdrowymi tkankami



Wykres 6. Wykres przedstawiający porównanie wartości czasu relaksacji T_2 dla badanych sześciu próbek tkanek raka piersi ze zdrowymi tkankami

Porównując różnice wartości pomiarów T_1 i T_2 dla tkanek ze zmianą nowotworową oraz tkanek zdrowych pozwala je jednoznacznie odróżnić. Zaobserwowano dłuższe czasy trwania czasów relaksacji T_1 i T_2 dla tkanek zdrowych.

8. Wnioski/Podsumowanie

Analiza badanych tkanek raka piersi przy zastosowaniu 1.5 Tesla Rezonansu Magnetycznego Optima MR360 firmy General Electric Healthcare pozwoliła na pomiar i uzyskanie danych dotyczących wartości czasu relaksacji T_1 i T_2 . Pomiar i obliczenia zostały przeprowadzone przy użyciu aplikacji pakietu oprogramowania VOLUME VIEWER na stacji roboczej AV4.6 (General Electric Healthcare).

Czas relaksacji podłużnej T_1 przebadanych tkanek raka piersi mieści się w przedziale 1005-1670 ($\pm 5\%$) ms. Czas relaksacji poprzecznej T_2 tkanek nowotworowych piersi zawiera się w przedziale 58-90 (± 4) ms. Dla tkanek zdrowych wartości były równe 1205-1803 ($\pm 23-82$) ms odpowiednio dla T_1 oraz 93-109 ($\pm 3-11$) ms dla T_2 . Porównanie różnic między wartościami pomiarów T_1 i T_2 dla tkanek ze zmianą nowotworową oraz tkanek zdrowych wpływa na ich ocenę. Można wyróżnić dłuższe czasy trwania obu czasów relaksacji dla tkanek zdrowych.

Praca wykazała że możliwe jest za pomocą pomiaru T_1 i T_2 rozróżnianie tkanki zdrowej i chorej co stanowi wartość dla oszczędzenia tkanki zdrowej przy zabiegu chirurgicznym. Pomiar T_1 i T_2 pozwalają na dokładne oszacowanie wielkości guza poprzez różnice w wartościach dla różnej morfologii tkanki zdrowej i chorej.

Pomiar T_1 i T_2 stanowi wewnętrzny kontrast pomiędzy obiema typami morfologii. W pracy nie używano kontrastów chemicznych.

Literatura

1. Didkowska J., Wojciechowska U., Czaderny K., Olasek P., Ciuba A., *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2017 roku*, Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa 2019.
2. Jassem J., Krzakowski M., Bobek-Billewicz B., Duchnowska R., Jeziorski A., Olszewski W., Senkus-Konefka E., Tchórzewska-Korba H., Wysocki P., *Breast cancer*. *Oncol Clin Pract.*, 6(5), 2020, s. 207-260.
3. Tkaczuk-Włach J., Sobstyl M., Jakiel G., *Rak piersi – znaczenie profilaktyki pierwotnej i wtórnej*, Przegląd Menopauzalny, 4, 2012, s. 343-347.
4. Huzarski T., Cybulski C., Jakubowska A., Byrski T., Gronwald J., Domagała P., Szwiec M., Godlewski D., Kilar E., Marczyk E., Siołek M., Gorski B., Wiśniowski R., Janiszewska H., Surdyka D., Sibilski R., Sun P., Narod S.A., Lubiński J., Collaborators: Błasińska-Morawiec M., Chosia M., Drosik K., Gozdecka-Grodecka S., Goźdź S., Grzybowska E., Haus O., Jeziorski A., Karczewska A., Kordek R., Kozak A., Kozak-Klonowska B., Lamperska K., Lange D., Mackiewicz A., Mitus J., Niepsuj S., Oszurek O., Gugala K., Morawiec Z., Mierzwa T., Posmyk M., Rozmiarek A., Ryś J., Szczylik C., Uciński M., Urbański K., Waśko B., Wandzel P., *Clinical characteristics of breast cancer in patients with an NBS1 mutation*, Polish Breast Cancer Consortium, *Breast Cancer Res Tr.*, 141, 2013, s. 471-476.
5. Huszno J., Budryk M., Kołosza Z., Nowara E., *The Influence of BRCA1/BRCA2 mutations on toxicity related to chemotherapy and radiotherapy in early breast cancer patients*, *Oncology*, 85, 2013, 278-282.
6. Ślubowski T., Ślubowska M., Wojciechowski A., *Techniki diagnostyczne w raku piersi. Część I: Metody obrazowe i ich modyfikacje*, *Ginekol. Pol.*, 78, 2007, s. 388-392.

7. Murawa D., Dyzmann-Sroka A., Kycler W., Lamch K., Kubiak A., Jędrzejczak A., Trojanowski M., Szczepański Ł., *ABC Raka Piersi*, Wielkopolskie Centrum Onkologii 2010.
8. Moss J.L., Tatalovich Z., Zhu L., Morgan C., Cronin K.A., *Triple-negative breast cancer incidence in the United States: ecological correlations with area-level sociodemographics, healthcare, and health behaviors*, *Breast Cancer*, 28, 2021, s. 82-91.
9. Okazaki M., Bando H., Tohno E., Kujiraoka Y., Iguchi-Manaka A., Ichioka E., Tsushima Y., Watanabe H., Hara H., *Investigation of the significance of population-based breast cancer screening among women aged under 40 years*, *Breast Cancer*, 28, 2021, s. 75-81.
10. Pęczkowski P., *Podstawy Fizyczne i Historia Obrazowania Metodą Rezonansu Magnetycznego*, *Wszechświat*, 113(10–12), 2012, s. 292-302.
11. Trzebiatowska E., *Praktyczny poradnik operatora Rezonansu Magnetycznego*, Medyk Sp. z o.o., 2010, s. 17-30.
12. Witkowicz J., *Czy stosowanie gadolinowych środków cieniujących u chorych z przewlekłą chorobą nerek jest bezpieczne?* *Nefrol. Dial. Pol.*, 13, 2009, 10-14.
13. Chong F., Wang Y., Song M., Sun Q., Xie W., Song Ch., *Sedentary behavior and risk of breast cancer: a dose–response meta-analysis from prospective studies*, *Breast Cancer*, 28, 2021, s. 48-59
14. Markowicz-Piasecka M., Mikiciuk-Olasik E., *Kompleksy gadolinowe w diagnostyce magnetycznego rezonansu jądrowego*, *Gazeta Farmaceutyczna*, 23(11), 2014, s. 26-28.

Contrast Enhanced MRI w tkance nowotworowej piersi *in vitro*

Streszczenie

Rak piersi jest nieustannie przedmiotem wielu badań naukowych, głównie ze względu na bardzo dużą częstość występowania. Ciągłe poszukuje się nowych, bardziej skutecznych, czulszych metod wczesnego wykrywania, aby móc zapewnić pacjentkom (ale także i pacjentom, bo rak piersi również dotyka mężczyzn) szanse na całkowite wyleczenie. Jednocześnie poszukuje się alternatywnych metod leczenia, które pozwoliłyby uniknąć okaleczających operacji niosących za sobą znaczne obniżenie komfortu życia. W pracy przedstawione zostały zagadnienia dotyczące nowotworów piersi oraz najczęstsze metody diagnostyczne. Przedstawiono metody polegające na kontrastowaniu badań przy różnych czasach relaksacji T1 i T2 oraz ich zastosowania. Analiza badanych tkanek raka piersi przy zastosowaniu 1.5 Tesla Rezonansu Magnetycznego Optima MR360 firmy General Electric Healthcare pozwoliła na pomiar i uzyskanie danych dotyczących wartości czasu relaksacji T1 i T2. Pomiar i obliczenia zostały przeprowadzone przy użyciu aplikacji pakietu oprogramowania VOLUME VIEWER na stacji roboczej AV4.6 (General Electric Healthcare). Badania przedstawiły różnice czasu relaksacji T1 i T2 dla 6 próbek między fragmentami tkanek ze zmianami nowotworowymi, a tkankami zdrowymi. Czas relaksacji podłużnej T1 przebadanych tkanek raka piersi mieści się w przedziale 1005-1670 ($\pm 5\%$) ms. Czas relaksacji poprzecznej T2 tkanek nowotworowych piersi zawiera się w przedziale 58-90 (± 4) ms. Dla tkanek zdrowych wartości były równe 1205-1803 ($\pm 23-82$) ms odpowiednio dla T1 oraz 93-109 ($\pm 3-11$) ms dla T2. Praca wykazała, że możliwe jest za pomocą pomiaru T1 i T2 rozróżnianie tkanki zdrowej i chorej co stanowi wartość dla oszczędzenia tkanki zdrowej przy zabiegu chirurgicznym. Pomiar T1 i T2 pozwalają na dokładne oszacowanie wielkości guza poprzez różnice w wartościach dla różnej morfologii tkanki zdrowej i chorej. Pomiar T1 i T2 stanowi wewnętrzny kontrast pomiędzy obiema typami morfologii. W pracy nie używano kontrastów chemicznych.

Słowa kluczowe: czasy relaksacji, MRI, rak piersi

Contrast Enhanced MRI in breast cancer tissue *in vitro*

Abstract

Breast cancer is the subject of a lot of scientific research, mainly due to its very high incidence. New, more effective, more sensitive methods of early detection are constantly being searched for in order to be able to give patients (but also patients, as breast cancer also affects men) the chance of a full recovery. At the same time, alternative methods of treatment, which would avoid mutilating surgeries, which could significantly reduce the quality of life are being searched for. The paper presents issues related to breast cancer and the most common diagnostic methods. The methods of contrasting studies at different T1 and T2 relaxation times and their application are presented. The analysis of the examined breast cancer tissues with the use of the 1.5 Tesla Magnetic Resonance Optima MR360 by General Electric Healthcare allowed the measurement and obtaining data on the values of the relaxation times T1 and T2. Measurements and calculations were performed using the VOLUME VIEWER software package application on the AV4.6 (General Electric Healthcare) workstation. The studies showed the differences in T1 and T2 relaxation times for 6 samples between fragments of tissue with neoplastic lesions and healthy tissues. The longitudinal relaxation time T1 of the examined breast cancer tissues is in the range 1005-1670 ($\pm 5\%$) ms. The T2 transverse relaxation time of breast cancer tissues is in the range of 58-90 (± 4) ms. For normal tissues, the values were 1205-1803 ($\pm 23-82$) ms for T1 and respectively 93-109 ($\pm 3-11$) ms for T2. The study showed that it is possible to distinguish between healthy and diseased tissue by means of the measurement of T1 and T2, which is of value in saving healthy tissue during surgery. T1 and T2 measurements allow for accurate estimation of tumor size through differences in values for different morphologies of healthy and diseased tissue. The measurement of T1 and T2 is an internal contrast between both types of morphology. No chemical contrasts were used in the work.

Keywords: relaxation time, MRI, breast cancer

Znaczenie chemokiny CXCL12 w raku piersi

1. Wstęp

Nowotwory złośliwe stanowią rosnący problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny w obecnych czasach. Według danych zgromadzonych przez Global Cancer Observatory (GCO) szacuje się, że w 2020 r. odnotowano około 19,3 miliona nowych przypadków zachorowań i ponad 9,9 miliona zgonów na choroby nowotworowe na całym świecie. Obecnie najczęściej diagnozowanym nowotworem jest rak piersi u kobiet stanowiący 11,7% wszystkich przypadków nowotworów występujących u obu płci. Stoi on również na czwartym miejscu pod względem najwyższej śmiertelności (6,9%). Niemalże na równi co do częstości występowania raka piersi, lecz o znacznie większej śmiertelności (18% wszystkich zgonów) jest rak płuc stanowiący 11,4% nowo diagnozowanych nowotworów. Kolejne miejsca w rankingu dziesięciu najczęściej występujących nowotworów przedstawione są w tabeli 1. Biorąc pod uwagę grupę wyłącznie kobiet, zauważyć można przodowanie nowotworów związanych z kobiecą fizjonomią, mianowicie są to rak piersi (24,5% wszystkich raków diagnozowanych wśród kobiet) oraz nowotwory narządów rodnych, tj. rak szyjki macicy (6,5%), trzonu macicy (4,9%) i jajnika (3,4%) [1]. Liczby te wyraźnie pokazują, jak dużym problemem nie tylko dla służby zdrowia, ale także dla całego społeczeństwa są nowotwory ginekologiczne. Niezależnie od typu nowotworu, patomechanizm ich powstawania jest procesem złożonym i wieloczynnikowym.

W obecnych czasach szczególnie podkreśla się związek pomiędzy elementami układu immunologicznego a rozwojem nowotworów oraz rolę tego układu w karcynogenezie. Jednymi z ważniejszych mediatorów układu immunologicznego są chemotaktyczne cytokiny (chemokiny) działające przez specyficzne receptory. Uznaje się, że w chorobach nowotworowych chemokiny wraz ze swoimi receptorami wpływają też na rozwój zmiany i powstawanie przerzutów [2-5]. Aktywacja sygnalizacji chemokinowej indukuje transkrypcję genów docelowych, które promują ruchliwość, inwazję oraz przeżycie komórek a także, interakcje z macierzą zewnątrzkomórkową [6]. Wywierają więc one bardzo złożony wpływ na komórki nowotworowe oraz otaczające je komórki mikrośrodowiska działając jako czynniki wzmagające lub hamujące proces nowotworzenia na każdym z jego etapów rozwoju choroby i przerzutów, a także na etapach leczenia i wznowy, co ma bezpośredni wpływ na rokowanie przeżycia [7, 8].

¹ joanna.motyka@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

² sylwia.ostapowicz@o2.pl, NZOZ Medyczne Laboratorium Diagnostyczne NovaLab, Augustów.

³ aleksandra.kicman@gmail.com, Zakład Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁴ pawellawicki04@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

⁵ slawicki@umb.edu.pl, Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

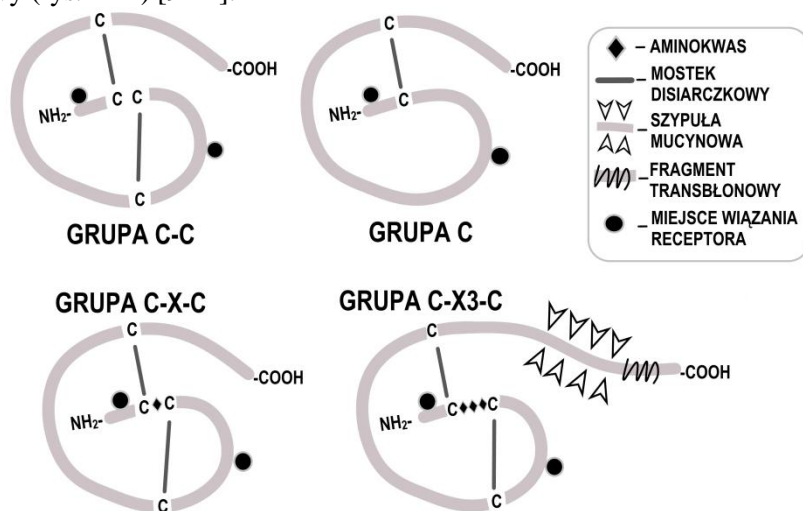
Tabela 1. Top 10 najczęściej występujących nowotworów w skali światowej wraz z ich umieralnością [1]

Nr	Nowotwór	Zachorowalność (liczba)	%	Śmiertelność (liczba)	%
1.	piersi	2261419	11,7	684996	6,9
2.	płuca	2206771	11,4	1796144	18,0
3.	prostaty	1414259	7,3	375304	3,8
4.	jelita grubego	1148515	6,0	576858	5,8
5.	żołądka	1089103	5,6	768793	7,7
6.	wątroby	905677	4,7	830180	8,3
7.	odbytnicy	732210	3,8	339022	3,4
8.	szyjki macicy	604127	3,1	341831	3,4
9.	przetyku	604100	3,1	544076	5,5
10.	tarczycy	586202	3,0	43646	0,44

2. Chemokiny

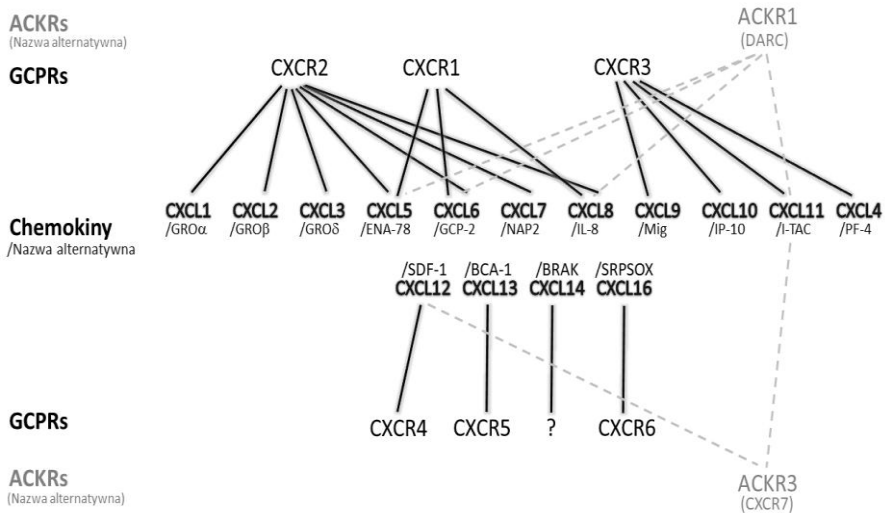
Chemotaktyczne cytokiny (chemokiny) są dużą podgrupą chemokin składającą się z około 50 drobnocząsteczkowych białek o masie od 8 do 12 kDa. Same cząsteczki zbudowane są z od 67 do 127 aminokwasów. Swoje efekty biologiczne wywołują głównie poprzez interakcje z transbłonowymi receptorami komórkowymi sprzężonymi z białkiem G (GPCR).

Chemokiny zbudowane są z czterech reszt cysteinowych, które tworzą dwa charakterystyczne mostki disiarczkowe determinujące ich strukturę trzeciorzędową oraz zapewniające ich aktywność biologiczną. Ze względu na ilość aminokwasów występujących pomiędzy dwiema pierwszymi resztami cysteinowymi od końca $-NH_2$ łańcucha aminokwasowego dzieli się je na cztery grupy: CC (β), gdzie reszty cysteinowe ze sobą sąsiadują, CXC (α), gdzie reszty cysteinowe oddzielone są 1 aminokwasem, CX3C (δ) – oddzielone trzema aminokwasami oraz C (γ), która jest wyjątkową grupą, której chemokiny posiadają jedynie dwie reszty cysteinowe tworzące jeden mostek disiarczkowy (rys. 1 i 2) [9-11].



Rysunek 1. Budowa strukturalna cząsteczek poszczególnych grup chemokin [opracowanie własne]

Chemokiny biorą udział w kontrolowaniu wielu procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Białka te wytwarzane są przez leukocyty i komórki zrębu, do których zaliczamy: komórki śródbłonna, makrofagi/monocyty, fibroblasty, komórki mezenchymalne i nabłonkowe. Najważniejszą funkcją chemokin jest regulacja migracji leukocytów, która reguluje równowagę immunologiczną w organizmie oraz wywołanie odpowiedzi immunologicznej na infiltrację patogenów [9-12]. W związku z tym wyróżnić można chemokiny konstytutywne (limfoidalne), które głównie regulują podstawową migrację i rozwój komórek immunologicznych, oraz chemokiny indukowane (prozapalne), które wydzielane są pod wpływem obecności toksyn i cytokin prozapalnych. Ponadto, niektóre z chemokin konstytutywnych mogą ulegać nadekspresji w warunkach patologicznych. Na ekspresję chemokin mogą wpływać różne czynniki na poziomie transkrypcji i modyfikacji potranslacyjnej zarówno w sposób dodatni, jak i ujemny. Do czynników stymulujących zalicza się między innymi toksyny bakteryjne, wirusy, trombinę, reaktywne formy tlenu i cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, IL-15, TNF-alfa i IFN-gamma) [12, 14].



Rysunek 2. Specyficzność chemokin grupy CXC wobec ich receptorów; GPCR-klasyczne receptory chemokin; ACKR-atypowe receptory [opracowano na podstawie 13]

Oprócz podstawowej funkcji chemokin w rozwoju i działaniu układu odpornościowego w badaniach ciągle odkrywa się nowe role jakie pełnią w organizmie takie jak zaangażowanie w procesy migracji neuronów, angiogenezy, organogenezy i rozwój embrionalny. Coraz większą uwagę zwraca się także na ich udział w patogenezie wielu chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym, np. łuszczycy, reumatoidalnego zapalenia stawów, chorób alergicznych czy stwardnienia rozsianego, oraz w chorobach nowotworowych między innymi raka piersi i jajnika [14].

2.1. Receptory chemokinowe

Chemokiny wywierają swoje efekty biologiczne poprzez interakcję z swoistymi receptorami. Dotychczas odkryto ponad 20 różnych receptorów chemokinowych. Receptory klasyczne dla chemokin (GPCR) są receptorami związanymi z białkiem G,

które po połączeniu się z ligandem wywołują aktywację wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego. Nazwy receptorów GCPR pochodzą od motywu grupy chemokin z którą oddziałują (CXCR, CCR, CX3CR i XCR) a ich numer oznacza kolejność odkrycia. Receptory wiążą się z chemokinami w stosunku 1:1, a większość z receptorów zdolna jest do rozpoznawania więcej niż jednego liganda w obrębie danej grupy chemokin. Zasada ta także odnosi się do chemokin, które mogą oddziaływać przez różne receptory. Występują jednak poszczególne przypadki, w których dana chemokina oddziałuje wyłącznie z jednym receptorem np. CCL20 i CCR6 [12, 14]. Co ciekawe, badania sugerują, że wiązanie różnych chemokin do tego samego receptora może dawać różne efekty biologiczne [16], podkreślając tym samym potencjalną złożoność sygnalizacji receptora chemokinowego. Ponadto, receptory chemokinowe mogą podlegać homolub heterodimeryzacji, która może sprzyjać wzajemnemu przenikaniu się różnych szlaków sygnałowych [17-19].

Wśród receptorów wyróżnia się także grupę atypowych receptorów chemokin (ACKR). Jest to grupa czterech receptorów niezwiązanych z białkiem G (ACKR1, ACKR2, ACK3, ACKR4) oraz nie mających zdolności do wytworzenia szlaku sygnałowego. Są one głównie wyrażane przez nieleukocytarne komórki, takie jak erytrocyty, limfatyczne lub naczyńne komórki śródbłonkowe, chociaż niektóre z nich (zwłaszcza ACKR2 i ACKR3) wykrywane są również na leukocytach. Działają one na zasadzie wychwytywania chemokin z otoczenia regulując tym ich miejscowe stężenie poprzez degradację wewnątrzkomórkową lub też w przypadku komórek spolaryzowanych – ograniczanie ich dostępności przez transport na przeciwległą stronę utworzonej przez komórki monowarstwy [6, 12].

3. CXCL12, jej receptory oraz pełnione funkcje w organizmie

Chemokina CXCL12 należy do grupy CXC i jest jedną z chemokin konstytutywnych. Została ona początkowo odkryta jako czynnik wzrostu komórek pre-B (PBGF) i uznana za niezbędną w procesach homeostatycznych, takich jak limfopoeza i embriogeneza. Wkrótce potem stwierdzono, że ulega także konstytutywnej ekspresji przez komórki zrębu szpiku kostnego i odpowiada za utrzymywanie krwiotwórczych komórek progenitorowych i macierzystych w szpiku, dlatego nazwano ją również czynnikiem pochodzącym z komórek zrębu-1 (SDF-1) [20-23]. CXCL12 wyróżnia się na tle innych członków rodziny chemokin CXC swoją chromosomalną lokalizacją. Podczas gdy większość genów dla chemokin CXC jest zlokalizowana na chromosomie 4q21, gen kodujący CXCL12 znajduje się na chromosomie 10q11. Ponadto CXCL12 jest jedyną chemokiną CXC o zróżnicowanym splicingu mRNA. Zidentyfikowano sześć różnych wariantów splicingu wśród ludzi (CXCL12 α do ϕ) i trzy (CXCL12 α do γ) u myszy [24-26]. Ortologi CXCL12 i CXCR4 o niezwykle podobnej sekwencji aminokwasowej występują również u mniej rozwiniętych gatunków, takich jak żaby (*X. tropicalis*), a nawet u rybek zebrowatych (*D. rerio*), co sugeruje pochodzenie i ważną rolę biologiczną CXCL12, która spowodowała zachowanie się tego białka i zapobieganie mutacjom w toku ewolucji [27, 28].

W przeciwieństwie do większości receptorów dla chemokin zapalnych, jedynym ligandem receptora CXCR4 jest CXCL12. Ponadto, CXCR4 jest jedynym receptorem chemokinowym, którego znokautowanie w modelu mysim skutkuje ich umieralnością w okresie okołopłodowym. Myszy pozbawione CXCR4 wykazują bowiem śmiertelne

uszkodzenia przegrody międzykomorowej serca oraz upośledzoną embrionalną hematopoezę i neurogenezę. Podobny fenotyp zaobserwować można u myszy, które pozbawione zostały CXCL12 [20,29,30]. CXCL12 oprócz receptora CXCR4 łączy się także z atypowym receptorem ACKR3. Pozbawienie myszy receptora ACKR3 powoduje nieprawidłowy rozwój serca, skutkujący zmianami letalnymi, co podkreśla tylko znaczenie układu CXCL12/CXCR4/ACKR3 w procesie kardiogenezy [31, 32].

3.1. Funkcje CXCL12 wywierane poprzez aktywację receptora CXCR4

Receptor CXCR4 jest rodopsyno-podobnym, siedmiodomenowym transmembranowym receptorem sprzężonym z białkiem G. Znaczenie tego receptora stale podkreślają nowe odkrycia typów komórek, które wykazują jego ekspresję na swojej błonie powierzchniowej. Do komórek tych zalicza się większość podtypów leukocytów, krwiotwórcze komórki progenitorowe i macierzyste występujące w krążeniu oraz komórki narządów limfoidalnych, takich jak szpik kostny, grasica i węzły chłonne. Komórki śródbłonna oraz komórki zrębu i nabłonka w szpiku kostnym, płucach i jelicie cienkim również wykazują ekspresję CXCR4. Ponadto, w przeciwieństwie do innych receptorów chemokinowych, wyciszenie genu CXCR4 skutkuje śmiercią okołoporodową w wyniku rozwoju poważnych defektów w zakresie hematopoezy, neurogenezy, waskularyzacji i kardiogenezy [29, 33, 34]. Odkryto także, że CXCR4 występuje w dwóch wariantach w wyniku splicingu, to jest CXCR4-A i CXCR4-B, gdzie oba receptory są w pełni funkcjonalne. Uważa się, że CXCR4-A pełni rolę receptora bezpieczeństwa dla CXCR4-B [35-37].

CXCL12 jest jedynym ligandem chemokinowym dla CXCR4, co jest unikalną cechą w relacji chemokina-receptor. Aktywacja CXCR4 poprzez CXCL12 wywołuje głównie transdukcję sygnału sprzężonego z białkiem G. Zależnie od sprzężonej podjednostki białka G, receptor CXCR4 wykazuje aktywację różnych szlaków sygnałowych skutkując złożoną kaskadą sygnałową obejmującą m.in. szlaki kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK), fosfolipazy C i kinazy fosfatydyloinozytol-3, a kończącą się migracją komórkową lub aktywacją cząsteczek adhezyjnych.

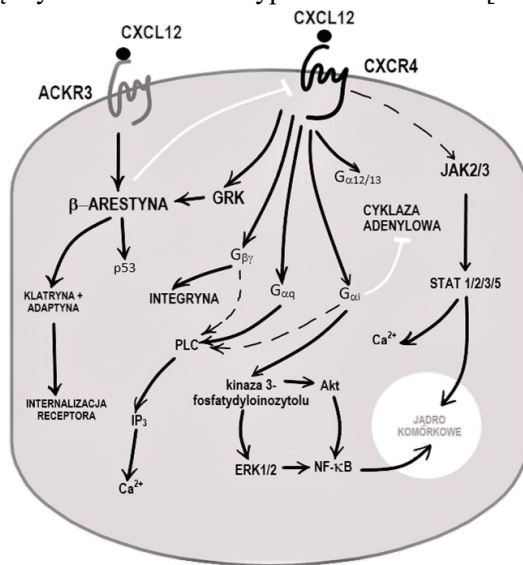
Dla CXCR4 wykazano także możliwość aktywacji szlaków sygnałowych niezależnych od białek G poprzez rekrutację kinaz Janus (JAK)2 i JAK3 po aktywacji i homodimeryzacji receptora. Zwerbowane kinazy aktywują się wzajemnie poprzez transfosforylację, a następnie fosforylują CXCR4, umożliwiając rekrutację i aktywację cząsteczek STAT1, STAT2, STAT3 i STAT5 (przebieżników sygnału i aktywatory transkrypcji 1,2,3,5). Aktywowane dimery STAT są znanymi czynnikami transkrypcyjnymi i są dodatkowo powiązane z zależną od podjednostki białka G α i mobilizacją wapnia wewnątrzkomórkowego i chemotaksją [38-43]. Mechanizm ten jednak został zakwestionowany i pozostaje kwestią sporną [44].

3.2. ACKR3 pełni zarówno funkcje wymiatające, jak i sygnalizacyjne

ACKR3, początkowo odkryty jako sierocy receptor chemokinowy RDC-1/CXCR7, ma wysokie powinowactwo do chemokin CXCL11 i CXCL12. Wiązanie CXCL12 zachodzi z powinowactwem dziesięciokrotnie wyższym niż dla CXCR4. ACKR3 ulega ekspresji na wielu typach komórek, w tym na komórkach krwiotwórczych, komórkach progenitorowych neuronów i aktywowanych komórkach śródbłonna [34].

Transdukcja sygnału poprzez receptor ACKR3 nie jest inicjowana poprzez białko G, lecz zachodzi przy udziale β -arestyny w związku z czym jest on zaliczany do nietypowych receptorów chemokinowych [45, 46]. Aktywacja ACKR3 przez CXCL12 powoduje również pośredniczoną przez MAPK transdukcję sygnału i migrację komórek T oraz neuronalnych komórek progenitorowych [47-50]. Co więcej myszy z nokautem ACKR3 wykazują zaburzenia w kardiogenezie z podwyższoną śmiertelnością postnatalną [14, 15], spowodowaną utratą wychwytu prawdopodobnie zarówno CXCL12, jak i adrenomeduliny, innego niechemokinowego liganda ACKR3 [51,52]. Oprócz właściwości sygnalizacyjnych, ACKR3 pełni przede wszystkim funkcję zmiatającą i usuwa CXCL12 z otoczenia [53-55]. Wraz z wysokim powinowactwem wiązania CXCL12, sekwestracja ta jest osiągnięta przez ciągłą internalizację i recykling ACKR3. W przeciwieństwie do CXCR4, internalizacja ACKR3 zachodzi nawet bez wiązania ligandu i nie prowadzi do degradacji receptora [52].

Ponadto, aktywacja ACKR3 pośredniczy także w zwiększonej przeżywalności i adhezji komórek, które są ważnymi cechami stymulującymi wzrost guza nowotworowego, a jego ekspresję wykazano dla kilku typów nowotworów [53, 56].



Rysunek 3. Ścieżki sygnałowe aktywowane przez CXCL12; stymulacja zarówno CXCR4, jak i ACKR3 uruchamia kaskadę sygnałową z udziałem wielu drugorzędnych przekaźników. Pierwotne szlaki są przedstawione ciągłymi strzałkami, podczas gdy interakcje hamujące są pokazane białą linią. Linie przerywane reprezentują szlaki sygnalizacyjne, co do których nie ma konsensusu w literaturze.

ERK1/2 – kinaza aktywowana zewnątrzkomórkowo 1/2; GRK – receptor kinaz sprzężony z białkiem G; IP₃ – inozytolo-3-fosforan; JAK2/3 – kinaza Janusowa 2/3; NF- κ B – czynnik transkrypcyjny κ B; PLC – fosfolipaza C; STAT – przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji [opracowano na podstawie 57]

3.3. Dimeryzacja

Opisano heterodimeryzację CXCL12 z innymi cząsteczkami co wywiera wpływ na sygnalizację zależną od CXCR4. Przykładowo heterodimeryzacja high-mobility group box 1 (HMGB1) z chemokiną CXCL12 jest niezbędna do chemotaksji monocytów przez receptor CXCR4 do miejsc uszkodzenia tkanek [58]. Ponadto wykazano, że CXCL12 heterodimeryzuje z innymi chemokinami (CCL5, CXCL4, CXCL7) [62, 63].

Heterodimeryzację wykazano także pomiędzy ACKR3 i CXCR4, a proces ten skutkuje zwiększoną mobilizacją wapnia oraz zmienioną fosforylacją ERK1/2 po stymulacji chemokina CXCL12 [32]. Należy zaznaczyć, że inne grupy donosiły, że interakcja między CXCR4 i ACKR3 hamowała sygnalizację przez białko G za pośrednictwem CXCR4 [61, 62]. Zaobserwowano także dodatkową złożoność wzajemnego oddziaływania między CXCR4 i ACKR3 poprzez odwrotnie skorelowaną zależność poziomu ekspresji CXCR4 na powierzchni błony komórkowej z poziomami ekspresji ACKR3 [63]. CXCR4 tworzy również heterodimery z wieloma innymi częściami błonowymi, w tym z innymi receptorami chemokinowymi.

3.4. Glikozaminoglikany jako kluczowe elementy chemokin

Ważnymi partnerami interakcji dla chemokin, innymi niż ich receptory, są glikozaminoglikany (GAG), takie jak heparyna i siarczan heparanu. GAG są długimi, nierozgałęzionymi polimerami ujemnie naładowanych siarczanowych jednostek disacharydowych dużej heterogenności. Stanowią one część glikanową proteoglikanów i tworzą zewnątrzkomórkową, ujemnie naładowaną matrycę, która umożliwia interakcję z dodatnio naładowanymi strukturami białkowymi. GAG są składnikami krytycznymi dla aktywności chemotaktycznej chemokin, ponieważ interakcja chemokina-GAG jest niezbędna w tworzeniu gradientów chemokin [57]. W przypadku CXCL12 wykazano znaczenie wiązania GAG dla jej funkcjonalności *in vivo*. Zmutowane myszy wyrażające izoformy CXCL12 α , β i γ , oddziałujące z CXCR4 ale nie mające zdolności wiązania GAG, miały zwiększoną liczbę krążących komórek CD34+ i wykazywały upośledzoną rewaskularyzację z powodu braku komórek infiltrujących w obszarach niedokrwienia [64]. Ponadto interakcja z GAG jest kluczowa dla prawidłowej funkcji CXCL12 *in vivo*, ponieważ chroni ona CXCL12 przed skróceniem łańcucha cząsteczki i inaktywacją przez CD26 [65].

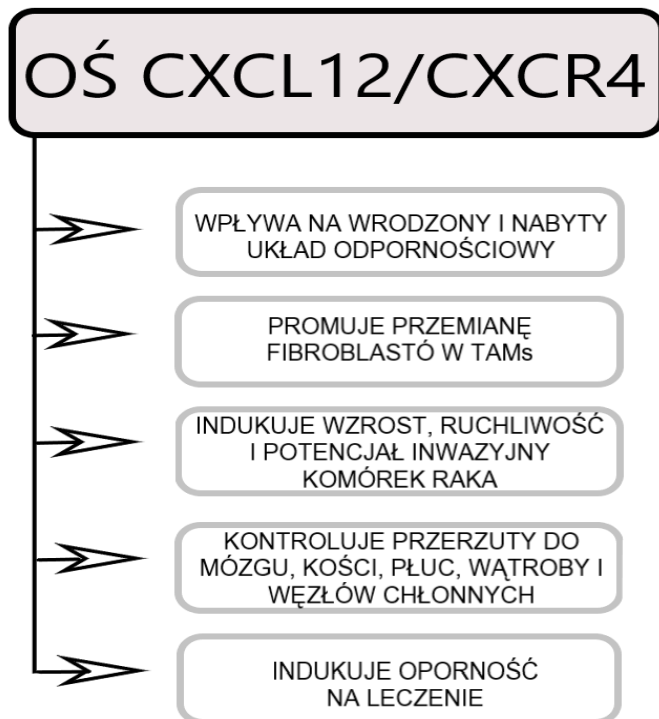
Struktura trzeciorzędowa i czwartorzędowa CXCL12 jest również istotna dla wiązania GAG. Ponadto, wiązanie GAG promuje homodimeryzację CXCL12, co ma bezpośredni wpływ na jego sygnalizację poprzez swoiste receptory. Po dimeryzacji CXCL12, struktury trzeciorzędowe wiążące GAG każdego monomeru CXCL12 są zorientowane względem siebie, co dodatkowo potęguje oddziaływanie GAG [66, 67].

4. Rola CXCL12 w raku piersi

Stan zapalny odgrywa kluczową rolę w procesie nowotworzenia. W trakcie rozwoju guza komórki zapalne oddziałując z komórkami nowotworowymi w skoordynowany sposób przekształcają architekturę tkanek w zapalne środowisko guza. Stan zapalny wpływa zarówno na skład środowiska guza, jak i na plastyczność komórek nowotworowych i zrębowych nowotworu [68]. We wczesnym etapie procesu karcynogenezy środowisko immunologiczne indukuje działania supresyjne wobec guza. Jednak, w momencie nabycia cech inwazyjności przez nowotwór, przejmuje kontrolę nad środowiskiem i przekształca je w niszę sprzyjającą rozwojowi zmiany złośliwej poprzez adaptację cząsteczek układu immunologicznego, takich jak chemokiny zapalne, receptory chemokinowe i selektyny na własny użytek. Wyżej wymienione cząsteczki sygnalizacyjne odpowiadają za chemotaksję różnych podgrup komórek układu odpornościowego, w tym neutrofilii, niedojrzałych komórek dendrytycznych (DCs), makrofagów i wrodzonych komórek limfoidalnych w celu zaostrenia i/lub pod-

trzymywania stanu zapalnego niezbędnego do stworzenia mikrośrodowiska promującego progresję nowotworu [69-73].

Ponieważ CXCR4 i ACKR3 ulegają ekspresji w wielu typach komórek, regulacja aktywności CXCL12 jest kluczowa dla zrównoważonej homeostazy. Patologicznie zmieniona regulacja CXCL12 powoduje zaburzenia równowagi w osi CXCL12/CXCR4/ACKR3, które powiązane są z rozwojem i przebiegiem niektórych chorób, w tym z nowotworami, stwardnieniem rozsianym, czy reumatoidalnym zapaleniem stawów (rys. 4).



Rysunek 4. Rola osi CXCL12/CXCR4 w raku piersi [opracowano na podstawie 107]

4.1. Regulacja transkrypcyjna CXCR4 i CXCL12 w raku piersi

W dostępnej literaturze opisano kilka czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję CXCR4 i CXCL12 w raku piersi, które dodatkowo mogą ze sobą współpracować. Przykładem jest czynnik wzrostu hepatocytów, który aktywując ERK1/2, a następnie Ets1, wiąże się z DNA i we współpracy z NF- κ B indukuje transkrypcję CXCR4. W warunkach hipoksji NF- κ B i czynnik indukujący hipoksję-1 (HIF-1) pozostają kluczowymi induktorami CXCR4. Co więcej, sam NF- κ B może aktywować ekspresję CXCR4 w komórkach przerzutowego raka piersi poprzez bezpośrednią interakcję z jego promotorem, indukując ruchliwość komórek [74, 75].

KLF8 został włączony w regulację sygnalizacji CXCR4 i progresji choroby. Wiążąc się z promotorem CXCR4 aktywuje go, a jego wyciszenie w komórkach nowotworowych linii MDA-MB-231 skutkowało zmniejszoną migracją i inwazją w kierunku CXCL12. Ponadto wykazano korelację nadekspresji KLF8 i CXCR4 z potencjałem przerzutowym wśród pacjentek z rakiem piersi [76]. Podobnie, czynnik transkrypcyjny

forkhead box C1 (FOXC1) indukuje ekspresję CXCR4 i nasila migrację komórek MDA-MD-231 oraz wystąpienie przerzutów do płuc *in vivo*. Dodatkowo, czynnik transkrypcyjny 1 klasy 2 domeny POU (znany jako POU1F1 (Pit-1)) indukuje ekspresję zarówno CXCR4, jak i CXCL12 w komórkach raka piersi [77, 78].

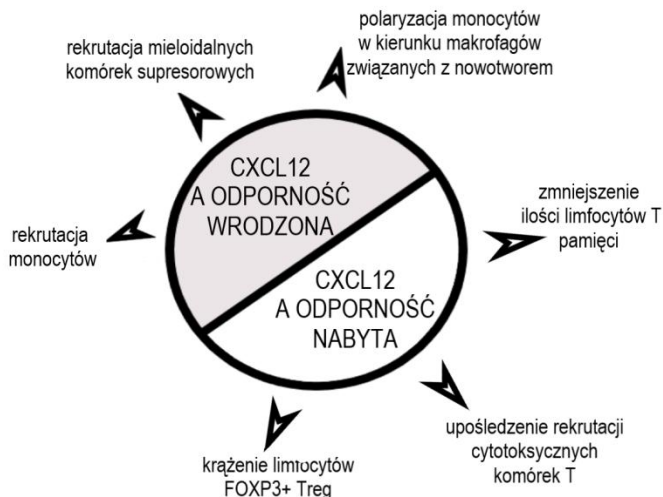
Czynniki transkrypcyjne GLI – efekторы sygnalizacji Hedgehog – również odgrywają ważną rolę w progresji raka piersi. GLI1 i GLI2 nasilają ekspresję kilku genów zaangażowanych w sygnalizację CXCL12, takich jak CXCR4 i ACKR3. GLI1 stymuluje również zależną od CXCL12 fosforylację ERK i migrację komórek raka piersi [79].

Receptory estrogenowe (ER) α i β , również regulują transkrypcję elementów kaskady CXCL12/CXCR4 w raku piersi. Poddanie komórek MCF-7 działaniu CXCL12 zwiększa aktywność transkrypcyjną ER i ekspresję jego genów docelowych, w tym CXCL12, w wyniku dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy sygnalizacją CXCL12 a transkrypcją genów zależną od ER [80]. Podobnie w innym badaniu stwierdzono, że estrogen zwiększa ekspresję zarówno CXCL12, jak i CXCR4. CXCL12 nasila również transkrypcję genów pod wpływem ER poprzez aktywację ERK1/2 i p38 [81, 82].

4.2. Wpływ CXCL12 na wrodzony oraz nabyty układ odpornościowy

CXCL12 jest uwalniany przez różne komórki w mikrośrodowisku guza i wpływa zarówno na odporność adaptacyjną, jak i wrodzoną (rys. 5). Do środowiska guza rekrutowane są między innymi monocyty, które stają się ruchliwymi makrofagami związanymi z guzem (TAMs), a następnie przekształcają się w wysepkowe makrofagi okołonaczyniowe. Transformacja ta jest jednokierunkowa i kontrolowana przez oś CXCL12/CXCR4. W konsekwencji TAMs łączą się z naczyniami krwionośnymi i indukują rozszczelnienie bariery śródbłonkowej. TAM kierują również ruchliwe komórki nowotworowe i kierują je podczas ich wędrówki w kierunku naczyń krwionośnych [83].

W raku piersi wpływ CXCL12 na odporność nabytą jest głównie niekorzystny i dotyczy przede wszystkim limfocytów T (rys. 4). Wysoka ekspresja CXCL12 u chorych na raka piersi typu podstawnego była związana ze złym rokowaniem i wysoką akumulacją Treg w guzach. Akumulacja ta była pośredniczona przez indukowaną hipoksją CXCR4 [84]. Fibroblasty związane z rakiem (CAFs) również przyczyniają się do rekrutacji Tregs. W potrójnie negatywnym typie raka piersi (TNBC) CAFs poprzez sekrecję CXCL12 zwiększają ilość immunosupresyjnych Tregs FOXP3+ i zmniejszają ilość komórek T CD8+ [85]. Chociaż wydaje się, że sygnalizacja CXCL12 wywiera raczej szkodliwy wpływ na odporność adaptacyjną w raku piersi, w jednym z badań odnotowano przeciwne obserwacje. Stwierdzono bowiem, że nadekspresja CXCL12 w komórkach mysiego raka piersi indukuje odpowiedź komórek T CD8+ i zwiększa cytotoxiczność pośredniczoną przez komórki T [86].



Rysunek 5. Efekt CXCL12 na nabytą oraz wrodzoną odpowiedź immunologiczną [opracowano na podstawie 107]

4.2.1. CXCL12/CXCR4 napędza inwazyjność i ruchliwość komórek raka piersi

Komunikacja molekularna za pośrednictwem cytokin prozapalnych pomiędzy komórkami raka piersi a fibroblastami odgrywa kluczową rolę we wzroście guza i powstawaniu przerzutów [87]. Na przykład CAFs produkujące IL-7 wykazują specyficzną sygnaturę onkogeną, produkują wysoki poziom CXCL12 i fizycznie oddziałują z komórkami nowotworowymi. Prowadzi to do aktywacji szlaku CXCL12/CXCR4 w komórkach raka piersi, wspierając macierzystość komórek nowotworowych i ich wzrost w sposób parakryny [88, 89]. Co więcej, CAFs pochodzące z przerzutów do mózgu ludzkiego raka piersi wykazują wyższą ekspresję CXCL12 i CXCL16 w porównaniu ze zdrowymi fibroblastami i CAFs z pierwotnych guzów piersi. Są one więc silniejszymi induktorami migracji komórek nowotworowych niż zdrowe fibroblasty. Wysoki poziom CXCL12 i CXCL16 w CAFs z przerzutów ludzkiego raka mózgu przyciąga komórki raka piersi poprzez szlaki CXCR4-CXCL12 i CXCR6-CXCL16 [90].

CAFs wraz z komórkami śródbłonna generują lokalne gradienty CXCL12, które odpowiadają za chemotaksję komórek progenitorowych CXCR4+ (takich jak komórki progenitorowe śródbłonna) nasilając proces angiogenezy [88]. Ponadto CXCL12 pochodzący z CAFs zmniejsza integralność bariery śródbłonkowej, zwiększa przepuszczalność naczyń i wzrost nieszczelnego unaczynienia guza, co sprzyja powstawaniu przerzutów odległych raka piersi [91]. W innych badaniach uzyskano podobne wyniki dotyczące wpływu CXCL12 na śródbłonek w raku piersi [92, 93], jednak ostatnie badania zasugerowały wręcz przeciwny protekcyjny wpływ CXCL12 na integralność śródbłonna [94, 95]. Rozbieżność tę jednak można wyjaśnić różnymi typami komórek śródbłonna stosowanymi w badaniach oraz odmiennymi warunkami eksperymentalnymi. Ponadto, różne izof formy CXCL12 mogą wywierać różny wpływ na integralność śródbłonna [92].

CXCL12 pochodzący z CAFs odgrywa specyficzne role w TNBC. Zwiększa on inwazyjność komórek TNBC poprzez aktywację ERK1/2. Ponadto, CXCL12 zwiększa migrację komórek TNBC poprzez reorganizację cytoszkieletu. Efekty te mogą być blokowane przez specyficzny inhibitor CXCR4, co sugeruje, że zaburzenie interakcji z mikrośrodowiskiem guza może być obiecującą strategią terapeutyczną dla TNBC, dla którego brak jest leczenia celowanego [96, 97].

Ruchliwość i migracja komórek należą do niezbędnych zachowań komórek i przyczyniają się do powstawania przerzutów nowotworowych, co pozostaje największym wyzwaniem w leczeniu tej choroby [98]. Wiele badań wskazuje, że małe białka G, takie jak Rho, które regulują reorganizację cytoszkieletu, odgrywają ważną rolę w migracji indukowanej przez CXCL12 [99-101]. W komórkach MDA-MB-231 sygnalizacja CXCL12/CXCR4 indukowała inwazyjność komórek [102]. W innym badaniu wykazano jednak, że wpływ CXCL12 na migrację jest zależny od stężenia w komórkach TNBC. Mechanizm ten opiera się na aktywacji specyficznych małych białek G. Niskie stężenia CXCL12 indukują nadekspresję i aktywację RhoA związaną z polimeryzacją aktyny i lokomocją komórek. Z kolei wyższe stężenia CXCL12 promują adhezję komórek kontrolowaną przez Rac1 [103].

Przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT) umożliwia komórkom nowotworowym uzyskanie właściwości migracyjnych i przerzutowych. Ostatnie badania wskazują na istotną rolę CXCL12 w indukcji EMT, a w jej wyniku większą migrację, proliferację i potencjał przerzutowy komórek raka piersi [104-106].

4.3. CXCL12/CXCR4 i przerzutowanie do miejsc odległych

Receptor CXCR4 pozostaje kluczowym elementem powstawania przerzutów raka piersi do płuc, wątroby, kości i węzłów chłonnych (rys. 6) ze względu na wysoką ekspresję CXCL12 w tych lokalizacjach [107].

4.3.1. Przerzuty do węzłów chłonnych

Ostatnie badania sugerują, że zarówno wrodzone, jak i adaptacyjne komórki odpornościowe zaangażowane są w przerzuty do węzłów chłonnych w raku piersi. U chorych na raka piersi z dodatnimi węzłami chłonnymi (obecne przerzuty) obserwuje się zwiększoną infiltrację plazmacytoidalnych DCs, co koreluje z odsetkiem komórek CXCR4 dodatnich. Ponadto u tych chorych występuje wysoka ekspresja CXCL12 [108]. W innym badaniu wykazano, że guzy pierwotne indukują akumulację komórek B w węzłach chłonnych odprowadzających limfę z okolicy guza i uwalnianie patogennej IgG, która indukuje ekspresję CXCR4 w komórkach nowotworowych. Wysoki poziom IgG w surowicy koreluje również z przerzutami do węzłów chłonnych u pacjentów z rakiem piersi [109].

4.3.2. Przerzuty do mózgu

Mózg pozostaje jednym z częstszych narządów docelowych powstawania przerzutów raka TNBC niż typów luminalnych raków piersi [70]. Astrocyty, które regulują zarówno wrodzoną, jak i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną po urazie w ośrodkowym układzie nerwowym, są zaangażowane w przerzuty do mózgu. Promują one przerzuty raka piersi do mózgu poprzez wydzielanie CXCL12. CXCL12 obniża ekspresję Kiss1 w komórkach raka piersi, genu związanego z hamowaniem przerzutów.

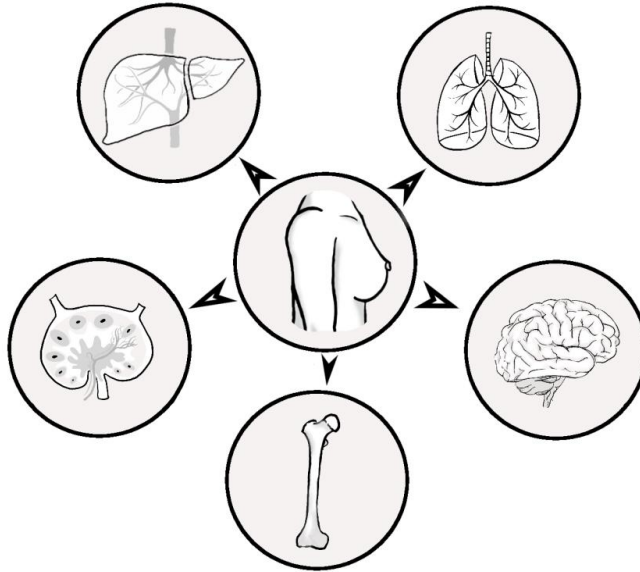
Ekspresja Kiss1 w ludzkich komórkach raka piersi odwrotnie koreluje z poziomem metaloproteinaz macierzy-9 (MMP-9) i IL-8 – genów związanych z inwazją przerzutową [110]. CAFs zostały również wykorzystane w przerzutach do mózgu. CAFs z przerzutów do mózgu są silniejszymi induktorami migracji komórek nowotworowych. Wysoki poziom CXCL12 i CXCL16 w CAFs z przerzutów ludzkiego raka piersi do mózgu przyciąga komórki raka piersi poprzez szlaki CXCR4/CXCL12 i CXCR6/CXCL16 [87]. Co więcej, sygnalizacja CXCL12 w komórkach śródbłonna zwiększa ich przepuszczalność i nasila migrację komórek raka piersi przez barierę krew-mózg [107].

4.3.3. Przerzuty do płuc

Przerzuty do płuc pozostają istotną przyczyną zgonów u chorych na raka piersi, a szlak CXCR4/CXCL12 jest kluczowym uczestnikiem tego procesu. Zarówno komórki podścieliska, jak i immunologiczne mogą indukować przerzuty do płuc w raku piersi. Aktywowane mezenchymalne komórki podścieliska odgrywają ważną rolę w modelach mysich przerzutów do płuc w raku piersi. Po podaniu TNF- β komórki te wykazują ekspresję ligandów CCL5, CCR2 i CXCR2. Ligandy CXCR2 (CXCL1, -2 i -5) rekrutują neutrofile CXCR2+ do mikrośrodowiska guza, które wchodzi w interakcję z komórkami nowotworowymi i indukują ekspresję genów związanych z przerzutami, takich jak CXCR4 i MMP-2 [111]. Co więcej, indukowany przez POU1F1 CXCL12 w komórkach raka piersi promuje rekrutację i polaryzację makrofagów do TAMs. Te ostatnie działają w celu zwiększenia wzrostu guza, angiogenezy i przerzutów do płuc [112]. W innym badaniu stwierdzono, że LRP6, kluczowy element kanonicznej sygnalizacji Wnt, może hamować przerzuty do płuc zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ektodomena LRP6 blokuje indukowane przez CXCR4/CXCL12 przerzuty do płuc poprzez wiązanie się z CXCR4. Pojawienie się przerzutów obniża poziom LRP6 zarówno w surowicy krwi myszy, jak i surowicy krwi osobników z rakiem piersi. Co więcej, niska ekspresja LRP6 pogarsza i tak już złe rokowanie u chorych z rakiem piersi i wysokim poziomem CXCR4 [113].

4.3.4. Przerzuty do wątroby

Przerzuty do wątroby są częstsze w przypadku TNBC i HER2+ raków piersi niż luminałnych raków piersi [70]. Sygnalizacja CXCL12/CXCR4 jest zaangażowana w ekstrawersję komórek przerzutowego raka piersi w wątrobie [114]. *Billard i wsp.* stwierdzili, że kinaza receptora sprzężonego z białkiem G 3 (GRK3) – negatywny regulator sygnalizacji CXCR4 – chroni przed przerzutami do wątroby. Zmniejszona ekspresja GRK3 koreluje z rakiem piersi typu podstawnego i przerzutami do wątroby u chorych, a zmiany w ekspresji GRK3 wpływają zarówno na migrację, jak i inwazję komórek TNBC [107].



Rysunek 6. Lokacje przerzutów raka piersi [opracowanie własne]

4.3.5. Przerzuty do kości

Nawrót przerzutów raka piersi może wystąpić wiele lat po ukończeniu leczenia, a szpik kostny jest głównym miejscem nawrotu choroby. Price i wsp. badali mechanizmy leżące u podstaw wnikania do mikrokrążenia szpiku kostnego rozsiąanych komórek raka piersi i stwierdzili, że uśpione i proliferujące komórki zajmują różne nisze w szpiku kostnym. Komórki uśpione pozostają w bogatych w selektynę E i CXCL12 regionach okołonaczyniowych. E-selektyna umożliwia wnikanie komórek raka piersi do szpiku kostnego, podczas gdy sygnalizacja CXCL12/CXCR4 zakotwicza komórki raka piersi w mikrośrodowisku [115]. W innym badaniu wykazano, że aktywacja sygnalizacji czynnika indukowanego hipoksją (HIF) w komórkach osteoprogenitornych zwiększa masę kostną i promuje przerzuty raka piersi do kości. Ponadto, sygnalizacja HIF w komórkach linii osteoblastycznej promuje wzrost komórek raka piersi i rozprzestrzenianie się w odległych tkankach, takich jak płuca, poprzez wzrost stężenia CXCL12 we krwi. Tak więc kości mogą regulować ogólnoustrojowe mikrośrodowisko nowotworu i jego wzrost. Ponadto, pochodzące z komórek nowotworowych białko angiopoetynopodobne 2 (angptl2) indukuje CXCR4 i aktywuje sygnalizację CXCL12/CXCR4 w komórkach raka piersi, prowadząc do powstawania przerzutów do kości. W modelach ksenograftów mysich inhibicja Angptl2 zmniejsza przerzuty do kości. Ponadto, ekspresja Angptl2 i CXCR4 dodatkowo korelowała w próbkach pobranych od pacjentów [116, 117]. TRAIL-R2, należący do nadrodziny receptorów TNF, również został włączony do czynników sprzyjających powstawaniu przerzutów kostnych w raku piersi. Znokautowanie TRAIL-R2 w komórkach MDA-MB-231 zmniejsza ekspresję CXCR4 i migrację oraz blokuje zdolność do przerzutowania do kości. Ponadto zwiększa ekspresję E-kadheryny [118].

Podsumowując, sygnalizacja CXCL12/CXCR4 działa jako główny regulator przerzutowania raka piersi i pośredniczy w przerzutowaniu do wszystkich narządów

docelowych, takich jak mózg, płuca, węzły chłonne, wątroba i kości. Sygnalizacja ta wpływa na wiele typów komórek, w tym komórki raka piersi, śródbłonka, zrębu i astrocyty, aby indukować przerzuty w skoordynowany sposób. Korzystnie, specyficzne typy białek sygnalizacyjnych, takie jak Rho, LRP6 i GRK3 zostały opisane jako ochronne przed przerzutami do węzłów chłonnych płuc i wątroby.

4.4. Oporność na terapię w raku piersi indukowana przez CXCL12/CXCR4

W raku piersi opisano różnorodne mechanizmy leżące u podstaw oporności na leczenie indukowanej przez CXCL12/CXCR4. Na przykład, sygnalizacja CXCL12/CXCR4 zwiększa aktywność PI3K i ERK promując wzrost guza i oporność na leki w komórkach TNBC. Ponadto, nadekspresja CXCR4 aktywuje ERK1/2 i AKT poprzez płytkopochodne czynniki wzrostu A i B. W innym badaniu stwierdzono, że aktywacja ERK przez członka małych białek G Rac1 zwiększa metabolizm nukleotydów w komórkach raka piersi i chroni przed indukowaną chemioterapią cytotoksycznością i uszkodzeniami DNA. Rac1 jest również podwyższona w chemioopornym raku piersi i koreluje ze złym rokowaniem [119-121].

Białka cytoszkieletu, takie jak cytokeratyna-19, zostały włączone do mechanizmu rozwoju lekooporności zależnej od CXCL12/CXCR4. Inhibicja cytokeratyny-19 w komórkach TNBC powoduje proliferację, migrację i oporność na leki poprzez wzrost CXCR4. Ponadto, niska ekspresja cytokeratyny-19 w próbkach pobranych od pacjentek koreluje ze złym rokowaniem [122]. W innym badaniu oceniano związek między ekspresją cytokeratyny-19 w komórkach nowotworowych w okresie obserwacji po leczeniu i wyciągnięto odmienne wnioski. Obecność cytokeratyny-19 pozytywnej w krążących komórkach nowotworowych w ciągu pierwszych pięciu lat obserwacji wskazuje na obecność odpornej na leczenie choroby resztkowej i koreluje ze zwiększonym ryzykiem późnego nawrotu. Ponadto, oś CXCL12/CXCR4 wspomaga włóknienie mikrośrodowiska nowotworowego i zapobiega efektem terapeutycznym blokerów punktów kontrolnych układu odpornościowego takich jak Paklitaksel [123, 124].

5. Podsumowanie

Rak piersi pozostaje najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet i jest chorobą o złożonym procesie patologicznym, w który zaangażowanych jest wiele czynników. Chemokina CXCL12 ma wiele możliwości interakcji, chociażby poprzez glikozamoglikany, dimeryzację czy też same receptory. Co więcej, stymulacja CXCR4 lub ACKR3 może prowadzić do aktywacji kilku różnych szlaków transdukcji sygnału. W związku z tym nie wystarczy ocena tylko jednego aspektu tych interakcji przy rozpatrywaniu możliwych zmian w funkcji CXCL12. Kaskada CXCL12/CXCR4/ACKR3 zaangażowana jest w niemal każdy aspekt procesu nowotworzenia raka piersi, w tym w proliferację, ruchliwość komórek i przerzutowanie odległe.

Sygnalizacja CXCL12/CXCR4 jest również celem terapeutycznym w badaniach nad leczeniem raka piersi. Ostatnie badania proponują kilka strategii hamowania tej sygnalizacji, w tym za pomocą specyficznych inhibitorów CXCR4, które blokują efekty końcowe tej osi, takie jak migracja i przerzuty, co mogłoby stanowić przełom w prowadzeniu walki z wieloma nowotworami, w tym i z rakiem piersi, a w szczególności w zwalczaniu oporności na immunoterapię, chemio- i/lub radioterapię.

Literatura

1. Ferlay J., Ervik M., Lam F., *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2020, <https://gco.iarc.fr/today>, [15.12.2020].
2. Wang N., Liu W., Zheng Y., *CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling*, *Cell Death Dis.*, 9(9), 2018, s. 880.
3. Wu J., Liu X.J., Hu J.N., *Transcriptomics and Prognosis Analysis to Identify Critical Biomarkers in Invasive Breast Carcinoma*, *Technol Cancer Res Treat.*, 19, 2020, 1533033820957011.
4. Saahene R.O., Wang J., Wang M.L., *The role of CXC chemokine ligand 4/CXC chemokine receptor 3-B in breast cancer progression*. *Biotech Histochem.*, 94(1), 2019, s. 53-59.
5. Divella R., Daniele A., Savino E., *Circulating levels of transforming growth factor- β (TGF- β) and chemokine (C-X-C motif) ligand-1 (CXCL1) as predictors of distant seeding of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer*, *Anticancer Res.*, 33(4), 2013, s. 1491-1497.
6. Bonecchi R., Graham G.J., *Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response*, *Front Immunol.*, 7, 2016, s. 224.
7. Korbecki J., Grochans S., Gutowska I., *CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands*, *Int J Mol Sci.*, 21(20), 2020, s. 7619.
8. Do H.T.T., Lee C.H., Cho J., *Chemokines and their Receptors: Multifaceted Roles in Cancer Progression and Potential Value as Cancer Prognostic Markers*, *Cancers (Basel)*, 12(2), 2020, s. 287.
9. Mazur G., Jaskuła E., Kryczek I., *Role of chemokines in neoplastic diseases*, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 13(2), 2004, s. 315-325.
10. Luster A.D., *Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation*, *N Engl J Med.*, 338, 1998, s. 436-445.
11. Waśniowska K., *Chemokiny – perspektywy zastosowania związków blokujących ich działanie w terapii*, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 58, 2004, s. 37-46.
12. Legler D.F., Thelen M., *Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function*, *Chimia (Aarau)*, 70(12), 2016, s. 856-859.
13. Murphy P.M., *Chemokines and Chemokine Receptors*, *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, Elsevier 2019, s.157-170.
14. Henc I., Bryl E., *Chemokiny jako ważne mediatory stanu zapalnego*, *Forum Medycyny Rodzinnej*, 7(5), 2013, s. 251-262.
15. Paul W.E., *Chemokines. Fundamental Immunology*, Lippincott, Williams & Wilkins, 2008, s. 805-833.
16. Schall T.J., Proudfoot A.E., *Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors*, *Nat Rev Immunol.*, 11(5), 2011, s. 355-363.
17. Chen C., Li J., Bot G., *Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor*, *Eur J Pharmacol.*, 483(2-3), 2004, s. 175-186.
18. Springael J.Y., Urizar E., Parmentier M., *Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences*, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16(6), 2005, s. 611-623.
19. Mellado M., Rodríguez-Frade J.M., Vila-Coro A.J., *Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways*, *EMBO J.*, 20(10), 2001, s. 2497-2507.
20. Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*, *Nature*, 382(6592), 1996, s. 635-638.

21. Bleul C.C., Fuhlbrigge R.C., Casasnovas J.M., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*, *J Exp Med.*, 184(3), 1996, s. 1101-1109.
22. Peled A., Petit I., Kollet O., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*, *Science*, 283(5403), 1999, s. 845-848.
23. Kim C.H., Broxmeyer H.E., *In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment*, *Blood*, 91(1), 1998, s. 100-110.
24. Shirozu M., Nakano T., Inazawa J., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*, *Genomics*, 28(3), 1995, s. 495-500.
25. Yoshie O., Imai T., Nomiyama H., *Chemokines in immunity*, *Adv Immunol.*, 78, 2001, s. 57-110.
26. Yu L., Cecil J., Peng S.B., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*, *Gene*, 374, 2006, s. 174-179.
27. DeVries M.E., Kelvin A.A., Xu L., *Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system*, *J Immunol.*, 176(1), 2006, s. 401-415.
28. Zlotnik A., Yoshie O., Nomiyama H., *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*, *Genome Biol.*, 7(12), 2006, s. 243.
29. Tachibana K., Hirota S., Iizasa H., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*, *Nature*, 393(6685), 1998, s. 591-594.
30. Ma Q., Jones D., Borghesani P.R., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 1998, s. 9448-9453.
31. Gerrits H., van Ingen Schenau D.S., Bakker N.E., *Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice*, *Genesis*, 46(5), 2008, s. 235-245.
32. Sierro F., Biben C., Martínez-Muñoz L., *Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(37), 2007, s. 14759-14764.
33. Power C.A., *Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo*, *J Immunol Methods*, 273(1-2), 2003, s. 73-82.
34. Pawig L., Klasen C., Weber C., *Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives*, *Front Immunol.*, 6, 2015, s. 429.
35. Heesen M., Berman M.A., Höpken U.E., *Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms*, *J Immunol.*, 158(8), 1997, s. 3561-3564.
36. Duquenne C., Psomas C., Gimenez S., *The two human CXCR4 isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains*, *J Immunol.*, 193(8), 2014, s. 4188-4194.
37. Gupta S.K., Pillarisetti K., *Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant*, *J Immunol.*, 163(5), 1999, s. 2368-2372.
38. Rubin J.B., *Chemokine signaling in cancer: one hump or two?*, *Semin Cancer Biol.*, 19(2), 2009, s. 116-122.
39. Soriano S.F., Serrano A., Hernanz-Falcón P., *Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses*, *Eur J Immunol.*, 33(5), 2003, s. 1328-1333.
40. Busillo J.M., Benovic J.L., *Regulation of CXCR4 signaling*, *Biochim Biophys Acta.*, 1768(4), 2007, s. 952-963.
41. Soldevila G., Licona I., Salgado A., *Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3*, *Immunology*, 112(2), 2004, s. 191-200.

42. Zhang X.F., Wang J.F., Matczak E., *Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells*, Blood, 97(11), 2001, s. 3342-3348.
43. Vila-Coro A.J., Rodríguez-Frade J.M., Martín De Ana A., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway*, FASEB J., 13(13), 1999, s. 1699-1710.
44. Moriguchi M., Hissong B.D., Gadina M., *CXCL12 signaling is independent of Jak2 and Jak3*, J Biol Chem., 280(17), 2005, s. 17408-17414.
45. Bachelierie F., Ben-Baruch A., Burkhardt A.M., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors [published correction appears in Pharmacol Rev. 2014 Apr;66(2):467]*, Pharmacol Rev., 66(1), 2013, s. 1-79.
46. Rajagopal S., Kim J., Ahn S., *Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7*, Proc Natl Acad Sci USA, 107(2), 2010, s. 628-632.
47. Balabanian K., Lagane B., Infantino S., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*, J Biol Chem., 280(42), 2005, s. 35760-35766.
48. Chen Q., Zhang M., Li Y., *CXCR7 Mediates Neural Progenitor Cells Migration to CXCL12 Independent of CXCR4*, Stem Cells, 33(8), 2015, s. 2574-2585.
49. Kumar R., Tripathi V., Ahmad M., *CXCR7 mediated G α independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells [published correction appears in Cell Immunol. 2014 Aug;290(2):251]*, Cell Immunol., 272(2), 2012, s. 230-241.
50. Wang Y., Li G., Stanco A., *CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration*, Neuron, 69(1), 2011, s. 61-76.
51. Klein K.R., Karpnich N.O., Espenschied S.T., *Decoy receptor CXCR7 modulates adrenomedullin-mediated cardiac and lymphatic vascular development*, Dev Cell, 30(5), 2014, s. 528-540.
52. Naumann U., Cameroni E., Pruenster M., *CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11*, PLoS One, 5(2), 2010, s. e9175.
53. Luker K.E., Lewin S.A., Mihalko L.A., *Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells*, Oncogene, 31(45), 2012, s. 4750-4758.
54. Wang H., Beaty N., Chen S., *The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12*, Blood, 119(2), 2012, s. 465-468.
55. Boldajipour B., Mahabaleswar H., Kardash E., *Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration*, Cell, 132(3), 2008, s. 463-473.
56. Miao Z., Luker K.E., Summers B.C., *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature*, Proc Natl Acad Sci USA, 104(40), 2007, s. 15735-15740.
57. Janssens R., Struyf S., Proost P., *The unique structural and functional features of CXCL12*, Cell Mol Immunol., 15(4), 2018, s. 299-311.
58. Schiraldi M., Raucii A., Muñoz L.M., *HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4*, J Exp Med., 209(3), 2012, s. 551-563.
59. von Hundelshausen P., Agten S.M., Eckardt V., *Chemokine interactome mapping enables tailored intervention in acute and chronic inflammation*, Sci Transl Med., 9(384), 2017, eaah6650.
60. Carlson J., Baxter S.A., Dréau D., *The heterodimerization of platelet-derived chemokines*, Biochim Biophys Acta., 1834(1), 2013, s. 158-168.

61. Décaillot F.M., Kazmi M.A., Lin Y., *CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration*, J Biol Chem., 286(37), 2011, s. 32188-32197.
62. Levoye A., Balabanian K., Baleux F., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling*, Blood, 113(24), 2009, s. 6085-6093.
63. Wang J., Shiozawa Y., Wang J., *The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer*, J Biol Chem., 283(7), 2008, s. 4283-4294.
64. Rueda P., Richart A., Récalde A., *Homeostatic and tissue repair defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions*, Circulation, 126(15), 2012, s. 1882-1895.
65. Sadir R., Imberty A., Baleux F., *Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV*, J Biol Chem., 279(42), 2004, s. 43854-43860.
66. Sadir R., Baleux F., Grosdidier A., *Characterization of the stromal cell-derived factor-1/alpha-heparin complex*, J Biol Chem., 276(11), 2001, s. 8288-8296.
67. Amara A., Lorthioir O., Valenzuela A., *Stromal cell-derived factor-1/alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine*, J Biol Chem., 274(34), 1999, s. 23916-23925.
68. Hernandez L., Magalhaes M.A., Coniglio S.J., *Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis*, Breast Cancer Res., 13(6), 2011, s. R128.
69. Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J., *Breast cancer*, Nat Rev Dis Primers., 5(1), 2019, s. 66.
70. Chow M.T., Luster A.D., *Chemokines in cancer*, Cancer Immunol Res., 2(12), 2014, s. 1125-1131.
71. Coussens L.M., Werb Z., *Inflammation and cancer*, Nature, 420(6917), 2002, s. 860-867.
72. Gonzalez H., Hagerling C., Werb Z., *Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression*, Genes Dev., 32(19-20), 2018, s. 1267-1284.
73. Greten F.R., Grivennikov S.I., *Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences*, Immunity, 51(1), 2019, s. 27-41.
74. Helbig G., Christopherson K.W.2nd, Bhat-Nakshatri P., *NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4*, J Biol Chem., 278(24), 2003, s. 21631-21638.
75. Maroni P., Bendinelli P., Matteucci E., *HGF induces CXCR4 and CXCL12-mediated tumor invasion through Ets1 and NF-kappaB*. Carcinogenesis, 28(2), 2007, s. 267-279.
76. Mukherjee D., Lu H., Yu L., *Krüppel-like factor 8 activates the transcription of C-X-C cytokine receptor type 4 to promote breast cancer cell invasion, transendothelial migration and metastasis*, Oncotarget, 7(17), 2016, s. 23552-23568.
77. Martinez-Ordoñez A., Seoane S., Cabezas P., *Breast cancer metastasis to liver and lung is facilitated by Pit-1-CXCL12-CXCR4 axis*, Oncogene, 37(11), 2018, s. 1430-1444.
78. Pan H., Peng Z., Lin J., *Forkhead box C1 boosts triple-negative breast cancer metastasis through activating the transcription of chemokine receptor-4*, Cancer Sci., 109(12), 2018, s. 3794-3804.
79. Inaguma S., Riku M., Ito H., *GLI1 orchestrates CXCR4/CXCR7 signaling to enhance migration and metastasis of breast cancer cells*, Oncotarget, 6(32), 2015, s. 33648-33657.
80. Sauvé K., Lepage J., Sanchez M., *Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway*, Cancer Res., 69(14), 2009, s. 5793-5800.
81. Rhodes L.V., Short S.P., Neel N.F., *Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer [published correction appears in Cancer Res. 2011 May 1;71(9):3432]*, Cancer Res., 71(2), 2011, s. 603-613.

82. Boudot A., Kerdivel G., Habauzit D., *Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells*, PLoS One, 6(6), 2011, s. e20898.
83. Arwert E.N., Harney A.S., Entenberg D., *A Unidirectional Transition from Migratory to Perivascular Macrophage Is Required for Tumor Cell Intravasation*, Cell Rep., 23(5), 2018, s. 1239-1248.
84. Yan M., Jene N., Byrne D., *Recruitment of regulatory T cells is correlated with hypoxia-induced CXCR4 expression, and is associated with poor prognosis in basal-like breast cancers*, Breast Cancer Res., 13(2), 2011, s. R47.
85. Costa A., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., *Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer*, Cancer Cell, 33(3), 2018, s. 463-479.e10.
86. Williams S.A., Harata-Lee Y., Comerford I., *Multiple functions of CXCL12 in a syngeneic model of breast cancer*, Mol Cancer, 9, 2010, s. 250.
87. Pein M., Insua-Rodríguez J., Hongu T., *Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs*, Nat Commun., 11(1), 2020, s. 1494.
88. Orimo A., Weinberg R.A., *Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type*, Cell Cycle, 5(15), 2006, s. 1597-1601.
89. Boesch M., Onder L., Cheng H.W., *Interleukin 7-expressing fibroblasts promote breast cancer growth through sustenance of tumor cell stemness*, Oncoimmunology, 7(4), 2018, s. e1414129.
90. Chung B., Esmaeili A.A., Gopalakrishna-Pillai S., *Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12*, NPJ Breast Cancer, 3, 2017, s. 6.
91. Ahirwar D.K., Nasser M.W., Ouseph M.M., *Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation*, Oncogene, 37(32), 2018, s. 4428-4442.
92. Chang C.W., Seibel A.J., Avendano A., *Distinguishing Specific CXCL12 Isoforms on Their Angiogenesis and Vascular Permeability Promoting Properties*, Adv Healthc Mater, 9(4), 2020, s. e1901399.
93. Boimel P.J., Smirnova T., Zhou Z.N., *Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells*, Breast Cancer Res., 14(1), 2012, s. R23.
94. Kobayashi K., Sato K., Kida T., *Stromal cell-derived factor-1 α /C-X-C chemokine receptor type 4 axis promotes endothelial cell barrier integrity via phosphoinositide 3-kinase and Rac1 activation*, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 34(8), 2014, s. 1716-1722.
95. Cheng Y.H., Eby J.M., LaPorte H.M., *Effects of cognate, non-cognate and synthetic CXCR4 and ACKR3 ligands on human lung endothelial cell barrier function*, PLoS One, 12(11), 2017, s. e0187949.
96. Dvorak K.M., Pettee K.M., Rubinic-Minotti K., *Carcinoma associated fibroblasts (CAFs) promote breast cancer motility by suppressing mammalian Diaphanous-related formin-2 (mDia2)*, PLoS One, 13(3), 2018, s. e0195278.
97. Singh S., Ray L.A., Shahi Thakuri P., *Organotypic breast tumor model elucidates dynamic remodeling of tumor microenvironment*, Biomaterials, 238, 2020, s. 119853.
98. Stuelten C.H., Parent C.A., Montell D.J., *Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms*, Nat Rev Cancer, 18(5), 2018, s. 296-312.
99. Lopez-Haber C., Barrio-Real L., Casado-Medrano V., *Heregulin/ErbB3 Signaling Enhances CXCR4-Driven Rac1 Activation and Breast Cancer Cell Motility via Hypoxia-Inducible Factor 1 α* , Mol Cell Biol., 36(15), 2016, s. 2011-2026.

100. Mills S.C., Howell L., Beekman A., *Rac1 plays a role in CXCL12 but not CCL3-induced chemotaxis and Rac1 GEF inhibitor NSC23766 has off target effects on CXCR4*, Cell Signal., 42, 2018, s. 88-96.
101. Kurokawa K., Itoh R.E., Yoshizaki H., *Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor*, Mol Biol Cell., 15(3), 2004, s. 1003-1010.
102. Müller A., Homey B., Soto H., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*, Nature, 410(6824), 2001, s. 50-56.
103. Pasquier J., Abu-Kaoud N., Abdesselem H., *SDF-1alpha concentration dependent modulation of RhoA and Rac1 modifies breast cancer and stromal cells interaction*, BMC Cancer, 15, 2015, s. 569.
104. Gründker C., Bauerschmitz G., Knapp J., *Inhibition of SDF-1/CXCR4-induced epithelial-mesenchymal transition by kisspeptin-10*, Breast Cancer Res Treat., 152(1), 2015, s. 41-50.
105. Yang F., Takagaki Y., Yoshitomi Y., *Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis*, Cancer Res., 79(4), 2019, s. 735-746.
106. Aversa I., Zolea F., Ieranò C., *Epithelial-to-mesenchymal transition in FHC-silenced cells: the role of CXCR4/CXCL12 axis*, J Exp Clin Cancer Res., 36(1), 2017, s. 104.
107. Zielińska K.A., Katanaev V.L., *The Signaling Duo CXCL12 and CXCR4: Chemokine Fuel for Breast Cancer Tumorigenesis*, Cancers (Basel), 12(10), 2020, s. 3071.
108. Gadalla R., Hassan H., Ibrahim S.A., *Tumor microenvironmental plasmacytoid dendritic cells contribute to breast cancer lymph node metastasis via CXCR4/SDF-1 axis*, Breast Cancer Res Treat., 174(3), 2019, s. 679-691.
109. Gu Y., Liu Y., Fu L., *Tumor-educated B cells selectively promote breast cancer lymph node metastasis by HSPA4-targeting IgG*, Nat Med., 25(2), 2019, s. 312-322.
110. Kaverina N., Borovjagin A.V., Kadagidze Z., *Astrocytes promote progression of breast cancer metastases to the brain via a KISS1-mediated autophagy*, Autophagy, 13(11), 2017, s. 1905-1923.
111. Yu P.F., Huang Y., Xu C.L., *Downregulation of CXCL12 in mesenchymal stromal cells by TGFβ promotes breast cancer metastasis*, Oncogene, Feb 9;36(6), 2017, s. 840-849.
112. Seoane S., Martinez-Ordoñez A., Eiro N., *POU1F1 transcription factor promotes breast cancer metastasis via recruitment and polarization of macrophages*, J Pathol., 249(3), 2019, s. 381-394.
113. Zhang J., Chen J., Wo D., *LRP6 Ectodomain Prevents SDF-1/CXCR4-Induced Breast Cancer Metastasis to Lung*, Clin Cancer Res., 25(15), 2019, s. 4832-4845.
114. Wendel C., Hemping-Bovenkerk A., Krasnyanska J., *CXCR4/CXCL12 participate in extravasation of metastasizing breast cancer cells within the liver in a rat model*, PLoS One, 7(1), 2012, s. e30046.
115. Price T.T., Burness M.L., Sivan A., *Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone*, Sci Transl Med., 8(340), 2016, s. 340ra73.
116. Masuda T., Endo M., Yamamoto Y., *ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling [published correction appears in Sci Rep. 2015;5:9789]*, Sci Rep., 5, 2015, s. 9170.
117. Devignes C.S., Aslan Y., Brenot A., *HIF signaling in osteoblast-lineage cells promotes systemic breast cancer growth and metastasis in mice*, Proc Natl Acad Sci USA, 115(5), 2018, s. E992-E1001.
118. Fritsche H., Heilmann T., Tower R.J., *TRAIL-R2 promotes skeletal metastasis in a breast cancer xenograft mouse model*, Oncotarget, 6(11), 2015, s. 9502-9516.

119. Ham S.L., Thakuri P.S., Plaster M., *Three-dimensional tumor model mimics stromal - breast cancer cells signaling*, *Oncotarget*, 9(1), 2017, s. 249-267.
120. Li Q., Qin T., Bi Z., *Rac1 activates non-oxidative pentose phosphate pathway to induce chemoresistance of breast cancer*, *Nat Commun.*, 11(1), 2020, s. 1456.
121. Yang Q.L., Zhang L.Y., Wang H.F., *The N-terminal polypeptide derived from viral macrophage inflammatory protein II reverses breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition via a PDGFR α -dependent mechanism*, *Oncotarget*, 8(23), 2017, s. 37448-37463.
122. Saha S.K., Kim K., Yang G.M., *Cytokeratin 19 (KRT19) has a Role in the Reprogramming of Cancer Stem Cell-Like Cells to Less Aggressive and More Drug-Sensitive Cells*, *Int J Mol Sci.*, 19(5), 2018, s. 1423.
123. Chen I.X., Chauhan V.P., Posada J., *Blocking CXCR4 alleviates desmoplasia, increases T-lymphocyte infiltration, and improves immunotherapy in metastatic breast cancer*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 116(10), 2019, s. 4558-4566.
124. Saloustros E., Perraki M., Apostolaki S., *Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse*, *Breast Cancer Res.*, 13(3), 2011, s. R60.

Znaczenie chemokiny CXCL12 w raku piersi

Streszczenie

W ostatnich latach szlak sygnałowy CXCL12/CXCR4 stał się kluczowym elementem procesu nowotworzenia w przypadku raka piersi. Ścieżka ta uczestniczy we wszystkich etapach rozwoju nowotworu piersi, w tym w proliferacji komórek nowotworowych, regulacji ich ruchliwości i zdolności do tworzenia przerzutów do narządów odległych oraz oporności na stosowane leczenie. Ponadto, kaskada CXCL12/CXCR4 oddziałuje zarówno na komórki immunologiczne, jak i komórki zrębu guza, tworząc mikrośrodowisko wspierające rozwój nowotworu. W niniejszym opracowaniu przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat roli sygnalizacji CXCL12/CXCR4/ACKR3.

Słowa kluczowe: CXCL12, SDF-1, CXCR4, rak piersi, ACKR3

Role of the chemokine CXCL12 in breast cancer

Abstract

In recent years, the CXCL12/CXCR4 signaling pathway has become a crucial part of the tumorigenesis process in breast cancer. This pathway is participating in all stages of breast cancer development, including tumor cell proliferation, regulation of tumor cell motility and ability to metastasize to distant organs or even treatment resistance. Moreover, the CXCL12/CXCR4 cascade interacts with both immune cells and tumor stroma cells in order to provide a microenvironment supporting tumor growth. This review summarizes the current literature on the role of CXCL12/CXCR4/ACKR3 axis signaling.

Keywords: CXCL12, SDF-1, CXCR4, breast cancer, ACKR3

Histopatologiczna ocena raka piersi, wykorzystanie rezonansu magnetycznego w diagnostyce raków piersi oraz terapia fotodynamiczna jako obiecująca metoda leczenia

1. Wstęp

Rak piersi jest jednym z najczęstszych nowotworów u kobiet na całym świecie. W leczeniu raka piersi zwykle stosuje się chirurgię wspomaganą chemioterapią i/lub radioterapią. Niestety te trzy metody mają wiele skutków ubocznych i bardzo często znacząco pogarszają jakość życia pacjentów. Dlatego w tym przeglądzie dokonaliśmy dyskusji dotychczasowych wyników w diagnostyce raków piersi oraz terapii fotodynamicznej.

Naciekające raki piersi, w których nawrót występuje 10 lat lub później po operacji, zawierają komórki nowotworowe o charakterystycznej morfologii [1-5]. Progresja raka u ludzi jest trudna do wywnioskowania, ponieważ nie badamy rutynowo pacjentów na wielu etapach choroby [6]. Terapia fotodynamiczna (PDT) może mieć znaczenie kliniczne u chorych na raka piersi z miejscowymi nawrotami lub przerzutami. Istnieje jednak zapotrzebowanie na ulepszone fotouczulacze, które są skuteczne w połączeniu ze światłem laserowym i mają niewiele, jeśli w ogóle, skutków ubocznych. PDT dało prawie całkowite zabicie komórek przy stężeniach m-THPC, które nie są toksyczne *in vitro* [7]. PDT to nowa metoda, która wykorzystuje fotouczulacz i światło do selektywnego niszczenia komórek nowotworowych [8].

2. Przegląd poglądów na temat histopatologicznej oceny raka piersi, wykorzystania rezonansu magnetycznego w diagnostyce raków piersi oraz terapii fotodynamicznej

Terapia fotodynamiczna (PDT) nowotworów złośliwych jest nową techniką leczenia raka. Po wstrzyknięciu dożylnym, fotouczulacz jest selektywnie zatrzymywany przez komórki guza, więc z czasem w guzie jest więcej uczulacza niż w normalnej sąsiadującej tkance. Fotouczulacz musi być zdolny do pochłaniania fali światła, które do niego dociera, a ilość światła docierającego do fotouczulacza zależy od właściwości tkanki, przez którą przechodzi. Pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali czynnik uczulający wytwarza aktywowane formy tlenu, tlen singletowy, który utlenia krytyczne elementy komórek nowotworowych. Terapia fotodynamiczna jest całko-

¹ Kliniczny Szpital Wojewódzki im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie, Kolegium Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych, Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Uniwersytet Rzeszowski.

² Zakład Fotomedycyny i Chemii Fizycznej, Kolegium Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych, Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Uniwersytet Rzeszowski.

³ Zakład Biochemii i Chemii Ogólnej, Kolegium Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych, Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Uniwersytet Rzeszowski.

wicie nową metodą leczenia, a jej rozwój można porównać do odkrycia antybiotyków. To dopiero początek, a możliwości jego wykorzystania ogranicza jedynie wyobraźnia [9]. PDT staje się skuteczną metodą leczenia raka, rośnie zainteresowanie identyfikacją krytycznych mechanizmów zabijania komórek i poznaniem podstaw skutecznych fotouczulaczy. Istnienie wielu celów komórkowych utrudnia odróżnienie krytycznych zdarzeń prowadzących do śmierci komórki od PDT. Jednak dzięki bardziej czułym technikom wykrywania lokalizacji fotouczulacza, izolacji mutantów opornych i wrażliwych na PDT oraz zastosowaniu innowacyjnych strategii molekularnych i biochemicznych do mapowania zdarzeń komórkowych zachodzących podczas i po fotouczulaniu, z chaosu wyłania się pewien porządek. Subkomórkowa lokalizacja wielu fotouczulaczy i wczesne reakcje na aktywację światła wskazują, że mitochondria odgrywa główną rolę w fotodynamicznej śmierci komórki. PDT z wieloma środkami, które uszkodzają lub hamują różne lub liczne cele mitochondrialne, ma wiele pożądanых cech skutecznej terapii przeciwnowotworowej [10]. Aby określić początkowe miejsca fotouszkodzeń podczas leczenia fotodynamicznego za pośrednictwem preparatu Foscan, oceniliśmy aktywność enzymatyczną w wybranych organellach bezpośrednio po ekspozycji komórek MCF-7 na światło [11]. Pomiar wykazały, że enzymy znajdujące się w aparacie Golgiego (transferazy urydyno-5'-difosforanogalaktozylowej) oraz w siateczce endoplazmatycznej (ER) (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy [zredukowany] [NADH] cytochrom c [cyt c] reduktaza) są dezaktywowane przez leczenie, podczas gdy mitochondrialne enzymy markerowe (oksydaza cyt c i dehydrogenazy) nie uległy zmianie [11]. Leczenie fotodynamiczne prowadzono przez napromienianie komórek MCF-7 wstępnie obciążonych indocyjaninową zielenią za pomocą źródła lasera diodowego IR przy 805 nm [11]. Główne zastosowania terapii fotodynamicznej (PDT) w dermatologii obejmują raka skóry innego niż czerniak i jego prekursor, trądzik pospolity, fotoodmładzanie i ropne zapalenie gruczołu krokowego. PDT jest leczonych wiele innych jednostek dermatologicznych, w tym łuszczyca, liszaj płaski, liszaj twardzinowy, twardzina skóry, chłoniak skórny z komórek T, łysienie plackowate, brodawka pospolita, choroba Dariera i infekcje grzybicze [12]. Dwudziestoczerogodzinna inkubacja dała zależną od fluencji wzmocnioną indukcję rezydującego w ER białka regulowanego przez glukozę 78 (Bip/GRP78), wraz ze słabym uszkodzeniem mitochondriów, podkreślając tym samym ER jako główne miejsce fotouszkodzeń po przedłużonej inkubacji [12]. W połączeniu z napromienianiem laserem He-Ne, efekty leczenia C-PC zostały jeszcze bardziej wzmocnione. Ułatwienie transdukcji sygnałów apoptozy i ostatecznie prowadzące do apoptozy komórek MCF-7 może być mechanizmem przeciwnowotworowego działania PDT za pośrednictwem C-PC [13]. Apoptoza odgrywa główną rolę w indukowanym przez PDT-HMME zmniejszeniu żywotności komórek CHMm [14]. Koniugaty porfiryny i poliaminy mogą być obiecującymi środkami fototerapeutycznymi [15]. Obecne terapie mają znaczne ograniczenia ze względu na wysokie ryzyko uszkodzenia rdzenia kręgowego. Atrakcyjną alternatywą jest terapia fotodynamiczna zapewniająca nieinwazyjne i selektywne leczenie. Jednak obecne fotouczulacze są ograniczone przez ich niespecyficzną akumulację. Fotodynamiczne latamie molekularne (PPMMPB), aktywowane przez MMP, oferują inny poziom selektywności PDT i naprowadzania na obraz, chroniąc krytyczne tkanki, w szczególności rdzeń kręgowy [16]. Skuteczne terapie, które nie tylko zmniejszyłyby wysoką śmiertelność

związaną z chorobą, ale także poprawiłyby jakość życia, których wciąż poszukują pacjenci z rakiem piersi. PDT jest jedną z alternatywnych metod leczenia nowotworów, takich jak nowotwory pęcherza, przełyku, dróg oddechowych i ginekologii [17].

PDT zyskuje coraz większe uznanie w leczeniu raka piersi, ponieważ zapewnia miejscową selektywność i mniejsze toksyczne skutki uboczne w porównaniu z radioterapią i chemioterapią [18]. PDT jest stosunkowo nową metodą terapii przeciwnowotworowej. Jej dominującym mechanizmem działania jest nadprodukcja reaktywnych form tlenu wywołana stresem oksydacyjnym w komórkach złośliwych, które atakują błony lipidowe, białka i kwasy nukleinowe. Wiele nowotworów wykorzystuje NO do przeżycia i sygnalizacji wzrostu, a także do udaremniania efektów terapii, w tym PDT. Ta perspektywa przedstawia pokrótce to, co obecnie wiadomo o negatywnym wpływie NO na PDT i niektóre z zaangażowanych mechanizmów sygnalizacyjnych [19]. Terapia fotodynamiczna (PDT) to małoinwazyjna, zatwierdzona przez FDA terapia do leczenia dostępnych dla światła raków wewnątrzskrzelowych i przełyku. Stosowanie PDT jest niedostatecznie zbadane w przypadku raka piersi, ale zaproponowano je w leczeniu podtypów, dla których terapia celowana jest niedostępna [20].

PDT zabija komórki rakowe, przekształcając tlen nowotworowy w reaktywny tlen singletowy przy użyciu fotouczulacza [21]. Oporność wielolekowa (MDR) raka piersi jest główną przeszkodą w chemioterapii. W leczeniu PDT jest uznaną klinicznie i wysoce ewoluującą metodą leczenia raka. PDT wykorzystuje lek reagujący na światło zwany fotouczulaczem, który wybiórczo niszczy komórki guza po napromieniowaniu światłem [22]. W badaniu opisano wielofunkcyjną nanopłatformę opartą na mezoporowatym nanoporowatym złotym rdzeniu pokrytym krzemionką (AuNR @ MSN) w celu pokonania biologicznych barier związanych z nanonośnikiem w celu wielokrotnej wzmocnionej terapii fotodynamicznej (PDT) i terapii fototermicznej [23]. Heterogeniczność raka piersi umożliwia współlistnienie komórek o różnych fenotypach, przyczyniając się do niepowodzenia leczenia i rozwoju lekooporności. Ponadto, nieprawidłowe przewodzenie sygnałów i dysfunkcyjne geny naprawy DNA są typowymi cechami oporności na raka piersi [23]. Oporność chemiczna raka piersi związana ze zdarzeniami związanymi z opornością wielolekową wykorzystuje transportery wypływu z kasetą wiążącą ATP (ABC) w celu zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia leku [23]. Rozprzestrzenianie się pierwotnego nowotworu złośliwego jest główną przyczyną większości zgonów związanych z rakiem. Do dziś schemat leczenia i dostępne leki są nadal niewystarczające, aby poradzić sobie z tymi schorzeniami. W pracy przedstawiono nową koncepcję terapeutyczną opartą na terapii fotodynamicznej (PDT) komórek inicjujących przerzuty [24]. Brak skutecznych metod leczenia agresywnego raka piersi jest nadal głównym globalnym problemem zdrowotnym. Wcześniej informowaliśmy, że terapia fotodynamiczna z użyciem błękitu metylenowego jako fotouczulacza (MB-PDT) masowo zabija przerzutowego raka piersi u ludzi, nieznacznie wpływając na zdrowe komórki [24]. Leczenie raka piersi jest często nieskuteczne ze względu na ochronę mikrośrodowiska guza i niską immunogenność komórek nowotworowych, co prowadzi do słabego efektu terapeutycznego. W tym badaniu zaprojektowaliśmy platformę nano-teranostyczną dla tych przeszkód: efekt fototermiczny, w którym pośredniczy złota powłoka, może przebudować mikrośrodowisko guza poprzez zmniejszenie liczby fibroblastów związanych z rakiem (CAF) i promować

uwalnianie doksorubicyny (DOX) z nanocząstek [25]. Bariera krew-mózg jest główną przeszkodą w rozwoju skutecznej diagnostyki i terapii nowotworów mózgu i innych chorób ośrodkowego układu nerwowego [26]. W niniejszym raporcie przedstawiono i potwierdzono nową metodę opartą na dyfuzyjnym MRI, zwaną cytometrią MRI, która może nieinwazyjnie mapować intravoxel, nieparametryczne rozkłady wielkości komórek w tkankach [26]. Środki zaburzające funkcjonowanie układu naczyniowego uszkadzają naczynia guza, blokując odżywienie i dopływ tlenu, którego guzy potrzebują do rozwoju. Osiąga się to poprzez uszkodzenie wyściółki śródbłonka naczyń krwionośnych, w wyniku czego czerwone krwinki dostają się do mięszu guza [27]. Komórki macierzyste są wykorzystywane jako środki przeciwnowotworowe ze względu na ich zdolność do gromadzenia się i integracji w nowotworach. Metody zwiększania naprowadzania komórek macierzystych na guzy są badane w celu zwiększenia skuteczności leczenia. Jednak obecnie nie jest możliwa ocena zarówno lokalizacji, jak i żywotności komórek po wszczepieniu, co utrudnia optymalizację terapii [28]. Określenie dokładnej lokalizacji komórek i dynamiki ich migracji ma ogromne znaczenie dla osiągnięcia terapeutycznego potencjału komórek po implantacji do gospodarza. Rezonans magnetyczny jest odpowiednią, nieinwazyjną techniką monitorowania komórek w połączeniu ze środkami kontrastowymi [29]. Nanomedycyna to obiecujące nowe podejście do leczenia raka, które pozwala uniknąć wad tradycyjnej chemioterapii i poprawia wskaźniki terapeutyczne. Jednak brak technologii obrazowania wizualizacji w czasie rzeczywistym do monitorowania dystrybucji leków znacznie ogranicza jej zastosowanie kliniczne [30]. Leczenie raka piersi zwykle wiąże się ze znacznym stresem psychicznym. W tym badaniu zbadaliśmy wpływ terapii relaksacyjno-wizualizacyjnej na dystres psychiczny, poziom kortyzolu i parametry immunologiczne pacjentów z rakiem piersi poddawanych radioterapii [31, 32]. Czasy relaksacji protonowego rezonansu magnetycznego (PMR) mierzono dla wypreparowanej złośliwej i normalnej tkanki pochodzącej od pacjentów z rakiem piersi. Pomiar czasu relaksacji (T1, T2) przeprowadzono przy częstotliwości RF 20 MHz i w temperaturze 27 stopni C za pomocą analizatora Bruker PC 120 NMR Process. Typy tkanek potwierdzono badaniem histopatologicznym. Ogólnie stwierdzono, że wartości T1 są dłuższe w przypadku tkanek złośliwych w porównaniu z prawidłowymi tkankami, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami. Zmierzone wartości T2 nie wykazują złośliwych tkanek powyżej. Procent zawartości wody mierzono również w tkance prawidłowej i złośliwej i stwierdzono, że jest on znacznie większy w tkance guza w porównaniu z tkanką prawidłową. Wyniki te omówiono na podstawie dwóch frakcyjnych modeli szybkiej wymiany cząsteczek wody i potwierdzają, że pomiar czasu relaksacji PMR odgrywa ważną rolę w różnicowaniu tkanek nowotworowych od prawidłowych [33, 34]. Wygodne do podawania i eksperymentów MRI, zarówno EPTA-Gd, jak i EPTA-Eu są rozpuszczalne w wodzie. EPTA-Gd selektywnie wiąże się z mikromolarnym powinowactwem do receptora estrogenu i indukuje proliferację ludzkich komórek raka piersi [35].

W podsumowaniu ukazano pracę onkologów i naukowców na całym świecie poszukujących metod dostarczania leków bezpośrednio do komórek nowotworowych, a nie zdrowych, aby zminimalizować szkody dokonane przez toksyczny tlen.

Literatura

1. Kallenberger A., Dolinar Z., Haggmann A., *Chromatinstrukturen in den Zellkernen von Mammakarzinomen [Chromatin structure in cell nuclei of breast carcinomas]*, Verh Anat Ges., 61, 1966, s. 589-591.
2. Wright E.A., *The estimation of the proportion of cancer cells in samples of breast tumours*, Br J Cancer, 21(4), 1967, s. 726-729.
3. Gewant W.C., Goldenberg I.S., *Techniques of human breast neoplasm cell culture*, Eur Surg Res., 2(5), 1970, s. 392-400.
4. Song J., From P., Morrissey W.J., Sams J., *Circulating cancer cells: pre- and post-chemotherapy observations*, Cancer, 28(3), 1971, s. 553-561.
5. Hartveit F., *Prognostic typing in breast cancer*, Br Med J., 4(5782), 1971, s. 253-257.
6. La Porta C.A., Zapperi S., *Human breast and melanoma cancer stem cells biomarkers*, Cancer Lett., 338(1), 2013, s. 69-73.
7. Koechli O.R., Schaer G.N., Schenk V., Haller U., Walt H., *Assessment of effect of photosensitizers on cytotoxicity of photodynamic therapy in human breast cancer cell cultures*, Arch Gynecol Obstet., 256(4), 1995, s. 167-176.
8. Taber S.W., Fingar V.H., Wieman T.J., *Photodynamic therapy for palliation of chest wall recurrence in patients with breast cancer*, J Surg Oncol., 68(4), 1998, s. 209-214.
9. McCaughan J.S. Jr., *Photodynamic therapy: a review*, Drugs Aging, 15(1), 1999, s. 49-68.
10. Morgan J., Oseroff A.R., *Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy*, Adv Drug Deliv Rev., 49(1-2), 2001, s. 71-86.
11. Teiten M.H., Marchal S., D'Hallewin M.A., Guillemin F., Bezdetnaya L., *Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cell*, Photochem Photobiol., 78(1), 2003, s. 9-14.
12. Crescenzi E., Varriale L., Iovino M., Chiaviello A., Veneziani B.M., Palumbo G., *Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells*, Mol Cancer Ther., 3(5), 2004, s. 537-544.
13. Taub A.F., *Photodynamic therapy: other uses* Dermatol Clin., 25(1), 2007, s. 101-109.
14. Marchal S., François A., Dumas D., Guillemin F., Bezdetnaya L., *Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells*, Br J Cancer, 96(6), 2007, s. 944-951.
15. Li B., Chu X., Gao M., Li W., *Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoerythrin*, Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 42(1), 2010, s. 80-89.
16. Liu Y., Ma X.Q., Jin P., Li H.T., Zhang R.R., Ren X.L., Wang H.B., Tang D., Tian W.R., *Apoptosis induced by hematoporphyrin monomethyl ether combined with He-Ne laser irradiation in vitro on canine breast cancer cells* Vet J., 188(3), 2011, s. 325-330.
17. Sarrazy V., Garcia G., MBakidi J.P., Morvan C.L., Bégau-Grimaud G., Granet R., Sol V., Krausz P., *Photodynamic effects of porphyrin-polyamine conjugates in human breast cancer and keratinocyte cell lines*, J Photochem Photobiol B., 103(3), 2011, s. 201-206.
18. Liu T.W., Akens M.K., Chen J., Wise-Milestone L., Wilson B.C., Zheng G., *Imaging of specific activation of photodynamic molecular beacons in breast cancer vertebral metastases*, Bioconjug Chem., 22(6), 2011, s. 1021-1030.
19. Płonka J., Latocha M., *Terapia fotodynamiczna w leczeniu raka piersi [Photodynamic therapy in the treatment of breast cancer]*, Pol Merkur Lekarski, 33(195), 2012, s. 173-175.
20. Khanal A., Bui M.P., Seo S.S., *Microgel-encapsulated methylene blue for the treatment of breast cancer cells by photodynamic therapy*, J Breast Cancer, 17(1), 2014, s. 18-24.
21. Saczko J., Choromańska A., Rembiałkowska N., Dubińska-Magiera M., Bednarz-Misa I., Bar J., Marcinkowska A., Kulbacka J., *Oxidative modification induced by photodynamic therapy with Photofrin®II and 2-methoxyestradiol in human ovarian clear carcinoma*

- (OvBH-1) and human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells, *Biomed Pharmacother*, 71, 2015, s. 30-36.
22. Girotti A.W., *Tumor-generated nitric oxide as an antagonist of photodynamic therapy*, *Photochem Photobiol Sci.*, 14(8), 2015, s. 1425-1432.
 23. Aggarwal N., Santiago A.M., Kessel D., Sloane B.F., *Photodynamic therapy as an effective therapeutic approach in MAME models of inflammatory breast cancer*, *Breast Cancer Res Treat.*, 154(2), 2015, s. 251-262.
 24. Cheng Y., Cheng H., Jiang C., Qiu X., Wang K., Huan W., Yuan A., Wu J., Hu Y., *Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy*, *Nat Commun.*, 6, 2015, s. 8785.
 25. Wang H., Li L., Wang P., Wang X., Zhang K., Liu Q., *Comparison of photodynamic treatment produced cell damage between human breast cancer cell MCF-7 and its multidrug resistance cell*, *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 16, 2016, s. 1-8.
 26. Saneesh Babu P.S., Manu P.M., Dhanya T.J., Tapas P., Meera R.N., Surendran A., Aneesh K.A., Vadakkancheril S.J., Ramaiah D., Nair S.A., Pillai M.R., *Bis(3,5-diiodo-2,4,6-trihydroxyphenyl)squaraine photodynamic therapy disrupts redox homeostasis and induce mitochondria-mediated apoptosis in human breast cancer cells*, *Sci Rep.*, 7, 2017, s. 42126.
 27. Liu J., Liang H., Li M., Luo Z., Zhang J., Guo X., Cai K., *Tumor acidity activating multifunctional nanoplatform for NIR-mediated multiple enhanced photodynamic and photothermal tumor therapy*, *Biomaterials*, 157, 2018, s. 107-124.
 28. Anigo E.C., Plackal Adimuriyil George B., Abrahamse H., *The role of photodynamic therapy on multidrug resistant breast cancer*, *Cancer Cell Int.*, 19, 2019, s. 91.
 29. Raschpichler M., Preis E., Pinnapireddy S.R., Baghdan E., Poursaghar M., Schneider M., Bakowsky U., *Photodynamic inactivation of circulating tumor cells: An innovative approach against metastatic cancer*, *Eur J Pharm Biopharm.*, 157, 2020, s. 38-46.
 30. Dos Santos A.F., Inague A., Arini G.S., Terra L.F., Wailemann R.A.M., Pimentel A.C., Yoshinaga M.Y., Silva R.R., Severino D., de Almeida D.R.Q., Gomes V.M., Bruni-Cardoso A., Terra W.R., Miyamoto S., Baptista M.S., Labriola L., *Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells*, *Cell Death Dis.*, 11(12), 2020, s. 1070.
 31. Zheng D., Wan C., Yang H., Xu L., Dong Q., Du C., Du J., Li F., *Her2-Targeted Multifunctional Nano-Theranostic Platform Mediates Tumor Microenvironment Remodeling and Immune Activation for Breast Cancer Treatment*, *Int J Nanomedicine*, 15, 2020, s. 10007-10028.
 32. Sikpa D., Whittingstall L., Savard M., Lebel R., Côté J., McManus S., Chemtob S., Fortin D., Lepage M., Gobeil F., *Pharmacological Modulation of Blood-Brain Barrier Permeability by Kinin Analogs in Normal and Pathologic Conditions*, *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(10), 2020, s. 279.
 33. Xu J., Jiang X., Devan S.P., Arlinghaus L.R., McKinley E.T., Xie J., Zu Z., Wang Q., Chakravarthy A.B., Wang Y., Gore J.C., *MRI-cytometry: Mapping nonparametric cell size distributions using diffusion MRI*, *Magn Reson Med.*, 85(2), 2021, s. 748-761.
 34. Fadhel M.N., Appak Baskoy S., Wang Y., Hysi E., Kolios M.C., *Use of photoacoustic imaging for monitoring vascular disrupting cancer treatments*, *J Biophotonics*, 2020, 202000209.
 35. Zaw Thin M., Allan H., Bofinger R., Kostelec T.D., Guillaume S., Connell J.J., Patrick P.S., Hailes H.C., Tabor A.B., Lythgoe M.F., Stuckey D.J., Kalber T.L., *Multi-modal imaging probe for assessing the efficiency of stem cell delivery to orthotopic breast tumours*, *Nanoscale*, 12(31), 2020, s. 16570-16585.

36. Martínez-Banderas A.I., Aires A., Plaza-García S., Colás L., Moreno J.A., Ravasi T., Merzaban J.S., Ramos-Cabrer P., Cortajarena A.L., Kosel J., *Magnetic core-shell nanowires as MRI contrast agents for cell tracking*. *J Nanobiotechnology*, 18(1), 2020, s. 42.
37. Jia Y., Wang C., Zheng J., Lin G., Ni D., Shen Z., Huang B., Li Y., Guan J., Hong W., Chen Y., Wu R., *Novel nanomedicine with a chemical-exchange saturation transfer effect for breast cancer treatment in vivo*. *J Nanobiotechnology*, 17(1), 2019, s. 123.
38. Nunes D.F., Rodriguez A.L., da Silva Hoffmann F., Luz C., Braga Filho A.P., Muller M.C., Bauer M.E., *Relaxation and guided imagery program in patients with breast cancer undergoing radiotherapy is not associated with neuroimmunomodulatory effects*. *J Psychosom Res.*, 63(6), 2007, s. 647-655.
39. Fujimori A., Gupta M., Hoki Y., Pommier Y., *Acquired camptothecin resistance of human breast cancer MCF-7/C4 cells with normal topoisomerase I and elevated DNA repair*. *Mol Pharmacol*, 50(6), 1996, s. 1472-1478.
40. Arulmozhi V., Narayanan S., Krishnan B., Rao A.S., Veliath A.J., Ratnakar C., *Proton magnetic relaxation studies in normal and cancerous breast tissues*. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 20(4), 1988, s. 337-343.
41. Beall P.T., Cailleau R.M., Hazlewood C.F., *The relaxation times of water protons and division rate in human breast cancer cells: a possible relationship to survival*. *Physiol Chem Phys.*, 8(3), 1976, s. 281-284.
42. Gunanathan C., Pais A., Furman-Haran E., Seger D., Eyal E., Mukhopadhyay S., Ben-David Y., Leitus G., Cohen H., Vilan A., Degani H., Milstein D., *Water-soluble contrast agents targeted at the estrogen receptor for molecular magnetic resonance imaging*. *Bioconj Chem.*, 18(5), 2007, s. 1361-1365.

Histopatologiczna ocena raka piersi, wykorzystanie rezonansu magnetycznego w diagnostyce raków piersi oraz terapia fotodynamiczna jako obiecująca metoda leczenia

Streszczenie

Rak piersi stanowi poważny problem we współczesnym społeczeństwie. Zachorowalność na ten typ nowotworu ciągle wzrasta, podobnie jak umieralność. W chwili obecnej podstawą wczesnego wykrywania raka piersi jest diagnostyka obrazowa, w tym badania profilaktyczne wykonywane odpowiednio często. Nie są to jednak metody doskonałe i często różne typy morfologiczne zmian dają taki sam obraz. W celu ich zróżnicowania z rakiem niezbędne jest wykonanie badania histopatologicznego.

Słowa kluczowe: rak piersi, PDT, MRI

Histopathological assessment of breast cancer, the use of magnetic resonance imaging in the diagnosis of breast cancer and photodynamic therapy as a promising treatment method

Abstract

Breast cancer is a serious problem in modern society. The incidence of this type of cancer is constantly increasing, as is the mortality rate. At present, the basis for early detection of breast cancer is imaging diagnostics, including preventive examinations performed frequently enough. However, they are not perfect methods and often different types of morphological changes give the same picture. In order to differentiate them from cancer, a histopathological examination is necessary.

Keywords: breast cancer, PDT, MRI

Rola układu odpornościowego w patogenezie nowotworów jajnika

1. Wstęp

Rak jajnika należy do grupy nowotworów heterogennych o wielu typach histologicznych, spośród których najczęściej diagnozowany jest rak surowiczy (70%) [1]. Nowotwór ten zajmuje piąte miejsce pod względem liczby zachorowań w Polsce. W 2020 roku, zdiagnozowano 4669 nowych przypadków raka jajnika z powodu którego zmarło aż 3131 kobiet [2].

Pomimo trwających od lat licznych badań dotyczących poznania mechanizmów powstawania i rozwoju nowotworów jajnika, ciągłego doskonalenia metod diagnostycznych przydatnych we wczesnym wykrywaniu i monitorowaniu leczenia, wciąż istnieje konieczność prowadzenia dalszych badań celem ustalenia nowych strategii przydatnych w diagnostyce i monitorowaniu terapii tych nowotworów.

Obecnie jednym z najczęściej stosowanych markerów przydatnych w diagnostyce raka jajnika jest antygen CA125 (*carbohydrate antygen*), który jest glikoproteiną błonową, obecną na powierzchni wielu komórek – błony śluzowej kanału szyjki oraz jamy macicy, jak również na powierzchni komórek wyścielających jajowody. Podwyższone stężenie CA 125 występuje także w innych chorobach oraz stanach fizjologicznych takich jak: ciąża czy miesiączka [3]. Stopień wzrostu oraz częstość występowania podwyższonych stężeń tego markera zależy od typu histologicznego raka. Niekwestionowaną wartością ma natomiast oznaczenie stężenia tego antygeny w monitorowaniu terapii, weryfikacji do operacji sprawdzającej oraz we wczesnym wykrywaniu wznowy procesu nowotworowego [4].

HE4 (*Human Epididymis Protein 4*) to białko związane z hamowaniem aktywności proteaz. Największą ekspresję tego białka wykazują raki jajnika typu surowiczego i endometrialnego. Zwiększone stężenie obserwuje się również w przypadku innych zmian chorobowych – raku płuc, niewydolności nerek oraz gruczolakach endometrium [5]. Zastosowanie znalazła analiza stężenia Ca 125 oraz HE4 w postaci algorytmu ROMA.

Algorytm ROMA jest wykorzystywany do oceny zróżnicowania łagodnych i złośliwych nowotworów jajnika. We wczesnym stadium choroby rak ogranicza się do przydatków. Wczesne wykrycie zmiany znacznie zwiększa szansę na powodzenie terapii. ROMA jest zalecany u kobiet po 18 roku życia, u których wykryto zmianę nowotworową w obrębie jajnika. Przeciwwskazaniem do wykonania testu ROMA jest wiek poniżej 18 lat, aktualna chemioterapia i uprzednie leczenie nowotworowe [6].

¹ wstanczyk98@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Katedry i Zakładu Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

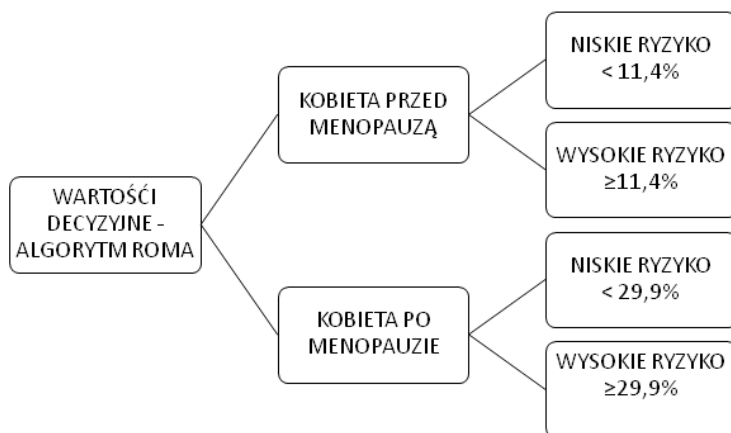
² oliwiasuslo@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Katedry i Zakładu Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

³ ola.odjas@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Katedry i Zakładu Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

Tabela 1. Algorytm obliczeniowy ROMA

Dla kobiet przed menopauzą $PI = -12,0 + 2,38 * LN(HE4) + 0,0626 * LN(CA125)$
Dla kobiet po menopauzie $PI = -8,09 + 1,04 * LN(HE4) + 0,7,32 * LN(CA125)$
$ROMA(\%) = \frac{e(PI) * 100}{1 + e(PI)}$ gdzie: PI – indeks predykcyjny, Ln – logarytm naturalny, e – podstawa logarytmu naturalnego

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [7]



Rycina 1. Interpretacja wyników testu ROMA [8]

2. Rozwinięcie

W myśl koncepcji immunoredagowania, w rozwoju nowotworu wyróżnia się trzy etapy – eliminację, równowagę i fazę ucieczki. W fazie eliminacji komórki nowotworowe prezentują własne antygeny, co indukuje odpowiedź przeciwnowotworową. Jeśli komórki nowotworowe nie zostaną w pełni usunięte, dochodzi do rozwoju fazy równowagi, gdzie eliminacja przez układ odpornościowy jest równa proliferacji komórek nowotworowych. W ostatniej fazie, fazie ucieczki, komórka nowotworowa „wymyka się” spod nadzoru immunologicznego [9].

Antygeny związane z nowotworem (TAA, *tumor-associated antigens*) prezentowane są limfocytom T w połączeniu z cząsteczkami MHC. W odpowiedzi przeciwnowotworowej istotną rolę odgrywają mechanizmy odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Ważnym elementem odpowiedzi komórkowej są limfocyty Th (limfocyty T pomocnicze, *helper T cells*), które rozpoznają TAA prezentowane w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. Dochodzi do aktywacji i wydzielania rozpuszczalnych mediatorów układu odpornościowego zwanych cytokinami, które wywierają działanie poprzez wiązanie się ze swoistymi receptorami na komórkach docelowych. Jedną z właściwości cytokin jest ich plejotropia, czyli oddziaływanie na wiele komórek i wywołanie wielu różnorodnych efektów. W przypadku odpowiedzi komórkowej przeciw

nowotworom cytokiny mogą bezpośrednio oddziaływać i niszczyć nieprawidłowe komórki lub powodować aktywację kolejnych komórek układu odpornościowego. Mechanizmy humoralne polegają na połączeniu antygeny z nowotworem ze swoistym przeciwciałem. Skutkuje to aktywacją układu dopełniacza lub przyciągnięciem komórek efektorowych zdolnych do cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał [9, 10].

2.1. Interleukina 1 (IL-1, *interleukin-1*)

Do rodziny interleukiny-1 (IL-1, *interleukin-1*) należy 11 różnych białek, których budowa jest do siebie bardzo zbliżona, a większość wykazuje właściwości prozapalne. Najlepiej zbadanymi białkami z tej rodziny jest interleukina-1 α (IL-1 α , *interleukin 1a*) oraz interleukina-1 β (IL-1 β , *interleukin 1b*). Różnią się one między sobą miejscem syntezy, a także kodowane są przez odrębne geny. Jednakże ze względu na swoją podobną aktywność biologiczną i oddziaływanie na ten sam receptor, określa się je wspólnie jako IL-1 [9].

Interleukina-1 jest związkami promującym nowotwór poprzez właściwości prozapalne, dodatkowo wpływa na ekspresję interleukiny 8, która wykazuje działanie proangiogenne, oraz cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*), co może sprzyjać powstawaniu przerzutów poprzez adhezję komórek zmienionych nowotworowo do śródbłonna naczyń [11]. Ponadto, reguluje ekspansję nowotworowych komórek macierzystych w mikrośrodkowisku guza, co utrudnia chemioterapię [12]. Jest wydzielana przez makrofagi M1, które są jednym z rodzajów komórek występujących w mikrośrodkowisku guza [13]. Interleukina – 1 β (IL-1 β , *interleukin 1b*) jest wydzielana przez monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne oraz komórki nowotworowe i jest syntetyzowana jako białko nieaktywne (pro-IL-1 β), staje się aktywna po wytworzeniu inflamasomu oraz aktywacji kaspazy 1. Wykazuje ona działanie plejotropowe. Wpływa na proliferację limfocytów B oraz powstawanie subpopulacji limfocytów T pomocniczych – Th17 (Th17, *T helper 17 lymphocyte*) [9].

Badania dotyczące oceny stężenia IL-1 β w moczu prowadzili Woolery i wsp. [14], którzy wykazali, że wraz z zaawansowaniem neoplazji zwiększa się stężenie IL-1 β . Ponadto, przeprowadzone badania wykazały, że stężenie IL-1 β było 3-6 razy wyższe u pacjentek z rakiem lub guzem łagodnym jajnika oraz z współwystępującym rakiem jajnika i/lub piersi w rodzinie w porównaniu do pacjentek bez dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku raka piersi i/lub jajnika.

2.2. Interleukina 2 (IL-2, *interleukin 2*)

Interleukina 2 pełni wiele ważnych funkcji w odpowiedzi immunologicznej. Reguluje aktywność limfocytów T, w tym indukuje proliferację limfocytów T cytotoksycznych (Tc, *Cytotoxic T lymphocyte*), stanowi czynnik wzrostu limfocytów T regulatorowych (Treg, *regulatory T lymphocyte*) oraz aktywuje komórki NK (*natural killer cells*). Ponadto, wpływa na syntezę interferonu typu II – IFN- γ (IFN- γ , *interferon- γ*) i interleukiny-6 (IL-6, *interleukin 6*) [9]. Interleukina 2 jest syntetyzowana przez subpopulacje limfocytów T – Th1 oraz Tc oraz aktywowane komórki dendrytyczne [15]. Może sprzyjać neoplazji poprzez stymulację syntezy cząsteczek CTLA-4 (antygen-4 związany z limfocytym T cytotoksycznym, *cytotoxic T-lymphocyte-associated*

antygen-4) oraz FASL (ligand FAS) na powierzchni limfocytów T [9]. Badanie przeprowadzone przez Macciò i wsp. [16] wykazało, że nieefektywna odpowiedź limfocytów T u pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika ma związek z wysokim stężeniem rozpuszczalnego receptora dla IL-2 w surowicy. Natomiast Jammal i wsp. [17] przeprowadzili badanie, w którym oceniono intensywność barwienia immunohistochemicznego za pomocą poliklonalnego przeciwciała anty-IL-2, wycinków tkankowych pobranych od pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem łagodnym lub złośliwym jajnika. Badanie wykazało, że wycinki nabłonka oraz zrębu nowotworu złośliwego jajnika wykazywały intensywniejsze barwienie w porównaniu do wycinków z nowotworów łagodnych. Ponadto, badacze wykazali, że intensywność barwienia wycinka zrębu raka jajnika była istotnie skorelowana z nowotworem słabo zróżnicowanym.

2.3. Interleukina 6 (IL-6, interleukin-6)

Interleukina 6 jest wydzielana przez makrofagi towarzyszące nowotworom, limfocyty T, komórki NK oraz przez zmienione nowotworowo komórki. Pełni funkcję regulacyjną reakcji ostrej fazy [9, 18]. Interleukina 6 występuje w mikrośrodkowisku raka jajnika, gdzie stymuluje naciekanie makrofagów w miejscu występowania guza oraz stanowi składnik płynu puchlinowego, którego nagromadzenie bardzo często towarzyszy złośliwym nowotworom jajnika. W płynie tym można oznaczyć stężenie IL-6. Badania wykazały, że stężenie IL-6 w wodobrzuszu koreluje ze stopniem zaawansowania choroby [19, 20].

Ciekawych obserwacji dostarczyły badania przeprowadzone przez Wertel i wsp. [19], które dotyczyły oceny wartości prognostycznej oznaczenia stężenia IL-6 w osoczu oraz płynie otrzewnowym u kobiet z nowotworem jajnika. Stężenie IL-6 w osoczu chorych na raka jajnika było istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej, natomiast różnica nie była istotna w porównaniu do grupy chorych z cystą surowiczą. Istotna statystycznie różnica była natomiast w przypadku oznaczenia stężenia IL-6 w płynie otrzewnowym w grupie chorych na raka jajnika w porównaniu do nowotworów niezłośliwych. Ponadto, wykazano istotnie wyższe stężenie IL-6 w płynie otrzewnowym u kobiet w stadium III-IV wg skali FIGO niż u pacjentek w stadium I-II.

Podobne badania przeprowadzili Dalal i wsp. [20], którzy oznaczyli stężenie IL-6 w płynie puchlinowym pobranym z jamy otrzewnej pacjentek z nabłonkowym rakiem jajnika oraz nowotworami niezłośliwymi. Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie IL-6 u pacjentek z nowotworem jajnika w stadium III i IV FIGO było znacznie wyższe niż w grupie chorych w stadium I i II. Ponadto, badacze zaobserwowali dodatnią istotnie statystyczną korelację pomiędzy wartością stężenia IL-6 w płynie puchlinowym a stopniem choroby według skali FIGO, obrazem klinicznym choroby oraz objętością płynu puchlinowego.

2.4. Interleukina 8 (IL-8, interleukin-8)

Interleukina 8 należy do rodziny chemokin CXC, jedną z jej biologicznych funkcji jest chemotaktyczne przyciąganie neutrofilów do miejsca przeznaczenia [9]. Zwiększona ekspresja IL-8 powiązana jest ze złym rokowaniem choroby, dzięki zdolności do chemotaksji immunosupresyjnych komórek szpiku [21]. Wydzielanie IL-8 przez komórki nowotworowe sprzyja progresji i tworzeniu przerzutów, dzięki właściwościom proangiogennym oraz indukcji ekspresji przez IL-8 czynnika wzrostu śródbłonnka naczyń

(VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Zmiany jej stężenia są wykorzystywane do oceny powodzenia terapii z wykorzystaniem inhibitorów punktów kontrolnych [21-23]. Sanguinete i wsp. [23] oceniali stężenia cytokin, w tym interleukiny 8, w celu określenia korelacji pomiędzy stężeniem IL-8 w surowicy, a czynnikami prognostycznymi u pacjentek z pierwotnym nowotworem jajnika. Ponadto, oznaczono również stosunek liczbowy neutrofilów do limfocytów (NLR, *neutrophil to lymphocyte ratio*) oraz trombocytów do limfocytów (PRL, *platelet to lymphocyte ratio*). Przeprowadzona analiza wykazała, że wyższe stężenie IL-8 koreluje z wartością wskaźników $NLR \geq 4$ oraz $PRL \geq 200$ oraz z stopniem IIIC.

Micheli i wsp. [24] oceniali stężenie cytokin, w tym interleukiny 8 oraz ekspresję receptora dla chemokin CXCR2 w granulocytach obojętnochłonnych w grupie kobiet ze zmianami nienowotworowymi (endometrioma oraz torbiele proste), w grupie z łagodną neoplazją (torbiel surowicza, potworniak torbielowaty, śluzowy gruczolak) oraz w grupie kobiet z nowotworami złośliwymi jajnika. Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie IL-8 było wyższe w grupie pacjentów z nowotworem łagodnym oraz złośliwym w porównaniu do grupy kontrolnej, oraz stwierdzono istotną statystycznie różnicę w stężeniu IL-8 oznaczonej w grupie chorych na nowotwór złośliwy w porównaniu do grupy pacjentów z nowotworem łagodnym. Bezwzględna liczba neutrofilów wyrażających CXCR2 była wyraźnie wyższa w grupie pacjentów z rakiem w porównaniu do grupy z nowotworem niezłośliwym oraz grupą kontrolną.

2.5. Interleukina 10 (IL-10, *interleukin-10*)

Interleukina 10 sprawuje kontrolę nad nasileniem odpowiedzi immunologicznej dzięki właściwościom przeciwzapalnym [9, 25]. Wykazuje wiele funkcji, których efektem jest supresja odpowiedzi immunologicznej, m.in. działa hamująco na syntezę IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 i TNF- α oraz stymuluje powstawanie limfocytów Treg. Działanie IL-10 prowadzi również do zmniejszenia ekspresji cząsteczek MHC kl. II na powierzchni komórek prezentujących antygeny (APC, *antigen presenting cell*) co sprawia, że komórki APC, np. komórki dendrytyczne i monocyty wykazują zmniejszoną zdolność do prezentacji antygenów związanych z nowotworem limfocytom Th [9, 26]. Ponadto, Lane i wsp. [27] wykazali, że wysokie stężenie IL-10 w płynie puchlinowym z wodobrzusza raka jajnika sprzyja migracji komórek nowotworowych. Udowodniono także dodatnią korelację pomiędzy podwyższonym stężeniem IL-10 w wodobrzuszu, a zdolnością komórek nowotworowych do migracji.

Natomiast Sipak-Szmigiel i wsp. [28] porównywali stężenie interleukiny 10 oraz czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*) w surowicy i płynie otrzewnowym u kobiet z nowotworem jajnika. Przeprowadzone badania wykazały, że stężenia interleukiny 10, zarówno w surowicy, jak i płynie otrzewnowym były wyższe u chorych z rakiem jajnika. Ponadto, wartości te istotnie wzrastały w płynie otrzewnowym w porównaniu z surowicą. Natomiast stężenie TNF- α było istotnie podwyższone w płynie otrzewnowym w porównaniu do stężenia w surowicy.

2.6. Interleukina 12 (IL-12, *interleukin-12*)

Interleukina 12 promuje cytotoksyczność limfocytów T oraz komórek NK, inicjuje różnicowanie limfocytów Th i Tc oraz syntezę IFN- γ i TNF- α , które pośrednio biorą udział w antyangiogennym działaniu interleukiny 12. Za syntezę interleukiny 12 odpowiadają głównie makrofagi i komórki dendrytyczne. Ponadto, IL-12 powoduje zmniejszenie aktywności makrofagów towarzyszących nowotworom, które w mikrośrodowisku guza odpowiadają za angiogenezę naczyń oraz tworzenie przerzutów [9, 29]. Interleukina 12 może być także wykorzystana w immunoterapii nowotworów. Leczenie z wykorzystaniem punktu kontrolnego anty-PD-1 wywołuje indukcję IFN- γ przez komórki T oraz IL-12 przez komórki dendrytyczne w mikrośrodowisku guza co powoduje silną odpowiedź przeciwnowotworową. W badaniu przeprowadzonym przez Garris i wsp. [30] wykazano, że limfocyty T CD8+ pod wpływem stymulacji przez IL-12 znacząco zwiększyły syntezę IFN- γ .

2.7. Interleukina 18 (IL-18, *interleukin-18*)

Interleukina 18 cechuje się właściwościami prozapalnymi. Jest wytwarzana głównie przez makrofagi. Jej rola opiera się na syntezie IFN- γ i IL-2 oraz wzmacnia właściwości cytotoksyczne limfocytów Th, Tc i komórek NK. Interleukina 12 wzmacnia działanie interleukiny 18 na powyższe komórki, natomiast związanie IL-18 z białkiem wiążącym interleukinę 18 (IL-18BP, *IL-18 binding protein*) powoduje stłumienie jej aktywności biologicznej – aktywność wykazuje tylko frakcja wolna IL-18 [9, 31]. IL-18BP występuje w surowicy w nadmiarze w stosunku do IL-18 i dzięki wysokiemu powinowactwu oraz podobieństwu do receptora IL-1R2, może skutecznie „zwać” i związać interleukinę 18. Związanie IL-18 z IL-18BP powoduje supresję odpowiedzi limfocytów Th1, co jednocześnie powoduje spadek ekspresji INF- γ oraz reguluje aktywność limfocytów Th2 [32]. Interleukina 18 wykazuje także działanie promujące nowotwór. Ponadto reguluje ekspresję białka adhezyjnego VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) w śródbłonku naczyniowym, co wpływa na możliwość powstawania przerzutów poprzez adhezję komórek nowotworowych do śródbłonka [33].

Le Page i wsp.[34] przeprowadzili badanie mające na celu ocenę przydatności diagnostycznej oznaczania stężenia w surowicy IL-18 oraz czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2, *fibroblast growth factor-2*) łącznie z CA125 u pacjentek z rakiem jajnika. Stężenie IL-18 było znacznie podwyższone u pacjentek z rakiem, najwyższe w guzach surowicznych, nie wykazano natomiast istotnej różnicy w przypadku osób zdrowych oraz chorych z nowotworem niezłośliwym. Stężenie FGF-2 było wyższe u pacjentów z rakiem w porównaniu do stężenia u osób zdrowych, najwyższe stężenie FGF-2 w surowicy było obserwowane w przypadku guzów jasnokomórkowych.

2.8. Mikrośrodowisko guza

Komórki nowotworowe mogą wydzielać szereg czynników chemotaktycznych dla komórek układu odpornościowego. Powoduje to ich napływ do środowiska guza [35]. W początkowych etapach neoplazji, komórki układu odpornościowego wykazują szereg działań przeciwnowotworowych, między innymi indukują proces apoptozy, wykazują działanie cytotoksyczne oraz wpływają na wydzielanie wielu cytokin. Jednak na dalszych etapach wzrostu guza, komórki nowotworowe uzyskują przewagę nad immuno-

logicznym nadzorem, co prowadzi do zmiany ich funkcjonowania w mikrośrodkowisku guza, gdzie inicjują stan immunosupresji, który korzystnie wpływa na postępy w rozwoju nowotworu [9, 36].

W mikrośrodkowisku guza komórki układu odpornościowego, chemokiny, cytokiny oraz fibroblasy gospodarza wchodzi w interakcję z komórkami nowotworowymi. Składniki mikrośrodkowiska guza biorą udział w zwalczaniu neoplazji, jednak mogą także ułatwiać nowotworom ekspansję poprzez promowanie angiogenezy [33]. W mikrośrodkowisku ważną rolę odgrywają limfocyty T regulatorowe naciekające nowotwór, które powodują stan immunosupresji, dzięki wydzielaniu IL-10, transformującego czynnika wzrostu- β (TGF- β , *transforming growth factor- β*) oraz ekspresji CTLA-4. Ponadto, limfocyty Treg niekorzystnie wpływają na proliferację limfocytów T cytotoksycznych oraz wydzielanie przez nie IFN- γ i IL-2 [37]. Nowotworowi jajnika często towarzyszy nagromadzenie się płynu puchlinowego, w którym występuje wiele cytokin, czynników wzrostu oraz kwas lizofosfatydowy, który zwiększa przepuszczalność śródbłonna i korzystnie wpływa na proliferację oraz migrację komórek nowotworowych, co znacząco sprzyja tworzeniu się przerzutów [38]. Na uwagę zasługują także supresorowe komórki pochodzenia szpikowego do których zalicza się mieloidalne komórki progenitorowe, niedojrzałe makrofagi, niedojrzałe granulocyty oraz niedojrzałe komórki dendrytyczne. Za pomocą chemotaksji przez zapalne cytokiny oraz prostaglandynę E2 gromadzą się one w płynie puchlinowym oraz mikrośrodkowisku guza, gdzie korzystnie wpływają na utrzymanie nowotworowych komórek macierzystych oraz supresorowo oddziałują na limfocyty T [39, 40]. Makrofagi mają zdolność do fagocytozy i prezentacji antygenów. Uczestniczą w rozwoju stanu zapalnego. Wyróżnia się dwa fenotypy – M1 który zabija komórki nowotworowe oraz M2 który sprzyja rozwojowi nowotworu. Stanowią jeden ze składników mikrośrodkowiska guza. Neutrofile są istotnymi komórkami odpowiedzi immunologicznej. Nowotwory „wykorzystują” neutrofile, zwabiają je poprzez wydzielanie IL-1 i IL-6. Stają się źródłem czynników wzrostowych, metaloproteinaz i sprzyjają angiogenezie. Podobnie w przypadku eozynofili i komórek tłuszcznych. Cytokiny wydzielane przez limfocyty Th wpływają na gromadzenie się fibroblastów, które to wykazują dwa różne efekty działania – jednym jest „odgrodenie” guza, a drugim – stymulacja immunosupresji w mikrośrodkowisku guza [41]. Rozwój uprzywilejowanego immunologicznie środowiska sprzyja rozwojowi komórek nowotworowych. Proces angiogenezy jest niezbędny do uzyskania przez komórki nowotworowe pewnej autonomii – rozwój nowych naczyń krwionośnych zapewnia odżywienie komórek nowotworowych oraz stwarza możliwość do tworzenia przerzutów.

2.9. Receptory na komórkach układu odpornościowego

Limfocyty T są najistotniejszym elementem w przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Na powierzchni tych komórek znajdują się tzw. receptory immunologicznych punktów kontroli. Wyróżnia się dwa typy przekazywanych przez nie sygnałów: sygnały aktywujące limfocyt (cząsteczki CD28, CD27, CD137, OX40) oraz sygnały hamujące limfocyt (cząsteczki CTLA-4, PD-1). Komórki dendrytyczne (DC, *dendritic cell*) są jednymi z komórek należących do APC (komórek prezentujących antygen, *antigen presenting cells*). Na ich powierzchni znajdują się cząsteczki kostymulujące CD80, CD86. Powstanie synapsy immunologicznej między limfocytami a komórkami

dendrytycznymi jest podstawą do aktywacji limfocytów i indukcji odpowiedzi immunologicznej [42, 43].

Połączenie cząsteczki CD 28 z CD80 lub CD86 warunkuje przekazanie sygnału aktywującego. Dzięki temu następuje proliferacja, różnicowanie i aktywacja limfocytów T. CTLA-4 ma silniejsze powinowactwo w łączeniu się z cząsteczkami CD80 lub CD86 niż CD28. Pobudzenie CTLA-4 warunkuje funkcjonalne wyczerpanie limfocytów T, przeprogramowanie ich w kierunku limfocytów Treg i rozwój immunosupresji. W immunoterapii nowotworów uwagę zwraca się na możliwość zablokowania działania CTLA-4 poprzez przeciwciała, przez co można przywracać działanie limfocytów T i mobilizację układu immunologicznego do walki z nowotworem. PD-1 obecny na powierzchni limfocytów T (ale również na komórkach NK i nieaktywnych limfocytach B) jest tzw. receptorem programowanej śmierci. Interakcja pomiędzy PDL1 i PDL2 na komórce dendrytycznej a PD-1 na limfocycie T warunkuje przekazanie sygnału do apoptozy limfocytów T. Następuje wygaszanie odpowiedzi immunologicznej. Komórki dendrytyczne znajdujące się w mikrośrodkowisku guza mogą wykazywać zwiększoną ekspresję cząsteczek PD-L1 poprzez działanie cytokin prozapalnych. Udowodniona jest wysoka ekspresja cząsteczek PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych, co stanowi „punkt zaczepienia” w opracowaniu immunoterapii nowotworów opartych na przeciwciałach monoklonalnych anty-PD-L1 [44, 45].

2.10. Apoptoza

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest jednym z niezbędnych elementów utrzymania wewnętrznej homeostazy organizmu. Aktywacja kaskady kaspaz jest jednym z ważniejszych mechanizmów prowadzących do apoptozy i jest zależna między innymi od cząsteczek nadrodziny czynnika martwicy nowotworu. Nadrodzina cząsteczek czynnika martwicy nowotworu (TNFSF, TNF *superfamily ligands*) to należąca do cytokin cząsteczki charakteryzujące się podobną budową. Wiążąc się z odpowiednimi receptorami (TNFRSF, TNF *receptor superfamily*), wykazują szereg działań w komórkach, w tym uczestniczą w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Cząsteczki nadrodziny TNF obecne są na niemal wszystkich jądrzastych komórkach organizmu człowieka. Liczne badania wskazują, iż osłabienie lub zaburzenia procesu apoptozy stanowią istotny czynnik rozwoju zmian nowotworowych, w tym raka jajnika [46]. Wybrane ligandy i odpowiadające im receptory nadrodziny cząsteczek TNF przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane ligandy i receptory cząsteczek czynnika martwicy nowotworu TNF

LIGAND	RECEPTOR	DOMENA ŚMIERCI
TNF	TNF-R1	TAK
	TNF-R2	NIE
TRAIL	TRAIL-R1	TAK
	TRAIL-R2	TAK
	TRAIL-R3	NIE
	TRAIL-R4	NIE
RANKL	RANK	NIE
FAS	FASL	TAK
TRAIL, RANKL	OPG	NIE

Źródło: Opracowanie własne

Czynnik martwicy nowotworu (TNF, *tumor necrosis factor*) to cytokina prozapalna, produkowana głównie przez makrofagi, limfocyty i aktywne monocyty. Wykazuje zdolność do zabijania komórek nowotworowych. Jest niezbędnym składnikiem nadzoru immunologicznego, proliferacji i prawidłowego funkcjonowania komórek układu odpornościowego. TNF oddziałuje na swoiste receptory – TNFR1 i TNFR2 znajdujące się na komórkach jądrzastych. Receptor TNFR1 zawiera domenę śmierci, która odpowiada za przekazanie sygnału prowadzącego do apoptozy komórki lub aktywacji czynnika jądrowego – NF- κ B i jej przeżycia. Zarówno cząsteczki, jak i receptory dla cząsteczek nadrodziny TNF mogą występować w dwóch formach: związanej z błoną i rozpuszczalnej. Forma rozpuszczalna powstaje w wyniku działania metaloproteinaz, dzięki czemu możliwy jest pomiar stężenia w płynach biologicznych. Dysregulacja w szlaku TNF jest związana z różnymi nowotworami i rola tej cytokiny została powiązana z wieloma etapami procesu nowotworowego [47, 48].

Dotychczas prowadzone badania wykazały, że TNF wytwarzany przewlekłe na niskim poziomie w mikrośrodowisku guza lub przez komórki nowotworowe ma aktywność antyapoptotyczną i mitogenną [49]. Wiele nowotworów charakteryzuje się brakiem równowagi pomiędzy apoptozą a sygnałami przeżycia. Wysokie stężenie rozpuszczalnych receptorów TNF (sTNF-R) działają hamująco na TNF i stanowią mechanizm ucieczki guza spod destrukcyjnego działania tej cytokiny. Dobrzycka B. i wsp. [50] oceniali zależność między stężeniami TNF i jego rozpuszczalnymi receptorami (sTNFR-1, sTNFR-2) w osoczu 126 kobiet chorych na nabłonkowego raka jajnika. Przeprowadzone badania wykazały, że stężenia TNF i jego rozpuszczalnych receptorów były istotnie wyższe u osób chorych na raka jajnika w porównaniu z grupą kontrolną oraz korelowały z zaawansowaniem nowotworu i skróceniem średniego czasu przeżycia. Jammal M. i wsp. [51] poddali ocenie wycinki histologiczne pobrane od kobiet, u których rozpoznano łagodny lub złośliwy nowotwór jajnika. W przypadku barwienia 1L-10 było ono bardziej intensywne w nowotworach złośliwych, w porównaniu z łagodnymi. W przypadku TNF nie uzyskano istotnych różnic. Jednak badacze sugerują, iż analiza cytokin może być przydatna jako marker tkankowy złośliwości i badania przeprowadzone na większej grupie, mogłyby dostarczyć więcej cennych informacji. Ekspresja TNF w złośliwych guzach jajnika jest wyższa w porównaniu z prawidłową tkanką jajnika [52]. Badania przeprowadzone przez Nomelinii wsp. [53], którego celem było porównanie stężenia TNF oraz jego rozpuszczalnych receptorów w płynie wewnątrz torbieli oraz surowicy krwi pacjentek z łagodnym i złośliwym nowotworem jajnika wykazały wyższe stężenia sTNF-R2 w płynie z torbieli z nowotworów złośliwych oraz ich związek ze stopniem zróżnicowania nowotworu. Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic w porównaniu do stężenia w surowicy. Zdaniem badaczy stężenia sTNF-R2 w mikrośrodowisku guza mogą stanowić czynnik złego rokowania w epithelialnym raku jajnika.

Na uwagę zasługuje także TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) – ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę związany z TNF oraz jego receptory. Ekspresja TRAIL na komórkach NK jest ważnym mechanizmem układu odpornościowego wykorzystywanym w zabijaniu komórek nowotworowych. Endogenny TRAIL-R pochodzący z komórek nowotworowych promuje ich progresję i zdolność do tworzenia przerzutów. TRAIL, podobnie jak TNF jest białkiem transmembrano-

wym poprzez działanie metaloproteinaz jest uwalniany z powierzchni komórki. Dzięki temu istnieje możliwość oznaczania rozpuszczalnych form tego białka w płynach biologicznych. Wyróżnia się pięć receptorów TRAIL – TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 i osteoprotegryna (OPG, *osteoprotegrin*), przy czym pierwsze dwa z wymienionych posiadają domenę śmierci i przewodzą sygnał apoptotyczny. TRAIL nadal zwraca uwagę badaczy ze względu na potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Niestety problemem jest samoistna lub pojawiająca się po wielu terapiach oporność na TRAIL. Zjawisko to zaobserwowano także w przypadku komórek surowiczego raka jajnika o wysokim stopniu złośliwości pochodzących z wodobrzusza. Wiele nowotworów wykazuje wysoką ekspresję endogennych TRAIL-R, receptory te działając jak „wabiki” wiążą się z TRAIL i obniżają jego stężenie, przez co zmniejsza się liczba miejsc dla wiązania z proapoptotycznymi receptorami TRAIL-R1 i TRAIL-R2. Wysiłki badaczy skupiają się na zaprojektowaniu takich agonistów TRAIL-R, których celem byłoby zwiększenie siły oddziaływania z TRAIL-R1 i TRAIL-R2 i indukcja apoptozy komórek nowotworowych [10].

W badaniu przeprowadzonym przez Chen i wsp. [54] oceniano tkanki pochodzące od pacjentów w różnym stopniu zaawansowania choroby i różnych typach histologicznych raka jajnika. Wykazano nadmierną ekspresję białek antyapoptotycznych (Bcl-2 i c-FLIP) w tkankach raka jajnika przy użyciu metody immunohistochemicznej. Zdaniem badaczy, białka te mogą odgrywać rolę w regulacji oporności na TRAIL, a obniżenie stężenia Bcl-2 i c-FLIP może przyczynić się do zniesienia oporności na TRAIL w komórkach raka jajnika OVCA432. Za pomocą specyficznego siRNA wyciszono geny odpowiadające za ekspresję antyapoptotycznych białek, zmierzono wskaźnik apoptozy komórek poddanych badaniu i stwierdzono, iż był on wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Badacze sugerują, iż zastosowanie siRNA celem zwiększenia apoptozy indukowanej TRAIL stanowić może strategię ukierunkowanego leczenia pacjentek z rakiem jajnika.

Dotychczas przeprowadzone badania dotyczące oceny stężenia TRAIL, sTRAIL-R1 oraz sTRAIL-R2 w surowicy kobiet chorych z nowotworem jajnika wykazały, że stężenie oznaczanych parametrów w surowicy kobiet chorych było wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Zdaniem autorów, stężenie TRAIL-R1 oraz TRAIL-R2 mogą być przydatne także w diagnostyce różnicowej nowotworów [55].

Osteoprotegryna (OPG) należy do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNFSF) i zaliczana jest do „receptorów wabiących”. Jest rozpuszczalnym białkiem wiążącym TRAIL. Znana jest głównie z regulacji metabolizmu kostnego. Jej działanie polega na uniemożliwieniu RANKL (*receptor activator for nuclear factor κ B*) aktywacji receptora RANK i zapobiega w ten sposób resorpcji kości. Jednakże jej rola nie ogranicza się tylko do tej funkcji – osteoprotegryna odgrywa rolę w chorobach nowotworowych. Wiele nowotworów wydziela OPG w takim stężeniu, w którym hamowana jest apoptoza indukowana TRAIL. Osteoprotegryna może także promować angiogenezę i migrację komórek. OPG może działać także w sposób niezależny od wiązania TRAIL w procesie hamowania apoptozy [56]. Badania dotyczące oceny stężenia OPG i sTRAIL wykazały istotnie statystycznie wyższe stężenia sTRAIL i OPG w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w porównaniu z grupą kontrolną. Badacze zwracają uwagę na rolę zaburzeń apoptozy z udziałem sTRAIL i OPG w patogenezie

raka jajnika oraz sugerują, iż oznaczanie tych dwóch rozpuszczalnych białek w połączeniu z innymi markerami może być przydatne w diagnostyce raka jajnika [57].

FAS znany także jako APO-1 lub CD95 to białko należące do nadrodziny receptorów TNF. FAS wytwarzany jest jako białko integralne, lecz pod wpływem działania metaloproteinaz może zostać uwolniony z powierzchni komórki. Interakcja ligandu FAS (FASL) na komórkach NK i limfocytach Tc a swoistym receptorem na powierzchni komórek nieprawidłowych jest ważnym mechanizmem w indukcji apoptozy komórek nowotworowych. W wyniku tej interakcji dochodzi do uwolnienia antygenów komórek nowotworowych, ich fagocytozy przez DC i stymulacji układu odpornościowego. DC wędrują do węzłów chłonnych i aktywują limfocyty T. Na błonach komórkowych wielu nowotworów wykazywana jest ekspresja FASL, co wiąże się z indukowaniem apoptozy limfocytów T rozpoznającymi antygeny nowotworu i wygaszaniem odpowiedzi immunologicznej. Ukierunkowana terapia agonistycznymi przeciwciałami anti-Fas jest interesującą strategią w immunoterapii. Niestety, podobnie jak w przypadku TRAIL, wiele komórek nowotworowych wykazuje oporność na apoptozę indukowaną przez FAS. Upośledzenie interakcji FAS-FASL powoduje, że komórki nowotworowe stają się odporne na eliminację ze strony układu immunologicznego. Utrata ekspresji FAS na komórkach raka jajnika może być przyczyną powstawania oporności na leki chemioterapeutyczne, co było przedmiotem badania przeprowadzonego przez Cacan i wsp. [58], którzy wykazali zmniejszoną ekspresję FAS w komórkach chemioopornych w porównaniu z komórkami chemiowrażliwymi raka jajnika. Zasugerowano udział zmian epigenetycznych w modyfikacjach histonów związanych z promotorem FAS, które to mogą przyczyniać się do utraty ekspresji FAS w komórkach chemioopornych raka jajnika. Zwiększenie ekspresji FAS może zwiększyć wrażliwość komórek nowotworowych na działanie komórek odpornościowych i stać się z jednym celów w immunoterapii raka jajnika. Oznaczanie sFAS może być przydatne do różnicowania zmian łagodnych od raków jajnika [59, 60]. Zwiększenie ekspresji FAS na komórkach nowotworowych może przyczynić się do eliminacji nieprawidłowych komórek za pomocą limfocytów cytotoksycznych.

3. Podsumowanie

Pomimo wielu lat badań, rak jajnika ciągle pozostaje problemem współczesnej onkologii, z tego względu istotne jest dalsze prowadzenie badań nad biologią tego nowotworu. W powstawaniu i rozwoju nowotworów jajnika istotną rolę przypisuje się zaburzeniom układu odpornościowego, w tym zachodzącym z udziałem cytokin. Cytokiny wpływają na ekspresję receptorów oraz indukcję ligandów zaangażowanych w procesy apoptozy. Ponadto, uczestniczą w sygnalizacji pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami układu odpornościowego. Dotychczasowe wysiłki badaczy koncentrują się na oznaczaniu stężenia cytokin z innymi markerami obecnie stosowanymi w diagnostyce raka jajnika, aby uzyskać wyższą czułość i swoistość diagnostyczną. Zaburzenia w szlakach apoptozy skutkują rozwojem komórek nieprawidłowych. Wiele dotychczas przeprowadzonych badań wskazuje na istotną rolę zaburzenia procesu apoptozy w patogenezie nowotworów, w tym nowotworów jajnika. Poznanie mechanizmów molekularnych biorących udział w tym procesie może w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych u chorych z rakiem jajnika.

Literatura

1. Kujawa K., Lisowska K., *Ovarian cancer -from biology to clinic*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 69, 2015, s. 1275-1290.
2. GLOBOCAN, 2020, gco.iarc.fr.
3. Mrochem-Kwarciak J., Mrochen-Domin I., Wojcieszek A., Deja R., Chmura A., Masłyk B., Nowara E., Kaleta B., Kołosza Z., Bartnik W., *Przydatność oznaczeń stężenia osteopontyny (OPN) u chorych na raka jajnika poddanych chemioterapii I rzutu*, Ginekologia Polska, 82, 12, 2011, s. 911-917.
4. Markowska A., Jaszczyńska-Nowinka K., *Nowe markery w raku jajnika*, Current Gynecologic Oncology, 10, 2, 2012, s. 116-123.
5. Białas P., Jankowska A., *Biochemical markers in breast and ovarian cancer*, Polish Review of Health Sciences, 42, 2, 2015, s. 115-121.
6. Basta A., Bidziński A., Bieńkiewicz A., Blecharz P., Bodnar L., Jach R., Knapp P., Kojs Z., Kotarski J., Markowska J., Misiek M., Sznurkowski J., Wicherek Ł., Sawicki Ł., Timorek-Lemieszczuk A., Bahyrycz J., Mądry R., *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka jajnika*, Current Gynecologic Oncology, 15, 1, 2017, s. 5-23.
7. Dochez V., Caillon H., Vaucel E., Dimet J., Winer N., Ducarme G., *Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA*, Journal of Ovarian Research, 7, 2019, s. 1-9.
8. ALAB Laboratoria, *Informator badań laboratoryjnych*, alablaboratoria.pl/badanie/8241/test_roma.
9. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T., *Immunologia*, Polskie Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2017.
10. Von Karstedt S., Montinaro A., Walczak H., *Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy*, Nature Reviews Cancer, 17, 6, 2017, s. 352-366.
11. Mantovani A., Barajon I., Garlanda C., *IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy*, Immunological Reviews, 281, 1, 2018, s. 57-61.
12. Wang Y., Zong X., Mitra S., Mitra A., Matei D., Nephew K., *IL-6 mediates platinum-induced enrichment of ovarian cancer stem cells*, JCI Insight, 3, 23, 2018, s. 1-17.
13. Cheng H., Wang Z., Fu L., Xu T., *Macrophage polarization in the development and progression of ovarian cancers: An overview*, Frontiers in Oncology, 9, 2019, s. 1-11.
14. Woolery K., Hoffman M., Kraft J., Nicosia S., Kumar A., Kruk P., *Urinary interleukin-1 β levels among gynecological patients*, Journal of Ovarian Research, 7, 1, 2014, s. 1-13.
15. Jiang T., Zhou C., Ren S., *Role of IL-2 in cancer immunotherapy*, Oncoimmunology, 5, 6, 2016, s. 1-10.
16. Macciò A., Lai P., Santona M., Pagliara L., Melis G., Mantovani G., *High serum levels of soluble IL-2 receptor, cytokines, and C reactive protein correlate with impairment of T cell response in patients with advanced epithelial ovarian cancer*, Gynecologic Oncology, 69, 3, 1998, s. 248-252.
17. Jammal M., Martins-Filho A., Silveira T., Murta E., Nomelini R., *Cytokines and Prognostic Factors in Epithelial Ovarian Cancer*, Clinical Medicine Insights: Oncology, 10, 2016, s. 71-76.
18. Browning L., Patel M., Horvath E., Tawara K., Jorczyk C., *IL-6 and ovarian cancer: Inflammatory cytokines in promotion of metastasis*, Cancer Management Research, 10, 2018, s. 6685-6693.
19. Wertel I., Suszczyk D., Pawłowska A., Bilska M., Chudzik A., Skiba W., Paduch R., Kotarski J., *Prognostic and Clinical Value of Interleukin 6 and CD45+CD14+ Inflammatory Cells with PD-L1+/PD-L2+ Expression in Patients with Different Manifestation of Ovarian Cancer*, Journal of Immunology Research, 2020, s. 1-16.

20. Dalal V., Kumarb R., Kumara S., Sharmab A., Kumarc., Sharmaa J., Roya K., Singha N., Vanamail P., *Biomarker potential of IL-6 and VEGF-A in ascitic fluid of epithelial ovarian cancer patients*, Clinica Chimica Acta, 482, 2018, s. 27-32.
21. Alfaro C., Teijeira A., Onate C., Perez G., Sanmamed M., Andueza M., Alignani D., Labiano S., Azpilikueta A., Rodriguez-Paulete A., Garasa S., Fusco J., Aznar A., Inoges S., De Pizzol M., Allegratti M., Medina-Echeverz J., Berraondo P., Perez-Gracia J., Melero I., *Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs)*, Clinical Cancer Research, 22, 15, 2016, s. 3924-3936.
22. Alfaro C., Sanmamed M., Rodríguez-Ruiz M., Teijeira Á., Oñate C., González Á., Ponz M., Schalper K., Pérez-Gracia J., Melero I., *Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up*, Cancer Treatment Reviews, 60, 2017, s. 24-31.
23. Sanguinete M., Martins-Filho P., Micheli D., Tavares-Murta B., Murta E., Nomelini R., *Serum IL-6 and IL-8 Correlate with Prognostic Factors in Ovarian Cancer*, Immunological Investigations, 46, 7, 2017, s. 677-688.
24. Micheli D., Jammal M., Martins-Filho A., Côrtes J., Souza C., Nomelini R., Murta E., Tavares-Murta B., *Serum cytokines and CXCR2: potential tumour markers in ovarian neoplasms*, Biomarkers, 25, 6, 2020, s. 474-482.
25. Ip E., Hoshi N., Shouval D., Snapper S., Medzhitov R., *Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages*, Science, 356, 6337, 2017, s. 513-519.
26. Mannino M., Zhu Z., Xiao H., Bai Q., Wakefield M., Fang Y., *The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer*, Cancer Letters, 367, 2, 2015, s. 103-107.
27. Lane D., Matte I., Garde-Granger P., Bessette P., Piché A., *Ascites IL-10 Promotes Ovarian Cancer Cell Migration*, Cancer Microenvironment, 11, 2-3, 2018, s. 115-124.
28. Sipak-Szmigiel O., Włodarski P., Ronin-Walknowska E., Niedzielski A., Karakiewicz B., Słuczankowska-Głabowska S., Laszczyńska M., Malinowski W., *Serum and peritoneal fluid concentrations of soluble human leukocyte antigen, tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in patients with selected ovarian pathologies*, Journal of Ovarian Research, 10, 1, 2017, s. 1-14.
29. Watkins S., Li B., Richardson K., Head K., Egilmez N., Zeng Q., Suttles J., Stout R., *Rapid release of cytoplasmic IL-15 from tumor-associated macrophages is an initial and critical event in IL-12-initiated tumor regression*, European Journal of Immunology, 39, 8, 2009, s. 2126-2135.
30. Garris C., Arlauckas S., Kohler R., Trefny M., Garren S., Piot C., Engblom C., Pfirschke C., Siwicki M., Gungabeesoon J., Freeman G., Warren S., Ong S., Browning E., Twitty C., Pierce R., Le M., Algazi A., Daud A., Pai S., Zippelius A., Weissleder R., Pittet M., *Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12*, Immunity, 49, 2018, s. 1148-1161.
31. Baker K., Houston A., Brint E., *IL-1 family members in cancer; two sides to every story*, Frontiers in Immunology, 10, 2019, s. 1-16.
32. Kaplanski G., *Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis*, Immunological Reviews, 281, 2018, s. 138-153.
33. Marchewka Z., Gielniak M., Piwowar A., *Rola wybranych mediatorów procesu zapalnego w patogenezie chorób nowotworowych*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 72, 2020, s. 175-183.
34. Le Page C., Ouellet W., Madore J., Hudson T., Tonin P., Provencher D., Mes-Masson A., *From gene profiling to diagnostic markers: IL-18 and FGF-2 complement CA125 as serum-based markers in epithelial ovarian cancer*, International Journal of Cancer, 118, 2006, s. 1750-1758.
35. Cisoń-Jurek S., Czajka-Francuz P., Francuz T., Wojnar J., *Chemokines - Role in inflammatory and cancer diseases*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 73, 2019, s. 372-386.

36. Roma-Rodrigues C., Mendes R., Baptista P., Fernandes A., *Targeting tumor microenvironment for cancer therapy*, International Journal of Molecular Sciences, 20, 2019, s. 1-31.
37. Worzfeld T., Von Strandmann E., Huber M., Adhikary T., Wagner U., Reinartz S., Müller R., *The unique molecular and cellular microenvironment of Ovarian cancer*, Frontiers in Oncology, 7, 2017, s. 1-23.
38. Fang X., Schummer M., Mao M., Yu S., Tabassam F., Swaby R., Hasegawa Y., Tanyi J., LaPushin R., Eder A., Jaffe R., Erickson J., Mills G., *Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer*, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1582, 2002, s. 257-264.
39. Gabrilovich D., Nagaraj S., *Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system*, Nature Reviews Immunology, 9, 3, 2009, s. 162-174.
40. Obermajer N., Muthuswamy R., Odunsi K., Edwards R., Kalinski P., *PGE2-Induced CXCL12 Production and CXCR4 Expression Controls the Accumulation of Human MDSCs in Ovarian Cancer Environment*, Cancer Research, 71, 24, 2011, s. 7463-7470.
41. Tchorzewska M., Kowalik M., Kuliś A., Olejarz W., *Mechanizmy prowadzące do angiogenezы*, Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, 10, 2019, s. 60-65.
42. Markowska A., Sajdak S., Lubin J., Markowska J., *Znaczenie PD-1 - Receptora programowanej śmierci-1 - I jego ligandów w immunoterapii raka jajnika*, Current Gynecologic Oncology, 14, 2016, s. 117-120.
43. Malesa A., Nowak J., Skórka K., Karp M., Giannopoulos K., *Monoclonal antibodies against PD-1/PD-L1 pathway*, Acta Haematologica Polonica, 49, 2018, s. 207-227.
44. Kujawa K., Lisowska K., *Ovarian cancer -from biology to clinic*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 69, 2015, s. 1275-1290.
45. Szczygieł A., Pajtasz-Piasecka E., *Between biology and medicine: perspectives on the use of dendritic cells in anticancer therapy*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 71, 2017, s. 921-941.
46. Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W., Stokłosa T., *Immunologia*, Polskie Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 2017, s. 191-198.
47. Wallach D., *The tumor necrosis factor family: Family conventions and private idiosyncrasies*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 10, 2018, s. 1-22.
48. Sethi S., Sung B., Aggarwal B., *TNF: A master switch for inflammation to cancer*, Frontiers in Bioscience, 2008, s. 5094-5107.
49. Balkwill F., *TNF-α in promotion and progression of cancer*, Cancer and Metastasis Reviews, 25, 2006, s. 409-416.
50. Dobrzycka B., Terlikowski S., Kowalczyk O., Kinałski M., *Circulating levels of TNF-α and its soluble receptors in the plasma of patients with epithelial ovarian cancer*, European Cytokine Network, 20, 2009, s. 131-134.
51. Jammal M., Silva A., Fliho A., Cõbo E., Adad S., Murta E., Nomelini R., *Immunohistochemical staining of tumor necrosis factor-α and interleukin-10 in benign and malignant ovarian neoplasms*, Oncology Letters, 9, 2015, s. 979-983.
52. Szlosarek P., Grimshaw M., Kulbe H., Wilson J., Wilbanks G., Burke F., Balkwill F., *Expression and regulation of tumor necrosis factor α in normal and malignant ovarian epithelium*, Molecular Cancer Therapeutics, 5, 2006, s. 382-390.
53. Nomelini R., Júnior L., de Lima C., Chiovato A., Micheli D., Tavares-Murta B., Murta E., *TNF-R2 in tumor microenvironment as prognostic factor in epithelial ovarian cancer*, Clinical and Experimental Medicine, 18, 2018, s. 547-554.
54. Chen C., Liu Y., Yang X., Li J., Huang Y., Jiang Q., Li C., *Over-expression of c-FLIP and Bcl-2 results in the resistance to TRAIL-induced apoptosis on ovarian cancer*, Acta Medica Mediterranea, 36, 2020, s. 365-371.
55. Mielczarek-Palacz A., Sikora J., Kondera-Anasz Z., *Assessment of concentrations of sTRAIL ligand and its receptors sTRAIL-R1 and sTRAIL-R2 - Markers monitoring the*

- course of the extrinsic pathway of apoptosis induction: Potential application in ovarian cancer diagnostics, Archives of Medical Science, 13, 2017, s. 624-628.
56. Lane D., Matte I., Laplante C., Garde-Granger P., Rancourt C., Piché A., *Osteoprotegerin (OPG) activates integrin, focal adhesion kinase (FAK), and Akt signaling in ovarian cancer cells to attenuate TRAIL-induced apoptosis*, Journal of Ovarian Research, 6, 2013, s. 1-9.
 57. Mielczarek-Palacz A., Kondera-Anasz Z., Smycz-Kubańska M., *Changes in the Concentration of Markers Participating in the Regulation of the Apoptosis Receptor Pathway Involving Soluble Tumour Necrosis Factor Ligand Inducing Apoptosis (sTRAIL) and Osteoprotegerin (OPG) in the Serum of Women with Ovarian Cancer - Participation in Pathogenesis or a Possible Clinical Use?*, 9, 2020, s. 612-624.
 58. Cacan E., *Histone deacetylase-1-mediated suppression of FAS in chemoresistant ovarian cancer cells*, Anticancer Research, 36, 2016, s. 2819-2826.
 59. Akhmedkhanov A., Lundin E., Guller S., Lukanova A., Micheli A., Ma Y., Afanasyeva Y., Zeleniuch-Jacquotte A., Krogh V., Lenner P., Muti P., Rinaldi S., Kaaks R., Berrino F., Hallmans G., Toniolo P., *Circulating soluble Fas levels and risk of ovarian cancer*, BMC Cancer, 3, 2003, s. 1-7.
 60. Hefler L., Mayerhofer K., Nardi A., Reinthaller A., Kainz C., *Serum soluble Fas levels in ovarian cancer*, Obstetrics & Gynecology, 96, 2000, s. 65-69.

Rola układu odpornościowego w patogenezie nowotworów jajnika

Streszczenie

Rak jajnika należy nadal do najgorzej rokujących nowotworów ginekologicznych cechujących się najwyższą śmiertelnością w większości krajów na świecie. Jest to spowodowane bezobjawowym wzrostem guza, brakiem charakterystycznych objawów klinicznych w początkowym okresie choroby oraz badań diagnostycznych pomocnych we wczesnym rozpoznaniu. Z tego względu wciąż trwają badania nad biologią tego nowotworu, które koncentrują się na poszukiwaniu nowych markerów prognostycznych i diagnostycznych oraz ocenie ich ewentualnej przydatności w praktyce klinicznej. Przez lata opracowywano liczne algorytmy, które nadal nie spełniają oczekiwanych rezultatów. Dotychczas prowadzone badania wykazały, że w powstawaniu i rozwoju tych nowotworów istotną rolę przypisuje się zaburzeniom funkcji układu odpornościowego. Z tego względu obecnie prowadzone badania koncentrują się na poszukiwaniu parametrów immunologicznych, które mogą okazać się przydatne w opracowaniu nowych schematów diagnostycznych i terapeutycznych u chorych z nowotworem jajnika. Pewne nadzieje wiąże się z zastosowaniem rozpuszczalnych mediatorów odpowiedzi immunologicznej, które mogą być oznaczane w płynach ustrojowych i znaleźć ewentualne zastosowanie w praktyce klinicznej.

Słowa kluczowe: rak jajnika, apoptoza, cytokiny, układ immunologiczny, punkty kontroli immunologicznej

The role of the immune system in the pathogenesis of ovarian cancer

Abstract

Ovarian cancer is still one of the most poorly prognosing gynecological cancers with the highest mortality rate in most countries in the world. This is due to the asymptomatic growth of the tumor, lack of characteristic clinical symptoms in the early stages of the disease and lack of diagnostic tests helpful in early diagnosis. For this reason, research into the biology of this tumor is still ongoing, with a focus on finding new prognostic and diagnostic markers and evaluating their possible usefulness in clinical practice. Numerous algorithms have been developed over the years, which still do not meet the expected results. Previous studies have shown that an important role in the formation and development of these cancers is attributed to immune system dysfunction. Therefore, current research is focused on the search for immunological parameters that may prove useful in developing new diagnostic and therapeutic regimens in patients with ovarian cancer. Some hopes are connected with the use of soluble mediators of immune response, which can be determined in body fluids and find possible application in clinical practice.

Keywords: ovarian cancer, apoptosis, cytokines, immune system, immune checkpoints

Ocena stężenia interleukiny-21 i interleukiny-22 w surowicy kobiet z nowotworem macicy

1. Wstęp

Nowotwory macicy nadal pozostają jednym z głównych powodów śmierci kobiet na świecie. Pod względem współczynnika zachorowalności na nowotwory rozwijające się w żeńskich narządach rodnych Polska znajduje się w czołówce państw europejskich. W 2020 roku, według WHO, rak trzonu macicy znalazł się na szóstym miejscu najczęściej diagnozowanych nowotworów oraz na czternastym miejscu w zestawieniu najczęstszych chorób nowotworowych. W porównaniu do raka szyjki macicy charakteryzuje się on niższą częstotliwością występowania oraz mniejszym współczynnikiem śmiertelności, a roczna ilość zgonów wynosi ponad 300 tys. W Polsce złośliwy rak endometrium jest czwartym najczęściej występującym nowotworem u kobiet [1, 2].

Mechanizmy prowadzące do rozwoju nowotworu trzonu macicy nadal pozostają nie w pełni poznane. Jako główne z nich uważa się nieprawidłowe działanie systemu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych (*mismatch repair*, MMR) oraz mutacje pojedynczych onkogenów, jak i genów supresorowych nowotworów [3].

Obecnie podstawowym markerem raka endometrium jest antygen CA 125 (*carcinoma antigen 125*, CA 125). Jest on uwalniany do krwioobiegu w przypadku większości nowotworów trzonu macicy, a jego wysokie stężenie może sugerować rozprzestrzenienie się raka poza obręb macicy bądź wznowę choroby. Kolejnym parametrem jest podfrakcja czwarta ludzkiego białka z komórek najądrza (*human epididymis protein 4*, HE4), której czułość w I stopniu zaawansowania nowotworu według klasyfikacji Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa (*Federation of Gynecology and Obstetrics*, FIGO) jest o 17% wyższa względem CA 125. Chociaż zaobserwowano podwyższenie stężenia antygenów (*carcinoma antigen 72-4*, CA 72-4), białka Fas czy czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów 1 (*Macrophage Colony-Stimulating Factor 1*, MCSF1) u kobiet z rakiem endometrium, żaden z tych parametrów nie znalazł zastosowania w praktyce klinicznej [4, 5].

Najczęściej występującymi nowotworami niezłośliwymi w żeńskim układzie rozrodczym u kobiet w wieku rozrodczym są mnogie mięśniaki macicy [6]. Pomimo wysokiej zachorowalności, czynniki predysponujące do zachorowania nie są do końca znane.

Z tego względu wciąż trwają badania nad poznaniem mechanizmów uczestniczących w powstawaniu i rozwoju nowotworów macicy. Potencjalne zastosowanie mogą mieć mediatory układu odpornościowego – cytokiny. Na uwagę zasługuje inter-

¹ k.grzywok@gmail.com, Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny.

² anna.agata.strzelec@gmail.com, Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny.

³ mkubanska@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny.

leukina-21 i interleukina-22, które to mogą okazać się przydatne w diagnozowaniu oraz w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych nowotworów macicy.

Interleukina-21 jest białkiem o masie cząsteczkowej 15 kDa należącym do grupy cząsteczek sygnałowych. Wydzielana jest głównie przez aktywowane limfocyty T CD4+, w tym pomocnicze limfocyty T 17 (*T helper cells 17*, Th17), pęcherzykowe (*T follicular helper cells*, Tfh) oraz komórki NKT (*Natural Killer T-cells*, NKT) [7-9].

Wysoką ekspresję heterodimerskiego receptora interleukiny 21 (*Interleukin 21 receptor*, IL-21R) można zauważyć na komórkach NK i na powierzchni limfocytów B, a przejściową zależną od aktywacji komórek T, na limfocytach TCD8+. Funkcjonalny IL-21R jest również wyrażany przez komórki nielimfoidalne t.j. makrofagi, fibroblasty, adipocyty, komórki dendrytyczne (*dendritic cells*, DC) oraz nabłonkowe [9-10].

IL-21 w makrofagach zwiększa ekspresję podjednostki α IL-4R i $\alpha 1$ IL-13R aktywując arginazę oraz promując alternatywną aktywację tych komórek. Interleukina 21 oddziałuje także na komórki tuczne, neutrofile, bazofile, eozynofile i tkanki, które nie mają funkcji krwiotwórczych [10].

Interleukina-22 jest białkiem o masie cząsteczkowej 32 kDa odkrytym przez Xie i wsp. [11]. Wytwarzają ją przede wszystkim komórki linii limfoidalnej w tym limfocyty T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$, komórki NKT oraz wrodzone komórki limfoidalne (*innate lymphoid cells*, ILC). Do wydzielania tej cytokiny zdolne są także makrofagi, neutrofile, fibroblasty, niektóre komórki szpikowe i niehematopoetyczne [12-14].

Receptor IL-22 jest heterodimerskim kompleksem złożonym ze wspólnej z rodziną cytokin IL-10 podjednostki 2 (IL-10R2) i z łańcucha 1 (IL-22R1). IL-10R2 ulega ekspresji w większości tkanek organizmu ludzkiego, natomiast podjednostka IL-22R1 obserwowana jest na powierzchni komórek nabłonkowych znajdujących się m.in. w skórze, trzustce, wątrobie, jelitach i płucach [12-14].

Inną cząsteczką, z którą łączy się interleukina 22 jest rozpuszczalna postać IL-22R – białko wiążące IL-22 (*IL-22 binding protein*, IL-22BP). Ma ona 1000 razy większe powinowactwo do wiązania z tym białkiem w porównaniu z receptorem błonowym (IL-22 receptor, IL-22R1). Ekspresję IL-22BP wykazano w komórkach dendrytycznych CD103+, makrofagach i limfocytach, a także w tkankach tj. płuc, trzustki i skóry. Wiązanie interleukiny 22 do IL-22BP hamuje bezpośrednio działanie IL-22, a zwiększony poziom tego białka po wydzieleniu IL-22 wskazuje na jego regulacyjną rolę w organizmie [13-15].

Interleukina 22 ulega ekspresji w wielu tkankach organizmu ludzkiego, m.in. w wątrobie, płucach, skórze, trzustce czy w jelitach. Wytwarzana jest w miejscach trwającego procesu zapalnego, gdzie stymuluje produkcję substancji przeciwdrobnoustrojowych, proliferację i przeżycie komórek nabłonkowych. Oprócz wpływu przeciwzapalnego nadekspresja interleukiny 22 w zdrowej tkance może doprowadzić do hiperprolifracji, produkcji chemokin, cząsteczek prozapalnych (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, GCSF, GMCSF, białka wiążącego lipopolisacharyd) i w konsekwencji do zaangażowania patologicznych komórek efektorowych [13].

Duże nadzieje w leczeniu nowotworów wiąże się z immunoterapią. Na jej efektywność wpływ mają liczne czynniki, takie jak stopień nacieczenia guza przez limfocyty T efektorowe o pożądanym fenotypie. Istotną rolę pełnią także komórki NK, razem z perforynami i granzymami, oraz cytokiny. Ogromne znaczenie w terapii nowotworów miało wprowadzenie inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego: przeciwciała monoklonalnego blokującego osie CTLA-4 (*cytotoxic T cell*

antigen 4, CTLA-4) lub receptora programowanej śmierci 1 (*programmed death receptor 1*, PD-1). Cytokiny mogą być stosowane w połączeniu z przeciwciałami anty-PD-1 i anty-PD-L1. Immunoterapia nieswoista pobudza układ immunologiczny na skutek podania chorym preparatów powodujących produkcję cytokin albo też na podaniu samych cytokin. Również chimeryczne receptory antygenowe (*chimeric antigen receptor*, CAR) mogą zostać wzbogacone, poprzez włączenie do wektora lentinowirusowego, genów cytokin. Trwające badania kliniczne testują skuteczność podawania rekombinowanych interleukin w połączeniu z lekami biologicznymi – niwolumabem czy rytuksymabem. Co więcej, interleukiny mogą modulować aktywność przeciwnowotworową szczepionek z komórek dendrytycznych lub przeciwciał [16].

Obecnie wiadomo, że receptory białkowe PD-1 i Tim-3, ulegające ekspresji na limfocytach T i komórkach NK, w procesie nowotworowym powodują wytwarzanie nieaktywnych cytokin oraz obniżenie ich charakteru cytotosycznego [17]. W badaniach przeprowadzonych przez Seo i wsp. [18] wykazano, że połączenie hamującego działania IL-21 i blokady punktu kontrolnego anty-PD-1/anty-Tim-3 zwiększa funkcję efektorową komórek NK i limfocytów T, prowadząc do znacznej regresji guza z niedoborem cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy I (*Major Histocompatibility complex class I*, MHC klasy I). Również Xue i wsp. [19] dowiedli, że połączenie IL-21 ze swoistym receptorem powoduje zahamowanie rozrostu raka drobnokomórkowego płuca poprzez tłumienie ekspresji ligandu receptora PD-L1 oraz dodatkowo sygnalizacji szlakiem Wnt/ β -kateniny.

Interleukina-21 w różnych rodzajach nowotworów wykazuje działanie przeciwnowotworowe indukując cytotosyczność komórek żernych oraz odpowiedź prozapalną limfocytów T i B w kierunku zmutowanych komórek. Natomiast sugeruje się, że interleukina-22 sprzyja rozrostowi guza zmniejszając powstały stan zapalny, a jej zwiększone stężenie koreluje z postępem niektórych chorób nowotworowych i sprzyja powstawaniu ognisk wtórnych.

Z uwagi na fakt, że dotychczas nie prowadzono badań dotyczących oceny stężenia IL-21 oraz IL-22 w surowicy kobiet z nowotworem macicy, celem pracy była analiza stężenia badanych parametrów w surowicy kobiet z mnogimi mięśniakami macicy i rakiem błony śluzowej trzonu macicy.

2. Materiał i metody

Grupa doświadczalna „D” obejmowała 40 kobiet z rozpoznaniem nowotworem macicy. W obrębie tej grupy wyróżniono podgrupę „D1”, która obejmowała 17 pacjentek z rozpoznanymi mnogimi mięśniakami macicy (*Leiomyomata uteri*) oraz podgrupę „D2”, do której zakwalifikowano 23 pacjentki z rozpoznaniem rakiem błony śluzowej trzonu macicy (*Adenocarcinoma corporis uteri*), w tym I stopień w klasyfikacji FIGO stwierdzono u 9 kobiet, II u 8, a III u 6.

Rozpoznanie nowotworu zostało przeprowadzone na podstawie objawów klinicznych, wyników badań laboratoryjnych oraz potwierdzone wynikiem badania histopatologicznego.

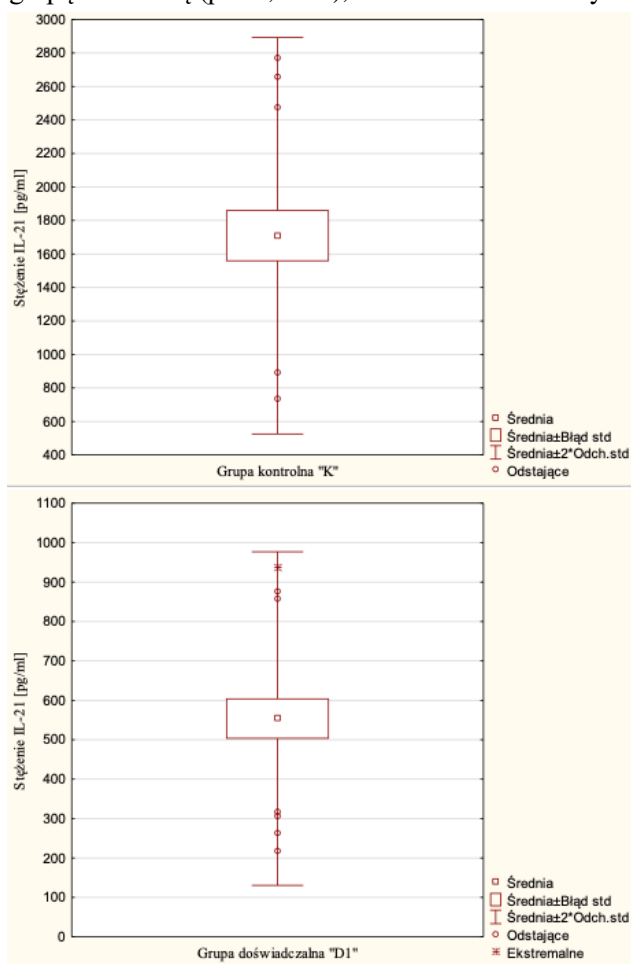
Grupa kontrolna „K” złożona była z 15 zdrowych kobiet, u których wykonywano rutynowe badania kontrolne.

Do oznaczenia stężenia interleukiny-21 i -22 w surowicy krwi kobiet z grupy doświadczalnej i kontrolnej zastosowano metodę immunoenzymatyczną ELISA.

3. Wyniki

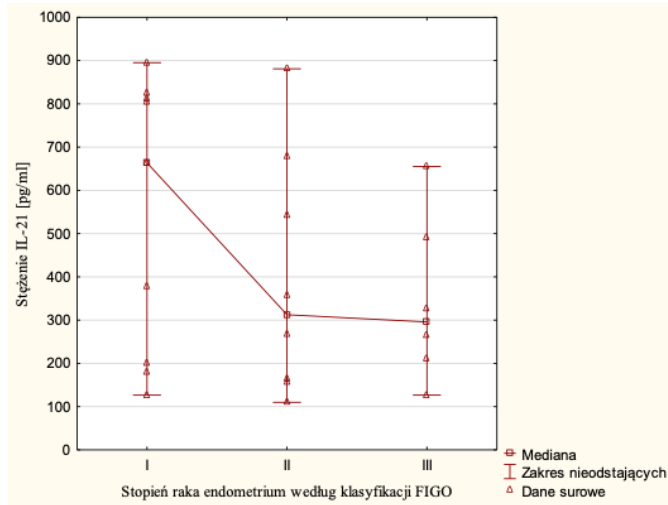
W surowicy wszystkich badanych kobiet oznaczono stężenie IL-21. Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano, że w grupie kontrolnej oraz doświadczalnej „D1” uzyskane wyniki odpowiadały rozkładowi normalnemu, z tego względu przedstawiono je jako wartość średnią i odchylenie standardowe. Natomiast wyniki uzyskane w grupie doświadczalnej „D2” nie odpowiadały rozkładowi normalnemu, przedstawiono je w formie mediany, rozstępu międzykwartylowego oraz dolnego i górnego kwartyła (Q1 i Q3)

W grupie kontrolnej średnia wartość stężenia IL-21 wyniosła 1709,24 pg/ml, a odchylenie standardowe było równe 591,81 pg/ml. Natomiast w grupie pacjentek z mnogimi mięśniakami macicy średnia odpowiadała 553,75 pg/ml, przy odchyleniu standardowym 211,66 pg/ml. Analiza statystyczna wykazała istotne, statystycznie niższe, stężenie badanej interleukiny w surowicy kobiet z grupy doświadczalnej „D1” w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$), co zilustrowano na rycinie 1.



Rycina 1. Stężenie IL-21 w surowicy pacjentek z grupy kontrolnej (górny wykres), grupy doświadczalnej „D1” (dolny wykres) [w opracowaniu własnym]

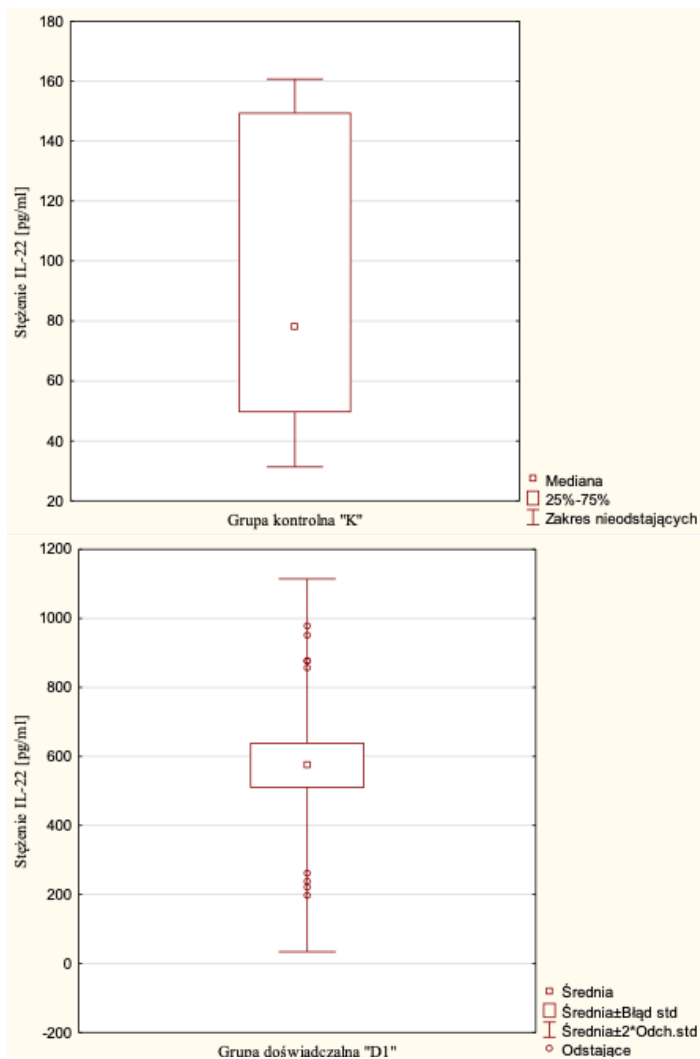
Dalsza analiza obejmowała ocenę stężenia badanego parametru w surowicy kobiet z rakiem trzonu macicy. W tej grupie wartości Q1 i Q3 wynosiły odpowiednio 179,50 pg/ml oraz 678,50 pg/ml, a wartość mediany równa była 356,40 pg/ml. Wykazano istotnie statystycznie niższe stężenie IL-21 w grupie osób z rakiem trzonu macicy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$). W toku dalszych badań analizowano, czy stężenie badanego parametru zależy od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic stężenia IL-21 w zależności od stopnia zaawansowania choroby nowotworowej według klasyfikacji FIGO, co zilustrowano na rycinie 2.



Rycina 2. Stężenie IL-21 w surowicy kobiet z rakiem trzonu macicy z uwzględnieniem stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO [w opracowaniu własnym]

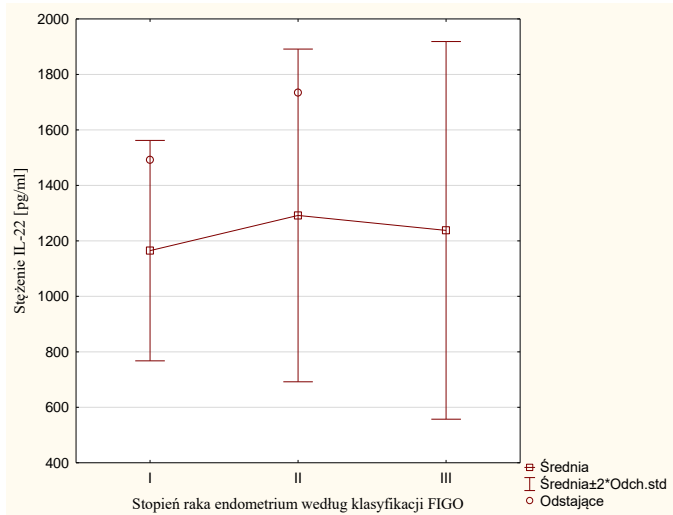
W dalszym etapie analizy, w surowicy wszystkich osób badanych, oznaczono stężenie IL-22. Wykazano, że wartości uzyskane w grupie kontrolnej nie odpowiadały rozkładowi normalnemu, z tego względu przedstawiono je jako medianę, rozstęp międzykwartylowy oraz dolny i górny kwartyl. Natomiast wyniki uzyskane w obu grupach doświadczalnych odpowiadały rozkładowi normalnemu, przedstawiono je jako wartość średnią i odchylenie standardowe.

W grupie kontrolnej przy medianie równej 78,15 pg/ml, kwartyl dolny i górny wynosił odpowiednio 344,78 pg/ml oraz 1034,34 pg/ml. Natomiast u kobiet z grupy doświadczalnej „D1” średnia odpowiadała wartości 574,29 pg/ml, przy odchyleniu standardowym 270,19 pg/ml. Analiza statystyczna wykazała istotnie statystycznie wyższe stężenie interleukiny 22 w surowicy pacjentek z grupy doświadczalnej „D1” ($p < 0,0001$) (ryc. 3).



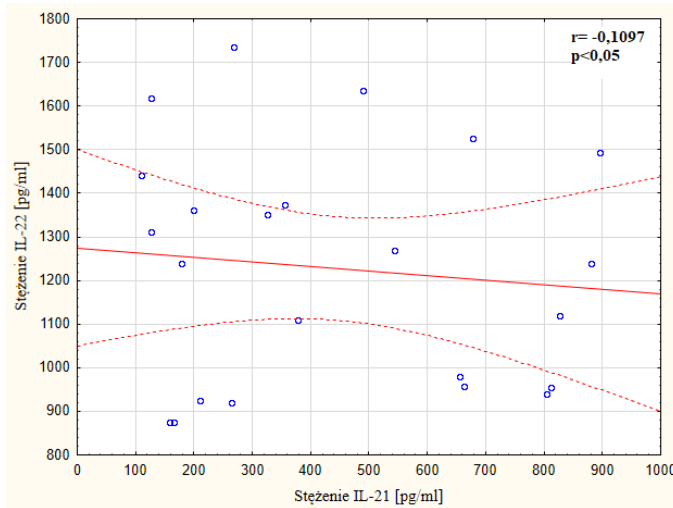
Rycina 3. Stężenie IL-22 w surowicy pacjentek z grupy kontrolnej (górny wykres), grupy doświadczalnej „D1” (dolny wykres) [w opracowaniu własnym]

W kolejnym etapie analizy statystycznej oceniono stężenie IL-22 w surowicy kobiet z rakiem trzonu macicy. W tej grupie wartość stężenia wyniosła 1228,07 pg/ml z odchyleniem standardowym równym 269,10 pg/ml. Wykazano istotne, statystycznie wyższe, stężenie IL-22 w grupie osób z rakiem trzonu macicy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,0001$). Następnie przeanalizowano czy stężenie badanego parametru zależy od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu. Nie wykazano istotnych różnic stężenia IL-22 w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu błony śluzowej trzonu, co przedstawiono na rycinie 4.

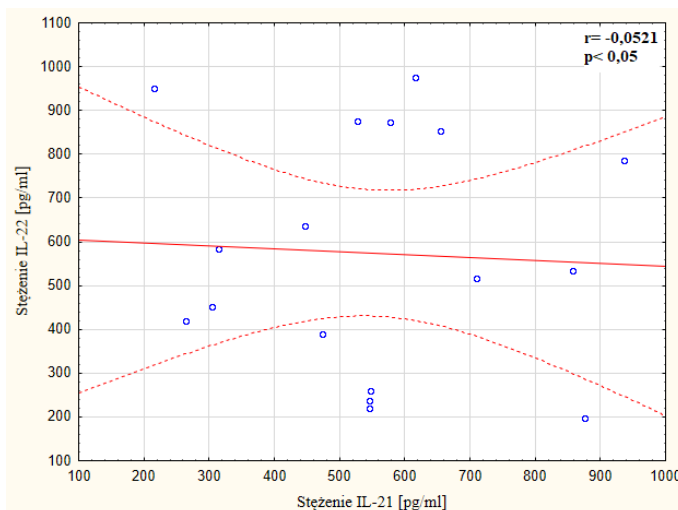


Rycina 4. Stężenie IL-22 w surowicy kobiet z rakiem trzonu macicy z uwzględnieniem stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO [w opracowaniu własnym]

W toku dalszej analizy statystycznej oceniono związek pomiędzy stężeniem IL-21 a IL-22 w surowicy kobiet z grup doświadczalnej „D1” oraz „D2”. Nie stwierdzono istotnie statystycznej korelacji między stężeniem badanych parametrów u kobiet z rakiem macicy, jak i mnogimi mięśniakami macicy, co zobrazowano na rycinach 5 i 6.



Rycina 5. Krzywa regresji liniowej przedstawiająca związek pomiędzy stężeniem IL-21a IL-22 w surowicy krwi kobiet z rakiem trzonu macicy [w opracowaniu własnym]



Rycina 6. Krzywa regresji liniowej przedstawiająca związek pomiędzy stężeniem IL-21a IL-22 w surowicy krwi kobiet z mięśniakami macicy [w opracowaniu własnym]

4. Dyskusja

W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój badań nad rolą układu odpornościowego w procesie kancerogenezy. Poznanie mechanizmów immunosupresyjnych, które umożliwiają komórkom nowotworowym ucieczkę spod nadzoru immunologicznego może być przydatne nie tylko w lepszym zrozumieniu kolejnych etapów kształtowania się mikrośrodowiska guza, ale także w opracowaniu metod ukierunkowanych terapii, mających na celu zablokowanie swoistych czynników odpowiedzialnych za jego wzrost i ekspansję.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy była ocena stężenia IL-21 i IL-22 w surowicy kobiet z rakiem błony śluzowej trzonu macicy oraz z mięśniakami mnogimi macicy.

Analiza statystyczna wykazała, istotnie statystycznie obniżone, stężenia interleukiny-21 u kobiet z mnogimi mięśniakami macicy, jak i rakiem endometrium w porównaniu z grupą kontrolną, co może wskazywać na zaburzenia funkcji immunoregulacyjnych badanej cytokiny.

Bhatt i wsp. [20] wskazali na limfocyty T CD8+ jako kluczowy element przeciwnowotworowego działania IL-21 na modelu gruczolakoraka piersi u myszy. Po włączeniu IL-21 zwiększone nacieczenie limfocytami T CD8+ było zauważalne w modelach, czerniaka B16, raku nerki i raku grasicy.

Wyniki dotychczas prowadzonych badań wskazują, że interleukina-21 może być obiecującym elementem terapeutycznym w niektórych chorobach nowotworowych. Hermans i wsp. [21] badali rolę IL-21 w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wykazali oni, że IL-21 w połączeniu z inhibicją dehydrogenazy mlekazowej (*lactate dehydrogenase*, LDH) sprzyja przejściu pirogronianiu do cyklu Krebsa zmniejszając produkcję kwasu mlekowego. Skutkuje to wytwarzaniem większej liczby limfocytów T pamięci podobnych do komórek macierzystych (*stem memory T cells*, TSCM) oraz poprawą funkcjonowania mitochondriów, jednocześnie tłumiąc starzenie się komórek, a co więcej w znacznym stopniu zwiększając odpowiedź przeciwnowotworową. Badania

z wykorzystaniem TSCM przeprowadzili również Li i wsp. [22]. Wykazali oni, że IL-21 może oddziaływać na limfocyty T, które to biorą udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej, poprzez fuzję z przeciwciałem anti-PD-1. Powstałe w ten sposób białko fuzyjne PD-1Ab21 promuje generowanie TSCM. Zastosowanie PD-1Ab21 na modelu mysim wykazało silne działanie przeciwnowotworowe, polegające na promowaniu odpowiedzi na komórki guza z udziałem specyficznych limfocytów T CD8+. Innym aspektem kancerogenezy, szczególnie nowotworów błony śluzowej macicy, są mutacje genetyczne obejmujące zmiany w genie β -kateniny. Jego produkt jest niezbędny w szlaku sygnałowym Wnt/ β -kateniny odgrywającym istotną rolę w prawidłowym różnicowaniu, przeżywalności i proliferacji komórek. Nieprawidłowe białko pojawiające się u osób z rakiem endometrium może być powodem nadmiernego rozrostu guza poprzez ciągłe stymulowanie szlaku sygnalizacyjnego, niezakłócone hamującym działaniem IL-21.

Limfocyty T osób chorych na przewlekłą białaczką limfocytową (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL) po podaniu lenalidomidu, będącego lekiem immunomodulującym, promują uwalnianie większej ilości IL-21. Zaobserwowano także wzrost ekspresji funkcjonalnego receptora IL-21 na powierzchni komórek CLL [23]. Co więcej, lek ten promuje toksyczność IL-21 względem komórek CLL, poprzez zwiększenie cytotoksycznego działania limfocytów T CD8+ i komórek NK oraz przejścia makrofagów występujących w mikrośrodkowisku nowotworu (*tumor associated macrophage*, TAM) typu M2 do TAM M1. IL-21 indukuje również apoptozę chłoniaków B-komórkowych. Badania wskazują, że IL-21 może wpływać na różne typy komórek w mikrośrodkowisku guza, co potwierdza jej użyteczność w terapiach stosowanych samodzielnie lub w połączeniu z innymi czynnikami [24].

Analiza oceny stężenia IL-22 wykazała istotnie, statystycznie wyższe, stężenie IL-22 u pacjentek z obu grup doświadczalnych w porównaniu do osób zdrowych, co może świadczyć o udziale tej cytokiny w patogenezie wybranych nowotworów.

Dong i wsp. [25] modulując stopień ekspresji IL-22 z wykorzystaniem plazmidu IL-22 lub IL-22 shRNA, wykazali że IL-22 powoduje wzrost żywotności komórek raka żołądka AGS, prawdopodobnie angażując szlak sygnałowy JNK. Ponadto, gdy IL-22 została zdegradowana przez IL-22-shRNA, komórki AGS wykazywały znacznie mniejszy poziom żywotności.

Zeng i wsp. [26] przeprowadzili badania nad immunoaktywnym podtypem raka pęcherza moczowego naciekającego błonę mięśniową (*muscle invasive bladder cancer*, MIBC). Nowotwór ten charakteryzuje się obecnością komórek odpornościowych, w tym komórek uwalniających IL-22. Zauważono, że chorzy z wysoką infiltracją komórkami IL22+ cechowali się krótszym czasem całkowitego przeżycia oraz remisji. Dalsza analiza wykazała, że wspomniana grupa pacjentów posiadała większą liczbę komórek pro-nowotworowych i cytokin immunosupresyjnych, a ich limfocyty T CD8+ cechowały się dysfunkcją. Wykrywanie komórek IL22+ może być wykorzystane jako niezależny marker do prognozowania rokowania i odpowiedzi na leczenie.

Katara i wsp. [27] na modelu mysim zbadali wpływ IL-22 na stopień progresji raka piersi. Wykazali, że IL-22 ulega największej ekspresji w czasie złośliwej transformacji zachodzącej w komórkach guza, z kolei efekt przeciwny wywiera delecja genu IL-22. Również Markota i wsp. [28] wykazali, że pomimo działania pronowotworowego,

IL-22 nie inicjuje pierwotnego rozwinięcia się guzów oraz wpływa stymulująco na nowotwory pochodzenia nabłonkowego.

Hernandez i wsp. [29] przeprowadzili badania na transgenicznym myszom, które nie wytwarzały IL-22, a po stymulacji stanu zapalnego wykazywały zwiększony rozwój guza w wątrobie. Wyniki tych badań sugerują, że produkcja IL-22 i jej działanie przeciwzapalne może stanowić dla organizmu swoistą barierę przed powstawaniem nowotworów.

W badaniach Voigt i wsp. [30] wykazano, że komórki nowotworowe indukowały wytwarzanie IL-22 poprzez aktywację genu NLRP3 co w konsekwencji prowadziło do zwiększonego uwalniania IL-1 α w swoim otoczeniu. Cytokiny z rodziny IL-1 indukują uwalnianie IL-22 przez komórki układu odpornościowego, sprzyjając tym samym rozwojowi guza. Wang i wsp. [31] wykazali zwiększoną ekspresję limfocytów Th22, które wytwarzają w mikrośrodowisku guza IL-22, co może stymulować rozrost guza oraz wpływać na dalsze rokowanie pacjenta.

5. Wnioski

1. Wykazane zmiany stężenia IL-21 oraz IL-22 w surowicy pacjentek z nowotworem macicy mogą wskazywać na udział badanych parametrów w patogenezie nowotworów macicy, w tym w odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz pronowotworowej.
2. Przeprowadzona analiza nie wykazała związku pomiędzy stężeniem badanych parametrów a rodzajem nowotworu i stopniem złośliwości raka.

Literatura

1. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/616-poland-fact-sheets.pdf> 21.03.2021 r.
2. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/24-Corpus-uteri-fact-sheet.pdf> 21.03.2021 r.
3. Banno K., Yanokura M., Iida M., Masuda K., Aoki D., *Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: Involvement of genetics and epigenetics*, Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 40(8), 2014, s. 1957-1967.
4. <https://www.cancer.net/cancer-types/uterine-cancer/statistics> 21.03.2021 r.
5. Kluz T., *Badania proteomiczne raka endometrium*, Poznań, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, 2018.
6. Aleksandrovych V., Bereza T., Sajewicz M., Walocha J.A., Gil K., *Uterine fibroid: common features of widespread tumor*, Folia Medica Cracoviensia, 4, 2015, s. 61-75.
7. Zlatko D., *The Cytokines of the Immune System: The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response*, Elsevier Science, 2015, s. 143-239.
8. Spolski R., Leonard W.J., *Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential*. Nature reviews, Drug Discovery, 13(5), 2014, s. 379-395.
9. Davis M.R., Zhu Z., Hansen D.M., Bai Q., Fang Y., *The role of IL-21 in immunity and cancer*, Cancer Letters, 358, 2015, s. 107-114.
10. Buettner R., Mora L.B., Jove R., *Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention*, Clin. Cancer Res, 8, 2002, s. 945-954.
11. Xie M.H., Aggarwal S., Ho W.H., Foster J., Zhang Z., Stinson J., Wood W.I., Goddard A.D., Gurney A.L., *Interleukin (IL)-22, a Novel Human Cytokine That Signals through the Interferon Receptor-related Proteins CRF2-4 and IL-22R*, The Journal of Biological Chemistry, 275(40), 2000, s. 31335-31339.

12. Wei H., Li B., Sun A., Guo F., *Structural Immunology, Advances in Experimental Medicine and Biology. Chapter 4: Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure*, Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019, s. 1172: 83-86.
13. Dudakov J.A., Hanash A.M., van der Brink M.R.M., *Interleukin-22: immunobiology and pathology*, *Annu Rev Immunol.*, 33, 2015, s. 747-785.
14. Hernandez P., Gronke K., Diefenbach A., *A catch-22: Interleukin-22 and cancer*, *Eur. J. Immunol.*, 48, 2018, s. 15-31.
15. Shabgah A.G., Navashenaq J.G., Shabgah O.G., Mohammadi H., Sahebkar A., *Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections*, *Autoimmunity Reviews*, 16(12), 2017, s. 1209-1218.
16. Hegde P.S., Chen D.S., *Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy*, *Immunity*, 52(1), 2020, s.17-35.
17. Batra S.A., Rathi P., Guo L., Courtney A.N., Fleurence J., Balzeau J., Shaik R.S., Nguyen T.P., Wu M.F., Bulsara S., Mamonkin M., Metelitsa L.S., Heczey A., *Glypican-3-Specific CAR T Cells Coexpressing IL15 and IL21 Have Superior Expansion and Antitumor Activity against Hepatocellular Carcinoma*, *Cancer Immunol Res.*, 8(3), 2020, s. 309-320.
18. Seo H., Kim B-S., Bae E-A., Min B.S., Han Y.D., Shin S.J., Kang C-Y., *IL-21 Therapy Combined with PD-1 and Tim-3 Blockade Provides Enhanced NK Cell Antitumor Activity against MHC Class I-Deficient Tumors*, *Cancer Immunol. Res.*, 6, 2018, s. 683-695.
19. Xue D., Yang P., Wei Q., Li X., Lin L., Lin T., *IL-21/IL-21R inhibit tumor growth and invasion in non-small cell lung cancer cells via suppressing Wnt/ β -catenin signaling and PD-L1 expression*, *International Journal of molecular medicine*, 44, 2019, s. 1697-1706.
20. Bhatt S., Matthews J., Parvin S., Sarosiek K.A., Zhao D., Jiang X., Isik E., Letai A., Lossos I.S., *Direct and immune-mediated cytotoxicity of interleukin-21 contributes to antitumor effects in mantle cell lymphoma*, *Blood*, 126 (13), 2015, s. 1555-1564.
21. Hermans D., Gautam S., García-Cañaveras J.C., Gromer D., Mitra S., Spolski R., Li P., Christensen S., Nguyen R., Lin J.X., Oh J., Du N., Veenbergen S., Fioravanti J., Ebina-Shibuya R., Bleck C., Neckers L.M., Rabinowitz J.D., Gattinoni L., Leonard W.J., *Lactate dehydrogenase inhibition synergizes with IL-21 to promote CD8⁺ T cell stemness and antitumor immunity*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 17, 117(11), 2020, s. 6047-6055.
22. Li Y., Cong Y., Jia M., He Q., Zhong H., Zhao Y., Li H., Yan M., You J., Liu J., Chen L., Hang H., Wang S., *Targeting IL-21 to tumor-reactive T cells enhances memory T cell responses and anti-PD-1 antibody therapy*, *Nat Commun*, Feb 11, 12(1), 2021, s. 951.
23. Browning R.L., Byrd W.H., Gupta N., Jones J., Mo X., Hertlein E., Yu L., Muthusamy N., Byrd J.C., *Lenalidomide induces interleukin-21 production by T cells and enhances IL21-mediated cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia B cells*, *Cancer Immunol Res.*, 4(8), 2016, s. 698-707.
24. Leonard W.J., Wan C.K., *IL-21 Signaling in Immunity*. *F1000Res.*, Feb 26;5, 2016, F1000 Faculty Rev-224.
25. Dong H., Zhu F., Jin S., Tian J., *Interleukin-22 regulates gastric cancer cell proliferation through regulation of the JNK signaling pathway*, *Exp Ther Med.*, 20(1), 2020, s. 205-210.
26. Zeng H., Liu Z., Wang Z., Zhou Q., Qi Y., Chen Y., Chen L., Zhang P., Wang J., Chang Y., Bai Q., Xia Y., Wang Y., Liu L., Zhu Y., Dai B., Guo J., Xu L., Zhang W., Xu J., *Intratumoral IL22-producing cells define immune-evasive subtype muscle-invasive bladder cancer with poor prognosis and superior nivolumab responses*, *Int J Cancer*, 146(2), 2020, s. 542-552.
27. Katara G.K., Kulshrestha A., Schneiderman S., Riehl V., Ibrahim S., Beaman K.D., *Interleukin-22 promotes development of malignant lesions in a mouse model of spontaneous breast cancer*, *Mol Oncol.*, 14(1), 2020, s. 211-224.
28. Markota A., Endres S., Kobold S., *Targeting interleukin-22 for cancer therapy*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14(8), 2018, s. 2012-2015.
29. Hernandez P., Gronke K., Diefenbach A., *A catch-22: Interleukin-22 and cancer*, *Eur. J. Immunol.*, 48, 2018, s. 15-31.

30. Voigt C., May P., Gottschlich A., Markota A., Wenk D., Gerlach I., Voigt S., Stathopoulos K., Arendt A.M., Heise C., Rataj F., Janssen K-P., Königshoff M., Winter H., Himsl I., Thesler W.E., Schnuss M., Rothenfuer S., Endres S., Kobold S., *Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4+ T cells via interleukin-1 to promote tumor growth*, PNAS., 114(49), 2017, s. 12994-12999.
31. Wang T., Zhang Z., Xing H., Wang Li., Zhang G., Yu N., Wang J., Guo W., Jiang J., *Elevated Th22 cells and related cytokines in patients with epithelial ovarian cancer*, Medicine, 96, 2017, s. 43.

Ocena stężenia interleukiny-21 i interleukiny-22 w surowicy kobiet z nowotworem macicy

Streszczenie

Pomimo ciągłego rozwoju medycyny, liczba zachorowań oraz śmiertelność z powodu nowotworów macicy w Polsce nadal wzrasta. Obecnie stosowane metody diagnostyczne nie są wystarczające w rozpoznaniu choroby nowotworowej we wczesnym stadium zaawansowania klinicznego. W patogenezie nowotworów macicy istotną rolę odgrywają zaburzenia w układzie immunologicznym, a mikrośrodowisko guza wytwarza sieci immunosupresyjne zmieniając charakter odpowiedzi immunologicznej organizmu.

Interleukina-21 podczas aktywnego procesu zapalnego, spowodowanego wzrostem guza, wykazuje charakter przeciwnowotworowy indukując cytotoksyczność komórek zernych i odpowiedź prozapalną limfocytów T. Z kolei, interleukina-22 jest cytokiną o działaniu pronowotworowym sprzyjając rozwojowi nowotworu oraz powstawaniu ognisk wtórnych.

Celem pracy była analiza stężenia IL-21 oraz IL-22 w surowicy kobiet z mnogimi mięśniakami macicy i rakiem błony śluzowej trzonu macicy. W związku z tym, w surowicy 17 pacjentek z rozpoznanymi mnogimi mięśniakami macicy (*Leiomyomata uteri*) oraz 23 kobiet z rakiem trzonu macicy (*Adenocarcinoma corporis uteri*) oznaczono stężenie badanych interleukin z wykorzystaniem metody immunoenzymatycznej ELISA. Analiza statystyczna wykazała, że stężenie IL-21 w surowicy kobiet z mnogimi mięśniakami macicy i rakiem trzonu macicy było istotnie statystycznie niższe ($p < 0,0001$) w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast stężenie IL-22 w surowicy kobiet z rakiem trzonu macicy, jak i mnogimi mięśniakami macicy było istotnie statystycznie wyższe ($p < 0,0001$) względem zdrowych kobiet. Wykazane różnice stężenia obu interleukin mogą wskazywać na udział badanych parametrów w patogenezie nowotworów macicy, w tym w odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz pronowotworowej.

Słowa kluczowe: interleukina-21, interleukina-22, nowotwory macicy, rak trzonu macicy, mnogie mięśniaki macicy

Evaluation of serum levels of interleukin-21 and interleukin-22 in women with uterine tumors

Abstract

Despite the continuous development of the medical sciences the number of uterine tumors and fatalities is still growing in Poland. The exploratory methods used at present are not enough in diagnosis of the cancer in its early stage of the clinical advancement. The disturbed immunological system plays an important role in the pathogenesis of the uterine tumors. In addition the tumor's microenvironment produces the immunosuppression networks which change the type of the immunological systemic reaction. During the active inflamed proces caused by the growing tumor an interleukin-21 shows the antitumor features through the induction of the cytotoxicity of scavenger cells and pro-inflammatory reaction of T-cells. Whereas the interleukin-22 is a protumor cytokine which influences the development of the cancer and metastasis.

The aim of this study was to analyse IL-21 and IL-22 serum levels in women with multiple endometriomas and endometrial cancer. For that reason using the immunoenzymatic ELISA method the concentration of the examined interleukins has been determined in the serum of the 17 females diagnosed with uterine leiomyomas (*Leiomyomata uteri*) and 23 females diagnosed with endometrial cancer (*Adenocarcinoma corporis uteri*). The statistical analysis has shown that the IL-21 concentration in the serum in both groups of patients was significantly, statistically lower ($p < 0,0001$) in comparison to the control group. Whereas the IL-22 concentration in the serum in the same groups of females was significantly, statistically higher ($p < 0,0001$) than in healthy women. Described differences in the concentration of both interleukins may show the presence of the examined parameters in the pathogenesis of the uterine tumors, especially in anti- and protumor reactions.

Keywords: interleukin-21, interleukin-22, uterine tumors, endometrial cancer, uterine leiomyomas

Grzybice oportunistyczne w dobie nowotworów

1. Wstęp

Infekcje grzybicze są poważnym, światowym problemem opieki zdrowotnej. Spośród około 100 000 opisanych gatunków grzybów niespełna 300 jest w stanie wywoływać objawy chorobowe u ludzi. Należą do nich głównie gatunki oportunistyczne, które są składnikami naszej naturalnej mikrobioty. Zazwyczaj wywołują one infekcje u pacjentów z obniżoną odpornością, wywołaną na przykład zakażeniem wirusem HIV, chemioterapią w leczeniu onkologicznym, czy u osób po transplantacjach narządów [1-3]. Za większość infekcji u ludzi odpowiedzialne są gatunki z rodzajów *Cryptococcus*, *Candida* oraz *Aspergillus*. Śmiertelność wynikająca z zakażeń grzybiczych sięga około 1,6 mln przypadków rocznie [4-6].

Niestety, podobnie jak w przypadku bakterii, u grzybów również obserwuje się narastającą oporność na stosowane leki o działaniu przeciwgrzybiczym. Ze względu na podobieństwo podstawowych szlaków metabolicznych komórek grzybowych i ludzkich (komórki eukariotyczne), trudno jest o leki, które jednocześnie wykazują wysoką skuteczność przeciw patogenom i niską toksyczność w stosunku do zakażonych. W przypadku wszystkich używanych w leczeniu klinicznym grup antymikotyków (głównie azole, polieny, echinokandyny) następuje rozwój zjawiska lekooporności, co wpływa negatywnie na efekty leczenia i rokowania szczególnie ciężkich przypadków [7]. Nawet w stosunku do echinokandyn, które są najnowszą, a za razem najkrócej stosowaną grupą leków przeciwgrzybiczych, hamujących specyficznie syntezę ściany komórkowej drożdżaków i grzybów pleśniowych, stwierdza się zjawisko lekooporności. Dodatkowo, ze względu na specyficzny mechanizm działania, leki te mają ograniczone zastosowanie. Przykładowo nie są one zdolne do zwalczania zakażeń powodowanych przez drożdżaki z rodzaju *Malassezia*, czy niedawno opisanego gatunku *Candida auris* wykazującego oporność wielolekową [8-10].

Ogromnym problemem w leczeniu oportunistycznych infekcji grzybiczych jest utrudniona diagnostyka, gdyż obecność grzybów na ciele pacjenta nie jest jednoznaczna z wystąpieniem objawów klinicznych. Wiele infekcji ogólnoustrojowych wywołanych przez te patogeny nie daje początkowo charakterystycznych objawów, w dodatku precyzyjna identyfikacja patogenów wymaga czasu i zastosowania wysokospecjalistycznych testów. Precyzyjna identyfikacja patogenu jest szczególnie istotna ze względu na zróżnicowanie wrażliwości na dany antybiotyk w obrębie rodzaju, a nawet w obrębie szczepów tego samego gatunku [11, 12].

Obecnie problem infekcji grzybiczych jest coraz częściej kojarzony z zagadnieniem występowania i leczenia nowotworów. Pacjenci nowotworowi, leczeni chemioterapeutykami i poddawani radioterapii, są w grupie szczególnego ryzyka wystąpienia poważnych, ogólnoustrojowych zakażeń grzybiczych. Wynika to z upośledzenia natu-

¹ s.chmielewska@uwb.edu.pl, e.grabowska@uwb.edu.pl, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet w Białymstoku, <https://uwb.edu.pl/>.

² urszula.czyzewska@uwb.edu.pl, atyl@uwb.edu.pl, Pracownia Cytobiochemii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, <https://biologia.uwb.edu.pl/>.

ralnych mechanizmów odporności, co jest jednym z efektów ubocznych wymienionych terapii [13, 14]. Fungemie u pacjentów onkologicznych znacząco obniżają przeżywalność, dodatkowo wykazuje się, że pacjenci leczeni za pomocą chemioterapii mają wyższe ryzyko zgonu w wyniku infekcji grzybiczej niż w przypadku pacjentów leczonych operacyjnie [15-17]. Z drugiej strony odnotowuje się korelacje składu gatunkowego mykobiomu pacjentów z występowaniem konkretnych nowotworów. Przykładowo, częste infekcje *Malassezia globosa* stwierdzono u pacjentów cierpiących na nowotwór trzustki [18]. Jest to powód, dla którego należy zwrócić uwagę na problem przewlekłych, nawracających infekcji oraz poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych.

Celem niniejszej pracy jest charakterystyka mechanizmów patogenności i lekooporności u grzybów oportunistycznych na przykładzie rodzajów *Candida* oraz *Malassezia*, wskazanie zagrożeń z nimi związanych, ze szczególnym uwzględnieniem możliwego wpływu mykobiomu na rozwój nowotworów. Ponadto, zostaną przedstawione perspektywy rozwoju skorelowanego leczenia onkologicznego i przeciwgrzybiczego z wykorzystaniem związków wykazujących działanie cytostaticzne i przeciwgrzybicze.

2. Grzyby oportunistyczne na przykładzie rodzajów *Candida* i *Malassezia*

Grzyby z rodzaju *Candida*, będące drożdżakami z gromady workowców, to oportuniści zasiedlający skórę większości ssaków. Wyróżnia się ponad 30 gatunków, które mogą wywoływać szereg chorób określanymi jako kandydozy [19, 20]. Często lekceważone, przewlekłe powierzchniowe infekcje wywołane gatunkami rodzaju *Candida*, mogą prowadzić do zakażeń ogólnoustrojowych, które mogą być śmiertelne w skutkach [21]. Infekcje ogólnoustrojowe są najczęściej wynikiem przedostania się patogenu grzybiczego do krwi, a następnie do narządów i tkanek. Ryzyko jest zwiększone, gdy na powierzchni skóry mamy przewlekłe stany zapalne, stosujemy przez długi czas preparaty grzybobójcze i grzybostatyczne, co może prowadzić do selekcji szczepów opornych na stosowane leki i znacząco pogorszyć rokowania pacjentów. Infekcje wywołane tylko przez *Candida albicans* to rocznie 400 000 przypadków, następstwem których mogą być zakażenia układowe, których śmiertelność szacuje się na 46-75% [4, 22].

Ogromny problem stanowią infekcje szpitalne wywołane przez grzyby z rodzaju *Candida*, które ze względu na częstość występowania mają ogromny wpływ na poziom przeżywalności pacjentów immunosupresyjnych [17]. Poza *C. albicans* (gatunkiem izolowanym najczęściej) z przypadków klinicznych izoluje się również *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, czy *C. glabrata* (Tabela 1). Pacjenci onkologiczni, u których wystąpiła uogólniona kandydoza, mają znacząco zwiększone ryzyko zgonu [24]. Poważnym problemem w przebiegu infekcji powodowanych przez *Candida* jest wzrastająca oporność na leki, przyczyniając się do niepowodzeń w zwalczaniu infekcji ogólnoustrojowych u pacjentów z nowotworami [25].

Kolejną ważną grupą oportunistów wśród drożdżaków są grzyby z rodzaju *Malassezia* (wcześniej określane jako *Pityrosporum*). Grzyby te należą do podstawczaków i są blisko spokrewnione z patogenami roślin [26]. Do tej pory opisano 18 gatunków, które są izolowane od zwierząt, głównie ssaków [27]. Gatunki powodujące objawy kliniczne posiadają szereg koewolucyjnych przystosowań do zajmowania szczególnej niszy ekologicznej jaką jest skóra zwierząt stałocieplnych (gatunki zoofilne) i człowieka (gatunki antropofilne). Ich wspólną cechą charakterystyczną jest lipidozależność [26, 27].

Tabela 1. Częstość izolacji poszczególnych gatunków z rodzaju *Candida* z przypadków klinicznych

Gatunek	Średnia częstość izolacji % (zakres)
<i>C. albicans</i>	48,05 (17-81,7)
<i>C. parapsilosis</i>	17,8 (4-36)
<i>C. tropicalis</i>	14,8 (2-60)
<i>C. glabrata</i>	10,71 (2,2-24,2)
<i>C. krusei</i>	2,62 (0-6)
<i>C. guilliermondii</i>	2,59 (0,2-12)

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [23]

Gatunki *Malassezia* są dość powszechne wśród ludzi. Ich obecność stwierdza się u ponad połowy populacji szczególnie w klimacie ciepłym i wilgotnym, gdzie często są przyczyną objawowych chorób skóry [28]. Najczęściej izolowanymi gatunkami od ludzi zdrowych są *M. globosa* (średnio 36,4% pozytywnych izolacji) oraz *Malassezia sympodialis* (średnio 30,5% pozytywnych izolacji) [29]. W Polsce z największą częstością izoluje się gatunki *M. furfur* oraz *M. sympodialis*, które jako czynnik wiktłający są powiązane z atopowym zapaleniem skóry i łuszczycą (tab. 2). Postępujące ocieplanie klimatu może być jedną z przyczyn zwiększającej się ilości przypadków infekcji grzybiczych wywołanych przez gatunki z rodzaju *Malassezia* [30]. Poza chorobami skóry, odnotowuje się także przypadki gdzie grzyby z rodzaju *Malassezia* wywołują infekcje ogólnoustrojowe. Szczególnie narażonymi grupami pacjentów są wcześniaki oraz pacjenci geriatryczni odżywiani pozajelitowo. Jest to spowodowane adhezją grzybów na powierzchniach aparatury szpitalnej, takiej jak cewniki dożylnie doprowadzające żywność bogatą w lipidy przy współistniejących niedoborach odporności pacjentów [29, 30].

Tabela 2. Najczęściej izolowane gatunki z rodzaju *Malassezia* z przypadków klinicznych w określonych chorobach skóry

Choroba skóry	Średnia częstość izolacji gatunku % (zakres)
Łupież pstry	<i>M. globosa</i> , 51,3 (14-97)
	<i>M. sympodialis</i> 23,0 (0-63)
	<i>M. furfur</i> 19,3 (0-41)
Łojotokowe zapalenie skóry	<i>M. globosa</i> 36,6 (17-58)
	<i>M. sympodialis</i> 19,4 (1-43)
	<i>M. restricta</i> 17,5 (0-48)
Atopowe zapalenie skóry	<i>M. sympodialis</i> 43,0 (32-51)
	<i>M. globosa</i> 20,7 (18-28)
	<i>M. obtusa</i> 13,3 (0-30)
Łuszczycza	<i>M. globosa</i> 51,5 (45-58)
	<i>M. sympodialis</i> 21,0 (11-31)
	<i>M. furfur</i> 19,0 (0-38)

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [29, 35]

Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na konieczność weryfikacji zjawiska oportunistyzmu wśród grzybów. Uzyskiwane dane eksperymentalne coraz częściej wskazują na zróżnicowanie patogenności wśród szczepów należących do tego samego gatunku. Dla przykładu szczep *Malassezia pachydrematis* izolowane od psów chorych na zapalenie ucha zewnętrznego posiadają charakterystyczne cechy ułatwiające infekcje, które nie są obserwowane u szczepów pozyskiwanych od zwierząt zdrowych. W obu grupach szczepów można wyróżnić specyficzne profile lipidowe i białkowe. Obserwacje te wskazują na możliwość występowania szczepów o charakterze patogennym i komensalnym w obrębie gatunku. Oznacza to, że wystąpienie klinicznych objawów infekcji grzybiczej nie zawsze musi być skorelowane wyłącznie z zaburzeniami układu odpornościowego pacjenta [31-34].

3. Grzyby oportunistyczne – czynniki zjadliwości, oporność na leki i postępująca diagnostyka

W wielu przypadkach infekcji grzybiczych za główną przyczynę wystąpienia objawów choroby uznaje się zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego oraz hormonalnego gospodarza, co pozwala na niekontrolowany rozwój grzybów. Coraz więcej danych wskazuje, że nie są to jedyne czynniki [6, 30, 36]. Bardzo często specyficzne cechy konkretnego szczepu mogą mieć ostateczny wpływ na rozwój zakażenia. Oportunistyczne gatunki z rodzaju *Candida* charakteryzują się zróżnicowanymi mechanizmami patogenności, do których zalicza się cechy takie jak: pleomorfizm (zróżnicowanie morfologiczne zależne od warunków środowiska – przechodzenie z formy blastospor do formy strzępkowej), ekspresja białek pozwalających na adhezję do skóry i błon śluzowych lub sztucznych powierzchni (adhezyny i inwazy) czy niszczenie tkanek gospodarza (proteinyazy, lipazy, fosfolipazy) [37]. *Candida* wykazują również zdolność do szybkiej adaptacji do zmieniających się warunków środowiska (jak np. zmiany w pH) dzięki dużej plastyczności metabolizmu, systemom efektywnego pobierania składników odżywczych oraz efektywnym mechanizmem odpowiedzi na czynniki stresowe, do których należą między innymi leki przeciwgrzybicze [38]. Do takich mechanizmów należą różne reakcje na poziomie komórkowym, jak powstawanie mutacji, nadekspresja genów kodujących białka związane z aktywnym wyrzutem leków (ang. *multidrug efflux pumps*) czy też modulacja szlaków sygnałowych zależnych od kinazy białkowej A (cAMP - PKA) i szlaków zależnych od wapnia. Duże znaczenie w procesie oporności u *Candida* ma również fosfataza, kalcyneuryna, stabilizowana przez białko Hsp90. Warunkuje ona wirulencję oraz jest niezbędna do przetrwania stresu wywołanego przez leki z grupy azoli oraz echinokandyn [39, 40].

W przypadku *Malassezia* w procesach patogenezy dużą rolę odgrywają fosfolipazy, których aktywność prowadzi do uwalniania kwasu arachidonowego, którego metabolity odpowiadają za rozpoczęcie procesu zapalnego. Poza fosfolipazami, grzyby te są zdolne do syntezy lipoperoksydazy co pozwala grzybom z tego rodzaju na dezorganizację struktury błon komórek gospodarza, promując dalszy rozwój infekcji [41-43]. Zwiększona sekrecja fosfolipaz jest charakterystyczną cechą szczepów izolowanych od przypadków klinicznych, gdzie istotne znaczenie ma fosfolipaza D, której zwiększoną sekrecję wykazywano również u *C. albicans* [44]. Wyróżniającą cechą rodzaju *Malassezia* jest specyficzna budowa ściany komórkowej mająca duży wpływ na zdolności adhezyjne grzybów do komórek gospodarza, jednocześnie ograniczając odpowiedź

zapalną i możliwość fagocytozy patogenu przez komórki układu odpornościowego [41, 43, 45].

Ze względu na podobieństwo podstawowych szlaków metabolicznych komórek grzybów i ludzi dysponujemy nieznaną liczbą antymikotyków, które zalicza się do czterech głównych grup takich jak azole, polieni, echinokandyny oraz antymetabolity (tab. 3). Dodatkowym problemem terapii infekcji grzybiczych jest coraz częściej stwierdzane zjawisko lekooporności grzybów w stosunku do wszystkich znanych grup antymikotyków [46, 47]. Najmniej specyficznym mechanizmem oporności u grzybów jest zwiększona ekspresja genów kodujących pompy błonowe aktywnie usuwające lek z komórek grzybów (nadekspresja genów ABC, MDR, CDR). W wielu przypadkach obserwuje się również mutacje w genach ERG powiązanych ze szlakami syntezy ergosterolu oraz w genach MDR skojarzonych z opornością wielolekową (tab. 3). Analizy molekularne wskazują, że oporność może powstawać w wyniku działania zróżnicowanych mechanizmów, na drodze różnych szlaków metabolicznych stąd nie każdy mechanizm oporności opisany w przypadku konkretnego gatunku jest uniwersalny [2, 5, 48].

Polieni oraz azole są najstarszymi i najczęściej stosowanymi grupami leków, które używane są już od początku XX wieku. Szczególną uwagę w badaniach przypisuje się lekom z grupy azoli, gdzie mechanizmy oporności są szeroko opisane. Dużą nadzieję na zwalczanie grzybic dały leki z grupy echinokandyn, które zaburzają syntezę 1,3- β -glukanu, powodując nieprawidłowości strukturalne ściany komórkowej grzybów. Dodatkowo ogromną zaletą tych substancji jest ich niska toksyczność w stosunku do komórek gospodarza. Rodzaj *Candida* jest podatny na działanie echinokandyn, które działają tutaj grzybobójczo, natomiast w stosunku do *Aspergillus* wykazują działanie grzybostatyczne. Niektóre grupy grzybów wykazują naturalną oporność na te antymikotyki, np. *Malassezia* [49]. Niestety niektóre gatunki *Candida* wstępnie wrażliwe na działanie echinokandyn wykazują szybkie nabywanie oporności, co jest związane ze sposobem działania antymikotyku. Jedną z odpowiedzi na stres wywołany echinokandynami jest zwiększanie ilości chityny kosztem 1,3- β -glukanu w ścianie komórkowej grzyba, co znacząco ogranicza efektywność tych leków [2].

Tabela 3. Mechanizm działania wybranych grup antybiotyków oraz poznane mechanizmy lekooporności

Grupa antybiotyków	Mechanizm działania antybiotyku	Główne mechanizmy oporności
Polieni Amfoterycyna B Natamycyna Nystatyna	Tworzenie porów w błonie komórkowej grzybów poprzez łączenie się z ergosterolem	Zmniejszenie zawartości ergosterolu w błonie Mutacje w genach szlaku syntezy steroidów ERG2, ERG3, ERG5, ERG6, ERG11
Azole Clotrimazol Flukonazol Itrakonazol Ketokonazol Posakonazol Vorikonazol	Hamowanie syntezy ergosterolu – inhibicja miewalonowego szlaku syntezy steroidów (14 α -demetylazy lanosterolu)	Aktywne usuwanie leku z komórki – nadekspresja genów CDR1, CDR2, ABC1, MDR1 Zmniejszone powinowactwo leku do 14 β -demetylazy lanosterolu lub nadekspresja genów kodujących ten enzym
Echinokandyny Anidulafungina Kaspofungina Mikafungina	Inhibicja syntazy 1,3- β -glukanu	Mutacje punktowe w genie kodującym białko FKS1, jednostki katalitycznej syntazy 1,3- β -glukanu Zwiększenie ilości chityny w ścianie komórkowej

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [5, 7, 39]

Dużą rolę w oporności grzybów odgrywa również ich zdolność do tworzenia biofilmu. Biofilmy są strukturami złożonymi z mikroorganizmów i ich wydzielin, w których przeważają różnego rodzaju polisacharydy i białka. Związki wydzielane na powierzchnie biofilmu znacząco ograniczają możliwość przenikania leków do komórek, znacząco ograniczając pole ich działania. Biofilmy są tworami dynamicznymi, o bardzo złożonej strukturze powstającymi na tkankach gospodarza lub innych, adherentnych powierzchniach natury nieożywionej (różnego rodzaju powierzchnie użytkowe i narzędzia medyczne) [50, 51]. Gatunki z rodzaju *Malassezia* mogą tworzyć biofilmy wewnątrz przewodów doprowadzających dożylnie preparaty żywienia pozajelitowego bogate w lipidy, np. u wcześniaków czy pacjentów geriatrycznych. Jest to jedna z dróg, która prowadzi do poważnych infekcji układowych. Jedne z pierwszych opisanych w literaturze przypadków ogólnoustrojowych zakażeń u ludzi spowodowanych przez zoofilny gatunek *Malassezia pachydermatis*, dotyczyły prawdopodobnie przeniesienia tych patogenów przez pracowników opieki zdrowotnej posiadających psy, na narzędzia medyczne wykorzystywane do opieki nad pacjentami oddziałów intensywnej terapii [52, 53].

Warto zwrócić uwagę na fakt, że nie tylko najczęściej izolowane z przypadków klinicznych gatunki grzybów wykształcają oporność na leki. W sytuacji rzadziej izolowanych gatunków drożdżaków i pleśni pojawia się również zjawisko naturalnej niewrażliwości na leki. Zazwyczaj objawy zakażeń grzybiczych są niespecyficzne, a niektóre gatunki można rozpoznać jedynie za pomocą analiz genetycznych. Bardzo często zakażenia grzybicze diagnozuje się dopiero wtedy, kiedy antybiotyki przeciwbakteryjne nie przynoszą skutków w leczeniu [5].

Wraz ze wzrostem problemu, jaki stanowią infekcje grzybicze, w ostatnich latach obserwuje się rozwój diagnostyki tych chorób. Podstawowa diagnostyka ma swoje ograniczenia wynikające z konieczności hodowania izolatów *in vitro*, wykorzystywania metod mikroskopii czy histopatologii, co jest czasochłonne, podczas gdy przypadki infekcji ogólnych wymagają natychmiastowej i precyzyjnej diagnostyki w celu skutecznego leczenia. Wprowadzanie do leczenia antybiotyków „pierwszego rzutu”, które mogą być nieskuteczne względem patogenów powodujących infekcję, może przyczynić się do wzrostu oporności na drodze selekcji i rozprzestrzeniania szczepów opornych [11, 54]. W obrębie rodzaju poszczególne gatunki wykazują zróżnicowaną podatność na antybiotyki. Dla przykładu *Candida krusei* oraz *C. glabrata* wykazują mniejszą podatność na azole i polieny, a *C. parapsilosis* czy *C. guilliermondii* są bardziej odporne na echinokandyny. Pomocnym rozwiązaniem w rozróżnianiu gatunków drożdżaków są testy API, które bazując na różnicach w metabolizmie, pozwalają na sprawną identyfikację, bez użycia metod mikroskopowych i molekularnych. Wprowadzanie do leczenia antybiotyków bez dokładnej diagnostyki może prowadzić do nasilenia zjawiska lekooporności u gatunków, które do tej pory nie były odpowiedzialne za infekcje powodujące objawy kliniczne. Dodatkowo, odnotowywano szczególnie niebezpieczne przypadki oporności krzyżowej na amfoterycynę B i azole czy echinokandyny [5, 55]. Dostępność do szybkiej i precyzyjnej diagnostyki jest kluczowa z punktu widzenia skutecznego leczenia i hamowania zjawiska lekooporności. Aktualnie nowoczesne systemy MALDI-TOF MS będące coraz częściej na wyposażeniu diagnostycznych laboratoriów mikrobiologicznych, pozwalają na dość sprawne przypisanie drożdżaków i pleśni do

gatunku, z większą czułością niż metody konwencjonalne. Mimo, że analiza zajmuje około 10 minut, metoda ta nadal obciążona jest czasochłonnym procesem hodowli grzybów i przygotowania analitu [56-58]. Rozwiązaniem mogą okazać się techniki, które nie opierają się na hodowlach, tylko na bezpośrednim wykrywaniu obecności poszczególnych gatunków w pobranym od chorego materiale z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. Postępujący rozwój takich technik może w najbliższym czasie pozwolić na zastąpienie konwencjonalnych metod identyfikacji metodami bardziej czułymi i mniej czasochłonnymi [57].

4. Grzyby i nowotwory – niebezpieczny związek

Problemy diagnostyczne przy identyfikacji patogenów i zróżnicowanej oporności na różne grupy leków powodują coraz poważniejsze problemy w zwalczaniu grzybic, szczególnie ogólnoustrojowych [59]. Grzyby oportunistyczne naturalnie zasiedlają powierzchnię naszej skóry, jednak prawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy, jak i odpowiednio zbalansowany mikrobiom, są w stanie ograniczać rozwój zakażeń oportunistycznych. W momencie zaburzeń układu odpornościowego, często związanych z różnymi procedurami medycznymi, równowaga naszego mikrobiomu może zostać zaburzona, wtedy najczęściej dochodzi do rozwoju infekcji oportunistycznych [60]. Obecnie w dobie coraz częściej stwierdzanych przypadków chorób nowotworowych pojawia się grupa pacjentów szczególnego ryzyka zakażeń grzybiczych. Są to osoby poddawane standardowym procedurom chemioterapii czy transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych, jak i nowym zabiegom immunoterapii prowadzącym do ograniczenia efektywności układu odpornościowego. Ten efekt uboczny leczenia nowotworów stwarza warunki szczególnej podatności pacjentów na zakażenia oportunistyczne. Z drugiej strony, od dawna prowadzone są badania korelacji mikrobiomu z przebiegiem chorób nowotworowych, jednak zazwyczaj badania dotyczyły bakterii [61]. Jak się okazuje, specyficzne środowisko w obrębie guza nowotworowego może znacząco sprzyjać również niektórym gatunkom grzybów, które poprzez sekrecję niektórych enzymów mogą promować rozwój nowotworów [18, 62]. Do tej pory wykazano zależność pomiędzy infekcjami grzybiczymi a nowotworami jelita grubego, przelyku oraz trzustki [63]. Co więcej, badania pacjentów onkologicznych, od których wyizolowano grzyby *C. albicans* wykazały, że w porównaniu do grupy kontrolnej (pacjenci, u których nie stosowano leczenia przeciwnowotworowego) mikroorganizmy te wytwarzały większe ilości fosfolipaz czy też proteinaz. Produkcja fosfolipaz zwiększała się wraz z przedłużającą się chemioterapią. Zwiększenie sekrecji tych enzymów może zwiększyć ryzyko rozwoju sepsy czy też infekcji jamy ustnej [64]. Co ciekawe, grzyby z gatunku *C. glabrata* wyizolowane od pacjentów onkologicznych wykazywały szereg oporności na antymikotyki takie jak flukonazol czy kaspofungina [65]. Podobnie w przypadku nowotworu jelita grubego wykazano zmiany w mykobiocie jelitowej, w szczególności zaobserwowano zmiany w stosunku ilościowym grzybów należących do *Ascomycota/Basidiomycota*. Zarówno w przypadku raka jelita grubego, jak również w obecności polipów okrężnicy wykazano większą częstotliwość występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* niż w grupie kontrolnej [66]. Ponadto wykazano, że *Malassezia spp.* mogą promować proces zapalny w obszarze nowotworu trzustki [18, 63]. Może to wskazywać na rolę grzybów w procesie rozwoju zmian nowotworowych w tym odcinku przewodu pokarmowego. W badaniach wykazano dużą obfitość

M. globosa w obrębie nowotworu trzustki, o wiele większą niż w innych częściach przewodu pokarmowego. Zwiększony proces zapalny wywołany przez te grzyby powoduje nadekspresję proteiny wiążącej mannozę (ang. *mannose binding lectin*, MBL), która poprzez aktywację układu dopełniacza mobilizuje procesy układu odpornościowego do zwalczania patogenów. Niestety okazuje się, że układ dopełniacza może być powiązany z rozwojem nowotworów, ponieważ jego prozapalne działanie może zwiększać przeżywalność komórek nowotworowych. Badania na myszach wykazały, że mutacje w genach kodujących proteinę MBL powodowały zatrzymanie progresji nowotworu, co potwierdza fakt wpływu tej proteiny na proces nowotworzenia. Dodatkowo badania wykazały, że jednoczesne stosowanie leków przeciwgrzybiczych w czasie leczenia onkologicznego zwiększało skuteczność chemioterapii, mającej na celu regresję nowotworu [18, 66, 67].

Infekcje spowodowane grzybami z rodzaju *Candida* obejmują często zapalenie wsierdza, infekcje krwi czy zakażenia ogólnoustrojowe [68], co z pewnością przysparza wiele problemów związanych z leczeniem zarówno nowotworów, jak i samych infekcji grzybiczych. Ponadto, w przypadku nowotworów płuc wykazano, że w ponad 15% wycinków zmian nowotworowych wykazywało jednocześnie zakażenia grzybami z rodzaju *Candida* [69].

5. Nowotwory i grzybnice – czy terapia skojarzona jest dobrą strategią?

Doniesienia opisane w poprzednim rozdziale wskazują na potrzebę połączenia leczenia dwóch poważnych, słabo rokujących schorzeń, jakimi są nowotwory oraz współistniejące zakażenia wywołane przez patogeny grzybowe. Jednoczesne stosowanie związków przeciwgrzybiczych i przeciwnowotworowych może być ograniczone, ze względu na wysoką toksyczność obydwu terapii. Obecnie posiadamy szereg metod, które pozwalają na ograniczenie zmian nowotworowych, tj. radioterapia, chemioterapia czy coraz szerzej wykorzystywana immunoterapia. Ciekawym zagadnieniem może okazać się również wpływ samych leków przeciwgrzybiczych na rozwój nowotworów. Przykładem jest chociażby itrakonazol, który może wykazywać działanie antynowotworowe względem raka prostaty. Ponadto, przeprowadzane są liczne badania kliniczne, mające na celu wykorzystanie tego związku w terapii przeciwnowotworowej [70]. Inne badania przeprowadzone na liniach komórkowych raka piersi (MCF-7 oraz MDA-MB-231) wykazały, że zastosowanie ketokonazolu czy też klotrimazolu zmniejszyło tempo proliferacji komórek nowotworowych [71]. Na podstawie tych kilku badań można przypuszczać, że związki, które uznawane są jako leki przeciwgrzybicze, mogą mieć zastosowanie również jako leki przeciwnowotworowe.

Inną ciekawą grupą związków są substancje posiadające zastosowanie przeciwnowotworowe, które wykazują również działanie przeciwgrzybicze (ale nie są stosowane w tym celu), jak na przykład oridonina, która może wpływać na rewersję wrażliwości u szczepów *C. albicans* opornych na azole lub oksytiamina, będąca antymetabolitem tiaminy [72, 73].

Tiamina (witamina B₁) znana jest od prawie stu lat i przypisuje się jej znaczenie w metabolizmie węglowodanów oraz szeroko pojętej bioenergetyce komórek. Pirofosforan tiaminy jest koenzymem enzymów takich jak transketolaza czy kompleksy dehydrogenaz 2-oksokwasów [73]. Bioenergetyka nowotworów różni się od metabolizmu zdrowych komórek [74]. Komórki nowotworowe wykazują często tzw. efekt Warburga,

co oznacza że preferują beztlenowe procesy bioenergetyczne [75]. Nowsze wyniki badań wskazują jednak, że nawet te komórki znaczącą część energii pozyskują w wyniku fosforylacji oksydacyjnej [76]. Wspomniana już oksytiamina, a w zasadzie jej pirofosforan, jako antykoenzym jest zdolny hamować aktywność dehydrogenazy pirogromianowej i dehydrogenazy 2-oksogluutaranowej ograniczając tempo cyklu Krebsa i w konsekwencji fosforylacji oksydacyjnej. Z drugiej strony, oksytiamina ogranicza aktywność zależnej od difosforanu tiaminy transketolazy zaangażowanej w przemiany szlaku pentozofosforanowego [77], co może wpływać na dostawę pentoz niezbędnych w procesie replikacji i transkrypcji mających kluczowe znaczenie dla szybko proliferujących komórek nowotworowych. Badania wpływu oksytiaminy na rozwój guza Ehrlich'a w modelach zwierzęcych wykazały ograniczenie proliferacji komórek nowotworowych około 90%, jak również zmniejszenie wielkości guza o ponad 80% [78]. Z tych powodów wzrasta zainteresowanie oksytiaminą jako potencjalnym inhibitorem podziałów komórek. Wyniki najnowszych badań przeprowadzonych na linii komórkowej HeLa wykazały, iż oksytiamina, zarówno w postaci wolnej, jak również w postaci pirofosforanu powoduje ograniczenie proliferacji komórek, a także aktywację procesu apoptozy [79].

Ze względu na wpływ antywitamin na energetykę komórki, mogą one mieć zastosowanie w zwalczaniu nie tylko komórek nowotworowych ale również komórek patogenów grzybowych. W związku z licznymi przypadkami infekcji grzybiczych u osób z chorobami nowotworowymi warto przyrzeć się oddziaływaniu opisanej oksytiaminy na komórki drożdżaków. Jeden z eksperymentów wykonany na niepatogennym gatunku *Saccharomyces cerevisiae* wykazał jej hamujący wpływ zarówno na przyrost komórek, jak również na ich żywotność [80]. Inne badania przeprowadzone zarówno na *S. cerevisiae*, jak i oportunistycznych grzybach z rodzaju *Candida* (*C. albicans*) i *Malassezia* (*M. pachydermatis*) z wykorzystaniem różnych antywitamin tiaminy, wykazywały efekt antyproliferacyjny oksytiaminy, z czego najbardziej podatny na to działanie był *M. pachydermatis*, preferujący metabolizm tlenowy. Kolejne badania dotyczące już skojarzonego działania ketokonazolu z oksytiaminą wykazały na addytywne działanie tych związków [81-83]. Dalsze badania, szczególnie w warunkach *in vivo*, są kluczowe aby związki chemiczne działające jednocześnie przeciwnowotworowo i przeciwgrzybiczo mogły być wykorzystywane do terapii skojarzonej obu chorób, co może okazać się rozwojową strategią terapeutyczną.

6. Podsumowanie

Grzyby oportunistyczne, wbrew pozorom, mogą stanowić śmiertelne zagrożenie. Poza powodowaniem groźnych infekcji szpitalnych, szczególnie w grupie pacjentów z obniżoną odpornością, mogą one wpływać na skuteczność innych terapii. Dodatkowo, nieustannie mierzymy się z problemem narastającej oporności na dostępne leki przeciwgrzybicze. Ostatnie badania wskazują, że podobnie jak bakterie, grzyby mogą również wpływać na wzrost i rozwój nowotworów, obniżając jednocześnie skuteczność stosowanych terapii przeciwnowotworowych, a tym samym szanse przeżycia pacjentów.

Z tego względu należy rozwijać rozwiązania, w obszarze onkologii, które pozwolą na skojarzone zwalczanie nowotworów i współtowarzyszących im grzybic. Jednak opracowanie tego typu strategii, jak również badania nad substancjami, które mogą być w nich wykorzystane są na początkowym etapie. Aktualnie warto zwrócić uwagę, że

badania i diagnostyka nowotworów powinny uwzględniać skład mikrobioty zarówno w organizmie chorego człowieka i w mikrośrodowisku nowotworu.

Wraz z postępującym rozwojem diagnostyki grzybic, jak i nowo opisywanym substancjom, które wykazują działanie przeciwgrzybicze i przeciwnowotworowe, możemy mieć nadzieję na rozwój strategii terapii skojarzonej, co w perspektywie czasu może poprawić skuteczność leczenia pacjentów z nowotworami, szczególnie narażonych na wnikające grzybnice oportunistyczne.

Literatura

1. Bhattacharya S., Sae-Tia S., Fries B.C., *Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance*, Antibiotics, 9, 2020, s. 1-19.
2. Krishnasamy L., Krishnakumar S., Kumaramanickavel G., Saikumar C., *Molecular mechanisms of antifungal drug resistance in Candida species*, Journal of Clinical and Diagnostic Research, 12, 2018, s. 1-6.
3. Hawksworth D.L., *The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited*, Mycological Research, 105, 2001, s. 1422-1432.
4. Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A.R., Levitz S.M., Netea M.G., White T.C., *Hidden Killers: Human Fungal Infections*, Science Translational Medicine, 4, 2012, s. 1-9.
5. Ksiezopolska E., Gabaldón T., *Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens*, Genes, 9, 2018, s. 1-25.
6. Geddes-McAlister J., Shapiro R.S., *New pathogens, new tricks: Emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1435, 2019, s. 57-78.
7. Berman J., Krysan D.J., *Drug resistance and tolerance in fungi*, Nature Reviews Microbiology, 18, 2020, s. 319-331.
8. Lockhart S.R., *Candida auris and multidrug resistance: Defining the new normal*, Fungal Genetics and Biology, 131, 2019, s. 1-5.
9. Perlin D.S., Shor E., Zhao Y., *Update on Antifungal Drug Resistance*, Current Clinical Microbiology Reports, 2, 2015, s. 84-95.
10. Lin S.Y., Lu P.L., Tan B.H., Chakrabarti A., Wu U.I., Yang J.H., Patel A.K., Li R.Y., Watcharananan S.P., Liu Z., Chindamporn A., Tan A., Sun., Hsu L.Y., Chen Y.C., on behalf of the Asia Fungal Working Group (AFWG), *The epidemiology of non-Candida yeast isolated from blood: The Asia Surveillance Study*, Mycoses, 62, 2019, s. 112-120.
11. Wickes B.L., Wiederhold N.P., *Molecular diagnostics in medical mycology*, Nature Communications, 9, 2018, s. 1-13.
12. Pfaller M.A., Diekema D.J., Gibbs D.L., Newell V.A., Meis J.F., Gould I.M., Gould I.M. Fu W., Colombo A.L., Rodriguez-Noriega E., *Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of Candida Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing*, Journal of Clinical Microbiology, 45, 2007, s. 1735-1745.
13. Low C.Y., Rotstein C., *Emerging fungal infections in immunocompromised patients*, F1000 Medicine Reports, 3, 2011, s. 1-8.
14. Anaissie E.J., Vartivarian S.E., Bodey G.P., *Emerging Fungal Pathogens in Immunocompromised Patients: Classification, Diagnosis, and Management*, Clinical Infectious Diseases, 17, 1993, s. 487-491.
15. Li D., Li T., Bai C., Zhang Q., Li Z., Li X., *A predictive nomogram for mortality of cancer patients with invasive candidiasis: a 10-year study in a cancer center of North China*, BMC Infectious Diseases, 21, 2021, s. 1-10.

16. Doi A.M., Pignatari A.C.C., Edmond M.B., Marra A.R., Camargo L.F.A., Siqueira R.A., Da Mota V.P.C., Colombo A.L., *Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program*, PLoS ONE, 11, 2016, s. 1-9.
17. Choi Y., Lee B., Park S.A., *Epidemiological study on Candida species in patients with cancer in the intensive care unit*, Osong Public Health and Research Perspectives, 8, 2017, s. 384-388.
18. Aykut B., Pushalkar S., Chen R., Li Q., Abengozar R., Kim J.I., Shadaloey, Sorin A., Wu D., Preiss P., Verma N., Guo Y., Saxena A., Vardhan M., Diskin B., Wang W., Leinwand J., Kurz E., Kochen Rossi J.A., Hundeyin M., Zambrinis C., Li X., Saxena Deepak., Miller G., *The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL*, Nature, 574, 2019, s. 264-267.
19. Gabaldón T., Naranjo-Ortíz M.A., Marcet-Houben M., *Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina*, FEMS Yeast Research, 16, 2016, s. 1-10.
20. Hernández-Cervantes A., Znaidi S., van Wijlick L., Denega I., Basso V., Ropars J., Sertour N., Sullivan D., Moran G., Basmacıyan L., Bon F., Dalle F., Bougnoux M.E., Boekhout T., Yang Y., Li Z., Bachellier-Bassi S., D'Enfert C., *A conserved regulator controls asexual sporulation in the fungal pathogen Candida albicans*, Nature Communications, 11, 2020, s. 1-16.
21. Ford C.B., Funt J.M., Abbey D., Issi L., Guiducci C., Martinez D.A., Delorey T., Li B.Y., White T.C., Cuomo C., Rao R.P., Berman J., Thompson D.A., Regev A., *The evolution of drug resistance in clinical isolates of Candida albicans*, eLife, 4, 2015, s. 1-27.
22. Pal M., *Morbidity and Mortality Due to Fungal Infections*, Journal of Applied Microbiology and Biochemistry, 01, 2018, s. 2-4.
23. Falagas M.E., Roussos N., Vardakas K.Z., *Relative frequency of albicans and the various non-albicans Candida spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review*, International Journal of Infectious Diseases, 14, 2010, s. 954-966.
24. Slavin M.A., Sorrell T.C., Marriott D., Thursky K.A., Nguyen Q., Ellis D.H., Morrissey C., Orla C., Sharon C.A.C., *Candidaemia in adult cancer patients: Risks for fluconazole-resistant isolates and death*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65, 2010, s. 1042-1051.
25. Gülhan B., Kanik-Yüksek S., Özkaya-Parlakay A., Yaraı N., Tezer H., Özbek N.Y., *Invasive fungal infection in children with hematologic malignancy*, Turkish Journal of Pediatrics, 61, 2019, s. 159-165.
26. Wu G., Zhao H., Li C., Rajapakse M.P., Wong W.C., Xu J., Saunders, Charles W. Reeder N.L., Reilman R.A., Scheynius A., Sun S., Billmyre B.R., Li W., Averette A.F., Mieczkowski P., Heitman J., Theelen B., Schröder M.S., De Sessions P.F., Butler G., Maurer-Stroh S., Boekhout T., Nagarajan, N., Dawson T.L., *Genus-Wide Comparative Genomics of Malassezia Delineates Its Phylogeny, Physiology, and Niche Adaptation on Human Skin*, PLoS Genetics, 11, 2015, s. 1-26.
27. Guillot J., Bond R., *Malassezia Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10, 2020, s. 1-11.
28. Rojas F.D., Córdoba S.B., de los Angeles Sosa M., Zalazar L.C., Fernández M.S., Cattana M.E., Alegre L.R., Carrillo-Muñoz A.J., Giusiano G.E., *Antifungal susceptibility testing of Malassezia yeast: comparison of two different methodologies*, Mycoses, 60, 2017, s. 104-111.
29. Gaitanis G., Magiatis P., Hantschke M., Bassukas I.D., Velegraki A., *The Malassezia genus in skin and systemic diseases*, Clinical Microbiology Reviews, 25, 2012, s. 106-141.
30. Garcia-Solache M.A., Casadevall A., *Global warming will bring new fungal diseases for mammals*, mBio, 1, 2010, s. 1-3.

31. Czyżewska U., Siemieniuk M., Pyrkowska A., Nowakiewicz A., Bieganska M., Dabrowska I., Bartoszewicz M., Dobrzym P., Tylicki A., *Comparison of lipid profiles of Malassezia pachydermatis strains isolated from dogs with otitis externa and without clinical symptoms of disease*, Mycoses, 59, 2016, s. 20-27.
32. Cafarchia C., Gasser R.B., Latrofa M.S., Parisi A., Campbell B.E., Otranto D., *Genetic variants of Malassezia pachydermatis from canine skin: body distribution and phospholipase activity*, FEMS Yeast Research, 8, 2008, s. 451-459.
33. Czyżewska U., Bartoszewicz M., Siemieniuk M., Tylicki A., *Genetic relationships and population structure of malassezia pachydermatis strains isolated from dogs with otitis externa and healthy dogs*, Mycologia, 110, 2018, s. 666-676.
34. Czyżewska U., Karkowska-Kuleta J., Bartoszewicz M., Siemieniuk M., Zambrzycka A., Tylicki A., *Differences in protein profiles between Malassezia pachydermatis strains obtained from healthy and infected dogs*, Mycologia, 111, 2019, s. 624-631.
35. Czyżewska U., Siemieniuk M., Bartoszewicz M., Tylicki A., *Grzyby z rodzaju Malassezia jako oportuniści ludzi i zwierząt*, Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej, 72, 2018, s. 359-375.
36. Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D.W., Azeredo J., *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis : biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*, FEMS Microbiology Reviews, 36, 2012, s. 288-305.
37. Staniszevska M., Bondaryk M., Piłat J., Siennicka K., Magda U.K.W., *Czynniki zjadliwości Candida albicans*, Przegląd Epidemiologiczny, 66, 2012, s. 629-633.
38. Mayer F.L., Wilson D., Hube B., *Candida albicans pathogenicity mechanisms*, Virulence, 4, 2013, s. 119-128.
39. Costa-de-oliveira S., Rodrigues A.G., *Candida albicans antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal*, Microorganisms, 8, 2020, s. 1-19.
40. Cowen L.E., Steinbach W.J., *Stress, drugs, and evolution: The role of cellular signaling in fungal drug resistance*, Eukaryotic Cell, 7, 2008, s. 747-764.
41. Sommer B., Overy D.P., Kerr R.G., *Identification and characterization of lipases from Malassezia restricta, a causative agent of dandruff*, FEMS yeast research, 15, 2015, s. 1-8.
42. Buommino E., Nocera F.P., Parisi A., Rizzo A., Donnarumma G., Mallardo K., Fiorito F., Baroni A., De Martino L., *Correlation between genetic variability and virulence factors in clinical strains of Malassezia pachydermatis of animal origin*, New Microbiologica, 39, 2016, s. 216-223.
43. De Luca C., Picardo M., Breathnach A., Passi S., *Lipoperoxidase activity of Pityrosporum: Characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor*, Experimental Dermatology, 5, 1996, s. 49-56.
44. Hube B., Hess D., Baker C.A., Schaller M., Schäfer W., Dolan J.W., *The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of Candida albicans*, Microbiology, 147, 2001, s. 879-889.
45. Mittag H., *Fine structural investigation of Malassezia furfur. II. The envelope of the yeast cells: Feinstrukturelle Untersuchung von Malassezia furfur. II. Die Zellwand der Hefezellen*, Mycoses, 38, 1995, s. 13-21.
46. Morio F., Jensen R.H., Le Pape P., Arendrup M.C., *Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts*, International Journal of Antimicrobial Agents, 50, 2017, s. 599-606.
47. Sanglard D., *Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens*, Frontiers in Medicine, 3, 2016, s. 1-10.
48. Cowen L.E., *The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype*, Nature Reviews Microbiology, 6, 2008, s. 187-98.

49. Rhimi W., Theelen B., Boekhout T., Aneke C.I., Otranto D., Cafarchia C., *Conventional therapy and new antifungal drugs against Malassezia infections*, Medical Mycology, 2020, s. 1-20.
50. Morales D.K., Hogan D.A., *Candida albicans interactions with bacteria in the context of human health and disease*, PLoS Pathogens, 6, 2010, s. 1-4.
51. Staniszewska M., Bondaryk M., Kowalska M., Magda U., Łuka M., Ochal Z., Kurzątkowski W., *Patogeneza i leczenie zakażeń Candida spp.*, Postępy Mikrobiologii, 53, 2014, s. 229-240.
52. Chang H.J., Miller H.L., Watkins N., Arduino M.J., Ashford D.A., Midgley G., Agüero S.M., Pinto-Powell R., von Reyn C.F., Edwards W., McNeil M.M., Jarvis W.R., Pruitt R., *An Epidemic of Malassezia pachydermatis in an Intensive Care Nursery Associated with Colonization of Health Care Workers' Pet Dogs*, New England Journal of Medicine, 338, 1998, s. 706-711.
53. Peano A., Johnson E., Chiavassa E., Tizzani P., Guillot J., Pasquetti M., *Antifungal resistance regarding Malassezia pachydermatis: Where are we now?*, Journal of Fungi, 6, 2020, s. 1-27.
54. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., Clancy C.J., Marr K.A., Ostrosky-Zeichner L., Reboli A.C., Schuster M.G., Vazquez J.A., Walsh T.J., Zaoutis T.E., Sobel J.D., *Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America*, Clinical Infectious Diseases, 62, 2015, s. 1-50.
55. Espinel-Ingroff A., Cantón E., Pemán J., *Antifungal Resistance among Less Prevalent Candida Non-albicans and Other Yeasts versus Established and under Development Agents: A Literature Review*, Journal of Fungi, 7, 2021, s. 1-19.
56. Sanguinetti M., Posteraro B., *Susceptibility Testing of Fungi to Antifungal Drugs*, Journal of Fungi, 4, 2018, s. 1-16.
57. Weiss Z.F., Leon A., Koo S., *The evolving landscape of fungal diagnostics, current and emerging microbiological approaches*, Journal of Fungi, 7, 2021, s. 1-27.
58. Oliver J.C., Laghi L., Parolin C., Foschi C., Marangoni A., Liberatore A., Dias A.L.T., Cricca M., Vitali B., *Metabolic profiling of Candida clinical isolates of different species and infection sources*, Scientific Reports, 10, 2020, s. 1-14.
59. Ostrosky-Zeichner L., *Invasive mycoses: Diagnostic challenges*, American Journal of Medicine, 125, 2012, s. 14-24.
60. Halpin A.L., de Man T.J.B., Kraft C.S., Perry K.A., Chan A.W., Lieu S., Mikell J., Limbago B.M., McDonald L.C., *Intestinal microbiome disruption in patients in a long-term acute care hospital: A case for development of microbiome disruption indices to improve infection prevention*, American Journal of Infection Control, 44, 2016, s. 830-836.
61. Schulze J., Sonnenborn U., *Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents*, Deutsches Arzteblatt, 106, 2009, s. 837-842.
62. Helmk B.A., Khan M.A.W., Hermann A., Gopalakrishnan V., Wargo J.A., *The microbiome, cancer, and cancer therapy*, Nature Medicine, 25, 2019, s. 377-388.
63. Dambuzá I.M., Brown G.D., *Fungi accelerate pancreatic cancer*, Nature, 574, 2019, s. 184-185.
64. Ramla S., Sharma V., Patel M., *Influence of cancer treatment on the Candida albicans isolated from the oral cavities of cancer patients*, Supportive Care in Cancer, 24, 2016, s. 2429-2436.
65. Farmakiotis D., Tarrand J.J., Kontoyiannis D.P., *Drug-Resistant Candida glabrata Infection in Cancer Patients*, Emerging Infectious Diseases, 20, 2014, s. 1833-1840.
66. Gao R., Kong C., Li H., Huang L., Qu X., Qin N., Qin H., *Dysbiosis signature of mycobiota in colon polyp and colorectal cancer*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 36, 2017, s. 2457-2468.

67. Dambuzza I.M., Brown G.D., *Fungi accelerate pancreatic cancer*, Nature, 574, 2019, s. 184-185.
68. Angarone M., *Fungal infections in cancer patients*, Cancer Treatment and Research, 161, 2015, s. 129-155.
69. Apostolou P., Tsantsaridou A., Papatotiriou I., Toloudi M., Chatziioannou M., Giamouzis G., *Bacterial and fungal microflora in surgically removed lung cancer samples*, Journal of Cardiothoracic Surgery, 6, 2011, s. 1-5.
70. Tsubamoto H., Ueda T., Inoue K., Sakata K., Shibahara H., Sonoda T., *Repurposing itraconazole as an anticancer agent (Review)*, Oncology Letters, 14, 2017, s. 1240-1246.
71. Bae S.H., Park J.H., Choi H.G., Kim H., Kim S.H., *Imidazole Antifungal Drugs Inhibit the Cell Proliferation and Invasion of Human Breast Cancer Cells*, Biomolecules & Therapeutics, 26, 2018, s. 494-502.
72. Chen H., Li H., Duan C., Song C., Peng Z., Li H., Duan C., Song Ch., Peng Z., Li H., Shi W., *Reversal of azole resistance in Candida albicans by oridonin*, Journal of Global Antimicrobial Resistance, 24, 2021, s. 296-302.
73. Parker W.B., *Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer*, Chemical Reviews, 109, 2009, s. 2880-2893.
74. Zastre J.A., Sweet R.L., Hanberry B.S., Ye S., *Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism*, Cancer & Metabolism, 1, 2013, s. 1-14.
75. Warburg O., *The Metabolism of Carcinoma Cells*, The Journal of Cancer Research, 9, 1925, s. 148-63.
76. Ferreira L.M.R., *Cancer metabolism: The Warburg effect today*, Experimental and Molecular Pathology, 89, 2010, s. 372-380.
77. Wang J., Zhang X., Ma D., Lee W-NP., Xiao J., Zhao Y., Go V.L., Wang Q., Yen Y., Recker R., Xiao G.G., *Inhibition of transketolase by oxythiamine altered dynamics of protein signals in pancreatic cancer cells*, Experimental Hematology & Oncology, 2, 2013, s. 1-14.
78. Boros L.G., Haines G.K., *Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation (multiple letters)*, Cancer Research, 58, 1998, s. 4242-4248.
79. Grabowska E., Czerniecka M., Czyżewska U., Zambrzycka A., Łotowski Z., Tylicki A., *Differences in the efficiency of 3-deazathiamine and oxythiamine pyrophosphates as inhibitors of pyruvate dehydrogenase complex and growth of HeLa cells in vitro*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 36, 2021, s. 122-129.
80. Tylicki A., Lempicka A., Romaniuk-Demonchaux K., Czerniecki J., Dobrzyń P., Strumiło S., *Effect of oxythiamin on growth rate, survival ability and pyruvate decarboxylase activity in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Basic Microbiology, 43, 2003, s. 522-529.
81. Siemieniuk M., Sosnowska K., Czerniecki J., Czyżewska U., Winnicka K., Tylicki A., *Oxythiamine improves antifungal activity of ketoconazole evaluated in canine Malassezia pachydermatis strains*, Veterinary Dermatology, 29, 2018, s. 476-481.
82. Siemieniuk M., Czyżewska U., Strumiło S., Tylicki A., *Thiamine antivitamin – an opportunity of therapy of fungal infections caused by Malassezia pachydermatis and Candida albicans*, Mycoses, 59, 2016, s. 108-116.
83. Tylicki A., Lotowski Z., Siemieniuk M., Ratkiewicz A., *Thiamine and selected thiamine antivitamin – biological activity and methods of synthesis*, Bioscience Reports, 38, 2018, s. 1-23.

Grzybice oportunistyczne w dobie nowotworów

Streszczenie

Informacje przedstawione w niniejszej pracy zwracają uwagę na szeroko pojęty problem grzybic oportunistycznych ze wskazaniem na nowe doniesienia, które wskazują powiązania mykobioty z rozwojem nowotworów. Opisane zostały mechanizmy wirulencji, jak i oporności drożdżaków na antymikotyki co ma zwrócić uwagę na zagrożenie jakie niosą ze sobą często lekceważone powierzchniowe infekcje grzybicze. Ogólnoustrojowe fungemie znacząco obniżają rokowania pacjentów immunosupresyjnych, dodatkowo mogą promować wzrost nowotworów, np. nowotworu trzustki. Poszukiwanie skojarzonych rozwiązań leczenia grzybic i nowotworów może być słuszną koncepcją. Przykładem takiego podejścia mogą być badania oksytiaminy, będącej antymetabolitem tiaminy, który wykazuje działanie antyproliferacyjne w stosunku do niektórych drożdżaków i komórek nowotworowych. Badania nad tego typu substancjami są na poziomie laboratoryjnym, jednak ich wyniki mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie kliniczne.

Słowa kluczowe: *Candida*, lekooporność, *Malassezia*, terapia skojarzona, oksytiamina

Opportunistic mycoses in the age of cancer

Abstract

The information presented in this paper draws attention to the widely understood problem of opportunistic mycoses with an indication of new reports that indicate the relationship of mycobiotics with the development of cancer. The mechanisms of virulence and resistance of yeasts to antimycotics have been described, which is to draw attention to the threat posed by often neglected surface fungal infections. Systemic fungemias significantly reduce the prognosis of immunosuppressive patients, and may also promote the growth of cancer, e.g. pancreatic cancer. The search for combined treatment solutions for mycoses and cancers may be a valid concept. An example of such an approach may be studies of oxythiamine, which is an antimetabolite of thiamine, which has antiproliferative activity against some yeasts and cancer cells. Research on these types of substances is carried out at the laboratory level, but their results may find clinical application in the future.

Keywords: *Candida*, drug resistance, *Malassezia*, combination therapy, oxythiamine

Czynniki wpływające na rozwój nowotworów przewodu pokarmowego

1. Wstęp

Nowotwory przewodu pokarmowego należą do najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie – w ciągu 1 roku stanowią one ponad 4 miliony nowych przypadków [1]. W zależności od zastosowanego podziału, pod pojęciem „nowotworów przewodu pokarmowego” możemy wyróżnić przynajmniej 10 różnych jednostek chorobowych, które do pewnego stopnia dzielą ze sobą wspólną charakterystykę [2]. Są one związane z wysoką śmiertelnością, co klasyfikuje je wśród wiodących problemów współczesnej ochrony zdrowia [3].

Kancerogeneza jest niezwykle złożonym zjawiskiem, wiążącym się z przebiegiem wielu zmian na poziomie komórkowym. Doniesienia w literaturze sugerują wpływ heterogennych czynników na jej inicjację i dalszy przebieg. Do tych czynników należą m.in. infekcje (zarówno wirusowe, jak i bakteryjne) i stymulowany przez nie proces zapalny, zaburzenia w homeostazie mikrobioty oraz nadmierny rozwój tkanki tłuszczowej i związane z tym zaburzenia metaboliczne i hormonalne [4-6]. Celem niniejszej pracy jest omówienie najnowszych doniesień opisujących molekularne mechanizmy związane z czynnikami wpływającymi na rozwój nowotworów przewodu pokarmowego.

2. Infekcje

Nowotwory przewodu pokarmowego wykazują tendencję do rozwoju na podłożu trwającego procesu zapalnego związanego z infekcją bakteryjną lub wirusową [3]. Szacuje się, że około 13% wszystkich nowotworów na świecie ma związek z infekcjami, a głównymi patogenami związanymi z kancerogenezą są *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), onkogenne typy wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) oraz wirusy zapalenia wątroby typu B i C (HBV, HCV). Odpowiadają one w sumie za ponad 90% wszystkich przypadków nowotworów związanych z infekcjami [4]. Aby zrozumieć mechanizm kancerogenezy związany z infekcjami powinniśmy pochylić się nad biologią molekularną tego zagadnienia. Onkogenne wirusy RNA (m.in. HCV) inicjują rozwój nowotworu przez zjawisko przewlekłego zapalenia i produkcji reaktywnych form tlenu (ROS). DNA-wirusy, takie jak HPV, HBV czy wirus Epsteina-Barr (EBV), bezpośrednio oddziałują na proteiny związane m.in. z punktami kontrolnymi cyklu komórkowego, apoptozą, regulacją długości telomerów, czy mechanizmami naprawy DNA [7]. Patogeny, które mogą uczestniczyć w kancerogenezie nowotworów przewodu pokarmowego zostały zebrane w tabeli 1.

Infekcja bakterią *Helicobacter pylori*, a w jej konsekwencji przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka jest głównym czynnikiem ryzyka rozwoju raka żołądka typu jelitowego [8]. Za wirulencję *H. pylori* odpowiada około 30 genów, wśród

¹ marta.fudalej@wum.edu.pl Zakład Profilaktyki Onkologicznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny; Szkoła Doktorska, Warszawski Uniwersytet Medyczny.

² abadowska@wum.edu.pl Zakład Profilaktyki Onkologicznej, Wydział Nauk o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny.

kórych najważniejszymi są cytotoksyna wakuolizująca, gen A związany z cytotoksyną oraz izomeraza fosforybozyloantraanilinowa. Indukują one zwiększone uwalnianie prozapalnych cytokin, apoptozę w komórkach nabłonkowych żołądka oraz prowadzą do zmian genetycznych i fenotypowych nabłonka [9]. Zakażenie *H. pylori* prowadzi tym samym do zapalenia zanikowego błony śluzowej, a następnie dalszej kaskady zmian obejmującej metaplazję i dysplazję zakończoną rakiem żołądka [10]. Badania wskazują, że populacyjne badania przesiewowe i leczenie *H. pylori* jest możliwe do wykonania i efektywne kosztowo w zapobieganiu raka żołądka, jednak może prowadzić do antybiotykooporności i negatywnego wpływu na fizjologiczną mikroflorę przewodu pokarmowego [4, 11].

Wirus brodawczaka ludzkiego związany jest głównie z nowotworami płaskonabłonkowymi (płaskonabłonkowy rak przełyku, płaskonabłonkowy rak odbytu) oraz w mniejszym stopniu z gruczolakorakami (gruczolakorak przełyku, gruczolakorak żołądka) [3] HPV promuje kancerogenezę przez bezpośrednie i pośrednie mechanizmy związane z onkoproteinami, redukcją odpowiedzi immunologicznej gospodarza i indukcją zapalenia [12]. Onkoproteiny E6/E7 związane z HPV inaktywują różnorodne antyonkogeny (np. RB1, p53) oraz oddziałują na wiele supresorowych oraz onkogennych ścieżek sygnałowych takich jak Notch czy TGFβ [13].

Główną rolę w onkogenezie raka wątrobowokomórkowego (HCC) odgrywa zapalenie wywoływane przez HBV lub HCV. Przewlekłe zapalenie wielokrotnie stymuluje odpowiedź immunologiczną uszkadzającą hepatocyty, które są następnie regenerowane. W efekcie prowadzi to do akumulacji onkogennych mutacji i zmian epigenetycznych promujących kancerogenezę [13]. Co więcej, udowodniono, że HBV może stymulować rozwój zmiany nowotworowej w trzech różnych mechanizmach: 1. integracji wirusowego DNA z genami gospodarza związanymi z kancerogenezą; 2. promocji niestabilności genetycznej; 3. oddziaływania wirusowych białek na funkcję komórki poprzez aktywację onkogennych ścieżek i uwrażliwienie hepatocytów na mutageny [14]. HCV z kolei nie jest określany jako bezpośrednio onkogeny. Podejrzewa się, że zakażenie HCV sprzyja wytworzeniu rakotwórczego środowiska promującego nowotworową przemianę niezakażonych hepatocytów – jest to tzw. efekt świadka (*bystander effect*) [15].

Tabela 1 Zestawienie patogenów, które mogą uczestniczyć w kancerogenezie wybranych nowotworów przewodu pokarmowego

Patogeny, które mogą uczestniczyć w kancerogenezie	Nowotwór przewodu pokarmowego
<i>Helicobacter pylori</i>	Rak żołądka (typ jelitowy)
Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV)	Rak przełyku, rak żołądka, rak odbytu
Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV)	Rak wątrobowokomórkowy
Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV)	Rak wątrobowokomórkowy
Wirus Epsteina-Barr (EBV)	Rak przełyku, rak żołądka, rak odbytu, enteropatyczny chłoniak T-komórkowy
Wirus Johna Cunninghama (JCV)	Rak jelita grubego
Cytomegalowirus (CMV)	Rak jelita grubego
Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV)	Rak odbytu

Źródła: [3, 4, 16]

3. Mikrobiota

Mikrobiom (mikrobiota) jest zbiorem mikroorganizmów składającym się z wirusów, bakterii, grzybów i archeonów odpowiadającym za utrzymanie odpowiedniej homeostazy organizmu [17]. Najnowsze badania donoszą, że mikrobiota przewodu pokarmowego człowieka bierze udział w inicjacji i progresji kancerogenezy oraz moduluje odpowiedź na leczenie i wystąpienie skutków ubocznych terapii. W związku z powyższym stworzono termin „onkobiom” określający pole badań naukowych nad wpływem mikrobioty na mechanizm rozwoju nowotworów [18].

Obecnie badania skupiają się głównie nad powiązaniem mikrobiomu z rozwojem nowotworów trzustki, przełyku, żołądka, jelita grubego i wątroby [5, 18, 19]. Wątroba, poprzez żyłę wrotną, jest narażona na stałą ekspozycję mikroorganizmów przewodu pokarmowego. Wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) poprzez receptory toll-podobne (ang. *toll-like receptors*, TLR) pobudzają hepatocyty do zapalenia, proliferacji i włóknienia. Co więcej, powodują one zwiększoną ekspresję czynnika wzrostu hepatocytów i hamują apoptozę, co może prowadzić do kancerogenezy [20, 21].

W przypadku raka jelita grubego mikroorganizmem, który jest najczęściej łączony z procesem kancerogenezy jest *Streptococcus gallolyticus* (*S. gallolyticus*). Podejrzewa się, że nie jest on bezpośrednim promotorem kancerogenezy, ale czynnikiem pomocniczym, który napędza rozwój nowotworu [22]. Jednym z postulowanych mechanizmów jest bakterio-zależna stymulacja zapalenia udowodniona przez zwiększoną ekspresję prozapalnych molekuł takich, jak interleukina 1 (IL-1), interleukina 8 (IL-8) i cyklo-oxygenaza (COX)-2 [23]. Co więcej, udowodniono, że *S. gallolyticus* czerpie korzyści z mikrośrodowiska nowotworu – zwiększone stężenie produktów glikolizy takich jak fruktozo-6-fosforan czy kwas 3-fosfoglicerynowy, stymuluje mnożenie się tej bakterii [24]. Innymi bakteriami powiązаныmi z kancerogenezą raka jelita grubego są m.in. *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis* [5]. Stymulują one rozwój nowotworu poprzez produkcję genotoksyn uszkadzających DNA lub wpływających na cykl komórkowy [25], produkcję ROS powodujących niestabilność chromosomalną [26] oraz zwiększenie ekspresji genów onkogenezy i zapalenia przez aktywację szlaku E-kadheryna/ β -katenina [27].

W przypadku raka trzustki obecność bakterii stwierdzono w 76% próbek pochodzących z tego nowotworu [28]. Różne badania sugerują, że bakteriami szczególnie związanymi z patogenezą raka trzustki są te pochodzące z jamy ustnej. Kolonizują one przewód pokarmowy oraz mogą przedostawać się do krwi podczas żucia, higieny jamy ustnej, czy też procedur dentystrycznych [29]. Mikroorganizmami najczęściej łączonymi z patogenezą raka trzustki są *Fusobacterium spp.* Udowodniono, że biorą one udział w kancerogenezie poprzez sekrecję czynnika wirulencji FadA, który łączy się z receptorem znajdującym się na komórkach śródbłonna (CDH5) lub E-kadheryną i pobudza ścieżkę sygnałową β -kateniny, co w następstwie prowadzi do zwiększonej ekspresji onkogenów oraz genów związanych ze stanem zapalnym [30]. Zbadano również, że obecność bakterii *Fusobacterium* może być czynnikiem prognostycznym związanym z krótszym przeżyciem całkowitym pacjentów (ang. *overall survival*, OS) [31]. Z drugiej strony, protekcyjny efekt przed rozwojem raka trzustki może wykazywać *Neisseria mucosa*. W jamie ustnej spełnia ona ochronną rolę poprzez metabolizowanie związków

o niskim pH w słabe, lotne kwasy. Jej podobnie protekcyjna rola postulowana jest w raku trzustki, w którym kwaśne, hipoksemiczne mikrośrodowisko sprzyałoby rozwojowi przerzutów odległych [29, 32].

4. Otyłość

W ciągu ostatnich lat zauważono wzrost częstości występowania otyłości, który jest szczególnie nasilony w krajach wysokorozwiniętych. W przeciągu ostatnich 3 dekad rozpowszechnienie otyłości oszacowano na 27,5% wśród dorosłych i 47,1% wśród dzieci [33]. Otyłość została sklasyfikowana jako czynnik ryzyka wielu chorób nowotworowych [34], zajmując drugie miejsce po paleniu papierosów wśród najczęstszych przyczyn rozwoju nowotworu [35].

Aby zbadać zależność pomiędzy otyłością a rozwojem nowotworów zazwyczaj używa się takich parametrów jak wskaźnik masy ciała (body mass index BMI) oraz stosunek obwodu talii do obwodu bioder (Waist–Hip Ratio WHR). Otyłość powiązano z wyższym ryzykiem rozwoju takich nowotworów przewodu pokarmowego jak rak jelita grubego, rak trzustki, rak wątrobowokomórkowy, rak pęcherzyka żółciowego, rak żołądka i gruczolakorak przełyku [36]. Z kolei, w przypadku raka płaskonabłonkowego przełyku wyższe BMI i WHR powiązano z mniejszym ryzykiem jego rozwoju [37].

Obecnie postulowane hipotezy wyjaśniające zależność pomiędzy otyłością i kancerogenezą obejmują m.in. modyfikację szlaku sygnałowego insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) oraz przewlekłe zapalenie związane z tkanką tłuszczową [6, 36]. Otyłość związana jest ze stanem przewlekłego zapalenia z powodu infiltracji tkanki tłuszczowej przez komórki układu immunologicznego (m.in. makrofagi), prowadzącej w efekcie do zwiększonej sekrecji cytokin prozapalnych [38]. Zjawiska hiperinsulinemii i insulinooporności są natomiast bardzo często stwierdzane u osób otyłych [39]. Aktywacja receptorów dla insuliny i IGF-1 powoduje pobudzenie kaskad sygnałowych związanych ze stymulacją podziałów komórkowych, angiogenezy i hamowaniem apoptozy [40]. Nowotworem, w którym udowodniono wyraźny związek pomiędzy hiperinsulinemią, zapaleniem i kancerogenezą jest rak jelita grubego. W przypadku innych nowotworów obecnie dostępne badania przedstawiają heterogenne wyniki [41].

5. Podsumowanie

Znajomość czynników ryzyka poszczególnych nowotworów przewodu pokarmowego umożliwi wdrożenie odpowiedniej profilaktyki oraz wczesnego leczenia zapobiegającego rozwojowi nowotworu. Ponadto, zbadanie mechanizmów molekularnych łączących infekcje i zjawiska zachodzące w tkance tłuszczowej z procesem kancerogenezy ułatwi zaprojektowanie spersonalizowanego leczenia hamującego przebieg przemian nowotworowych prawidłowych komórek. Pomimo licznych badań analizujących te zależności, często brakuje w nich konsensusu, co implikuje potrzebę dalszego zgłębiania tematu. Nowotworem o największej liczbie badań i wyciągniętych z nich wniosków jest rak jelita grubego, co ma najprawdopodobniej związek z dużą liczebnością grup badanych. Inne, rzadsze nowotwory wymagają obecnie zdecydowanie większej liczby analiz celem opracowania jednolitych wniosków.

Uwagi ogólne

Pracę wykonano w ramach projektu realizowanego w latach 2020-2021 finansowanego ze środków subwencji przeznaczonej na naukę uzyskanych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny.

Literatura

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*, Int J Cancer, 136(5), 2015, s. E359-86.
2. Meyerhardt J.A., Tepper J.E., Venook A.P., *Special Series: Advances in GI Cancer*, J Clin Oncol, 33(16), 2015, s. 1717-20.
3. Costa N.R., Gil da Costa R.M., Medeiros R., *A viral map of gastrointestinal cancers*. Life Sci, 199, 2018, s. 188-200.
4. de Martel C., Georges D., Bray F., Ferlay J., Clifford G.M., *Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis*, Lancet Glob Health, 8(2) 2020, s. e180-e190.
5. Panebianco C., Potenza A., Andriulli A., Paziienza V., *Exploring the microbiota to better understand gastrointestinal cancers physiology*, Clin Chem Lab Med, 56(9) 2018, s. 1400-1412.
6. Karczewski J., Begier-Krasińska B., Staszewski R., Popławska E., Gulczynska-Elhadi K., Dobrowolska A., *Obesity and the Risk of Gastrointestinal Cancers*, Dig Dis Sci, 64(10), 2019, s. 2740-2749.
7. Pandey N.V., *DNA viruses and cancer: insights from evolutionary biology*, Virusdisease, 31(1), 2020, s. 1-9.
8. Shichijo S., Hirata Y., *Characteristics and predictors of gastric cancer after Helicobacter pylori eradication*, World J Gastroenterol, 24(20), 2018, s. 2163-2172.
9. Sukri A., Hanafiah A., Mohamad Zin N., Kosai N.R., *Epidemiology and role of Helicobacter pylori virulence factors in gastric cancer carcinogenesis*, Apmis, 128(2), 2020, s. 150-161.
10. Mentis A.A., Boziki M., Grigoriadis N., Papavassiliou A.G., *Helicobacter pylori infection and gastric cancer biology: tempering a double-edged sword*, Cell Mol Life Sci, 76(13), 2019, s. 2477-2486.
11. Song Z.Q., Zhou L.Y., *Helicobacter Pylori and Gastric Cancer: Clinical Aspects*, Chin Med J (Engl), 128(22), 2015, s. 3101-5.
12. Estêvão D., Costa N.R., Gil da Costa R.M., Medeiros R., *Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy*, Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 1862(2), 2019, s. 153-162.
13. Gaglia M.M., Munger K., *More than just oncogenes: mechanisms of tumorigenesis by human viruses*, Curr Opin Virol, 32, 2018, s. 48-59.
14. Levrero M., Zucman-Rossi J., *Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma*, J Hepatol, 64(1 Suppl), 2016, s. S84-s101.
15. Dash S., Aydin Y., Widmer K.E., Nayak L., *Hepatocellular Carcinoma Mechanisms Associated with Chronic HCV Infection and the Impact of Direct-Acting Antiviral Treatment*, J Hepatocell Carcinoma, 7, 2020, s. 45-76.
16. Mirzaei H., Goudarzi H., Eslami G., Faghiloo E., *Role of viruses in gastrointestinal cancer*, J Cell Physiol, 233(5), 2018, s. 4000-4014.
17. Belkaid Y., Harrison O.J., *Homeostatic Immunity and the Microbiota*, Immunity, 46(4), 2017, s. 562-576.

18. Yu Q., Jobin C., Thomas R.M., *Implications of the microbiome in the development and treatment of pancreatic cancer: Thinking outside of the box by looking inside the gut*, *Neoplasia*, 23(2), 2021, s. 246-256.
19. Weng M.T., Chiu Y.T., Wei P.Y., Chiang C.W., Fang H.L., Wei S.C., *Microbiota and gastrointestinal cancer*, *J Formos Med Assoc*, 118 Suppl 1, 2019, s. S32-s41.
20. Wiest R., Albillos A., Trauner M., Bajaj J.S., Jalan R., *Targeting the gut-liver axis in liver disease*, *J Hepatol*, 67(5), 2017, s. 1084-1103.
21. Dapito D.H., Mencin A., Gwak G.Y., Pradere J.P., Jang M.K., Mederacke I., Caviglia J.M., Khiabanian H., Adeyemi A., Bataller R., Lefkowitz J.H., Bower M., Friedman R., Sartor R.B., Rabadan R., Schwabe R.F., *Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4*, *Cancer Cell*, 21(4), 2012, s. 504-16.
22. Pasquereau-Kotula E., Martins M., Aymeric L., Dramsi S., *Significance of Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus Association With Colorectal Cancer*, *Front Microbiol*, 9, 2018, s. 614.
23. Abdulamir A.S., Hafidh R.R., Bakar F.A., *Molecular detection, quantification, and isolation of Streptococcus gallolyticus bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8*, *Mol Cancer*, 9, 2010, s. 249.
24. Boleij A., Dutilh B.E., Kortman G.A., Roelofs R., Laarakkers C.M., Engelke U.F., Tjalsma H., *Bacterial responses to a simulated colon tumor microenvironment*, *Mol Cell Proteomics*, 11(10), 2012, s. 851-62.
25. Buc E., Dubois D., Sauvanet P., Raisch J., Delmas J., Darfeuille-Michaud A., Pezet D., Bonnet R., *High prevalence of mucosa-associated E. coli producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer*, *PLoS One*, 8(2), 2013, s. e56964.
26. Balamurugan R., Rajendiran E., George S., Samuel G.V., Ramakrishna B.S., *Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, Desulfovibrio and Enterococcus faecalis in the feces of patients with colorectal cancer*, *J Gastroenterol Hepatol*, 23(8 Pt 1), 2008, s. 1298-303.
27. Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., Hao Y., Cai G., Han Y.W., *Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin*, *Cell Host Microbe*, 14(2), 2013, s. 195-206.
28. Geller L.T., Barzily-Rokni M., Danino T., Jonas O.H., Shental N., Nejman D., Gavert N., Zwang Y., Cooper Z.A., Shee K., Thaiss C.A., Reuben A., Livny J., Avraham R., Frederick D.T., Ligorio M., Chatman K., Johnston S.E., Mosher C.M., Brandis A., Fuks G., Gurbatri C., Gopalakrishnan V., Kim M., Hurd M.W., Katz M., Fleming J., Maitra A., Smith D.A., Skalak M., Bu J., Michaud M., Trauger S.A., Barshack I., Golan T., Sandbank J., Flaherty K.T., Mandinova A., Garrett W.S., Thayer S.P., Ferrone C.R., Huttenhower C., Bhatia S.N., Gevers D., Wargo J.A., Golub T.R., Straussman R., *Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine*, *Science*, 357(6356), 2017, s. 1156-1160.
29. Sun H., Zhao X., Zhou Y., Wang J., Ma R., Ren X., Wang H., Zou L., *Characterization of Oral Microbiome and Exploration of Potential Biomarkers in Patients with Pancreatic Cancer*, *Biomed Res Int*, 2020, 2020, s. 4712498.
30. Gholizadeh P., Eslami H., Kafil H.S., *Carcinogenesis mechanisms of Fusobacterium nucleatum*, *Biomed Pharmacother*, 89, 2017, s. 918-925.
31. Mitsuhashi K., Noshō K., Sukawa Y., Matsunaga Y., Ito M., Kurihara H., Kanno S., Igarashi H., Naito T., Adachi Y., Tachibana M., Tanuma T., Maguchi H., Shinohara T., Hasegawa T., Imamura M., Kimura Y., Hirata K., Maruyama R., Suzuki H., Imai K., Yamamoto H., Shinomura Y., *Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis*, *Oncotarget*, 6(9), 2015, s. 7209-20.

32. Liu G., Tang C.M., Exley R.M., *Non-pathogenic Neisseria: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus*, Microbiology (Reading), 161(7), 2015, s. 1297-1312.
33. Apovian C.M., *Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden*, Am J Manag Care, 22(7 Suppl), 2016, s. s176-85.
34. De Pergola G., Silvestris F., *Obesity as a major risk factor for cancer*, J Obes, 2013, 2013, s. 291546.
35. Lauby-Secretan B., Scoccianti C., Loomis D., Grosse Y., Bianchini F., Straif K., *Body Fatness and Cancer-Viewpoint of the IARC Working Group*, N Engl J Med, 375(8), 2016, s. 794-8.
36. Murphy N., Jenab M., Gunter M.J., *Adiposity and gastrointestinal cancers: epidemiology, mechanisms and future directions*, Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 15(11), 2018, s. 659-670.
37. *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, nutrition, physical activity and oesophageal cancer*, 02.02.2021.
38. Crusz S.M., Balkwill F.R., *Inflammation and cancer: advances and new agents*, Nat Rev Clin Oncol, 12(10), 2015, s. 584-96.
39. Miao Z., Alvarez M., Ko A., Bhagat Y., Rahmani E., Jew B., Heinonen S., Muñoz-Hernandez L.L., Herrera-Hernandez M., Aguilar-Salinas C., Tusie-Luna T., Mohlke K.L., Laakso M., Pietiläinen K.H., Halperin E., Pajukanta P., *The causal effect of obesity on prediabetes and insulin resistance reveals the important role of adipose tissue in insulin resistance*, PLoS Genet, 16(9), 2020, s. e1009018.
40. Pollak M., *The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update*, Nat Rev Cancer, 12(3), 2012, s. 159-69.
41. Gunter M.J., Riboli E., *Obesity and gastrointestinal cancers - where do we go from here?* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 15(11), 2018 s. 651-652.

Czynniki wpływające na rozwój nowotworów przewodu pokarmowego

Streszczenie

Nowotwory przewodu pokarmowego należą obecnie do najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie. Kancerogeneza jest niezwykle złożonym procesem, na który wpływ mają heterogenne czynniki endo- i egzogenne. Należą do nich m.in. infekcje i stymulowany przez nie proces zapalny, zaburzenia w homeostazie mikrobioty oraz nadmierny rozwój tkanki tłuszczowej i następowe zaburzenia metaboliczne i hormonalne. Celem niniejszego artykułu jest omówienie molekularnych mechanizmów związanych z tymi czynnikami. Znajomość mechanizmów łączących czynniki ryzyka z procesem kancerogenezy umożliwi zaprojektowanie efektywnej profilaktyki i leczenia spersonalizowanego hamującego przebieg nowotworowych przemian prawidłowych komórek. Pomimo licznych badań analizujących te zależności, często brakuje w nich konsensusu, co implikuje potrzebę dalszego zgłębiania tematu.

Słowa kluczowe: kancerogeneza, onkologia, nowotwory przewodu pokarmowego, infekcje, rak jelita grubego

Factors influencing development of gastrointestinal carcinomas

Abstract

Gastrointestinal cancers are qualified as the most commonly diagnosed cancers worldwide. Carcinogenesis is a remarkably complex process, influenced by various endo- and exogenic factors, encompassing infections, alterations in microbiota homeostasis and obesity leading to the metabolic and hormonal disorders. The main aim of this article is to discuss the molecular mechanisms associated with the aforementioned factors. Extensive knowledge of mechanisms connecting risk factors with carcinogenesis will further allow to design effective prevention and personalized treatment. Despite various, numerous studies analyzing this association, no common consensus has been established. It implicates in further need to deepen this knowledge.

Keywords: carcinogenesis, oncology, gastrointestinal neoplasms, infections, colorectal cancer

Wpływ leku przeciwnowotworowego epirubicyny na sposób organizacji lipidów w membranach biomimetycznych

1. Wstęp

Antybiotyki przeciwnowotworowe, w tym antracykliny, są dziś najskuteczniejszą i najczęściej wybieraną metodą terapii w onkologii. Leki te podawane są dożylnie i razem z krwią przenoszone są po całym organizmie, dzięki czemu mogą dotrzeć także do komórek nowotworowych. Jednak wprowadzony do organizmu terapeutyk, zanim dotrze do miejsca działania napotyka na swojej drodze wiele barier w postaci błon biologicznych, które chronią komórki oraz tkanki i narządy. Mechanizm przenikania leku do wnętrza komórki zależy od wielu czynników, w tym nie tylko od właściwości fizykochemicznych terapeutyku, ale w dużym stopniu na proces ten ma wpływ struktura i własności błony biologicznej [1, 2].

Omawiany w poniższej pracy lek epirubicyna [3] należy do najczęściej aplikowanych farmaceutyków w leczeniu nowotworów systemowych jednak wydaje się, że penetracja terapeutyku może prowadzić do zaburzeń struktury dwuwarstwy lipidowej skutkując trwałym uszkodzeniem błon komórek serca [4]. Bardzo istotne wydaje się zatem poznanie mechanizmu wnikania antybiotyku do wnętrza komórki, gdyż do tej pory, mimo licznych badań, nie udało się ustalić patomechanizmu szczególnej toksyczności antybiotyków antracyklinowych w stosunku do mięśnia sercowego [5].

Kompleksowe badania prowadzone dla szeregu membran odzwierciedlających naturalne błony różnych typów komórek umożliwią całościowy opis problematyki i szczegółowe poznanie procesu wnikania leków do komórki.

Wydaje się, że badania rozwijające i pogłębiające wiedzę dotyczącą stosowanych obecnie leków antracyklinowych czy ich nośników oraz wpływ oddziaływania na membrany biologiczne są priorytetowe, ze względu na zanotowany ciągły wzrost zachorowalności na nowotwory, które stanowią obecnie jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie [6].

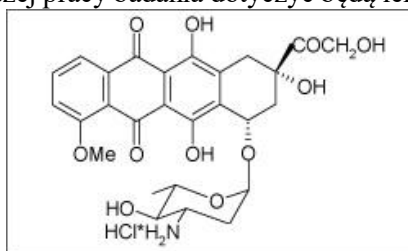
Antybiotyki antracyklinowe stanowią jedną z najefektywniejszych i najczęściej stosowanych grup leków w terapii przeciwnowotworowej. Są to związki, częściowo naturalne wyizolowane ze szczepów bakterii *Streptomyces* oraz ich pochodne otrzymane na drodze syntez chemicznych. W budowie cząsteczki każdej antracykliny wyróżnia się podstawową część zwaną aglikonem (zbudowaną z czterech pierścieni), do której przyłączona jest reszta cukrowa. Obecnie najczęściej stosowane są: daunorubicyna, doksorubicyna, darubicyna i epirubicyna. Doksorubicyna oraz epirubicyna charakteryzują się podobnym działaniem terapeutycznym i efektywnością jednak w przypadku drugiego z antybiotyków udowodniony jest zredukowany wpływ na komórki mięśnia sercowego [7].

¹ dniececka@chem.uw.edu.pl, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, www.chem.uw.edu.pl.

² Instytut Chemii Fizycznej, Polska Akademia Nauk, www.chf.edu.pl.

Po latach badań okazało się, iż antybiotyki antracyklinowe wywołują w organizmie człowieka wiele działań niepożądanych a najgroźniejszym z nich jest toksyczny wpływ na mięsień sercowy. Liczne przeprowadzone badania dowodzą, że przewlekła kardiotoxycznosc występuje nawet u 26% przypadków leczonych doksorubicyną. W terapii epirubicyną nie zaobserwowano tak silnego działania kardiotoxycznego jak w przypadku doksorubicyny. Powody występowania wysokiej kardiotoxycznosci wśród antracyklin nie są do dziś dokładnie znane. Uważa się, że jest to spowodowane nakładaniem się wielu mechanizmów. Duże znaczenie przypisuje się niekorzystnemu wpływowi antybiotyków antracyklinowych na procesy bioenergetyczne w komórkach mięśnia sercowego. Badania Newmana i wsp. [8] udowodniły, że doksorubicyna utrudnia transport wysokoenergetycznych związków fosforanowych z mitochondriów do włókien mięśnia sercowego. Nie dowiedziono jednak co może być przyczyną tak silnego powinowactwa antracyklin do komórek właśnie mięśnia sercowego.

Przedstawione w niniejszej pracy badania dotyczyć będą leku epirubicyna.



Rysunek 1. Budowa cząsteczki epirubicyny [www.cancerquest.org]

2. Materiał i metody

Do utworzenia lipidowych monowarstw biometrycznych wykorzystano technikę Langmuira [9]. Aparatura pomiarowa składa się z termostatowanej wanny Langmuira ze studnią oraz dwóch ruchomych barierki. Przed rozpoczęciem pomiarów, jak i po ich zakończeniu, wszystkie teflonowe elementy były dokładnie czyszczone kolejno chloroformem, 99% etanolem oraz wodą destylowaną, aby usunąć ewentualne pozostałości lipidu czy zanieczyszczenia. Do zarejestrowania izoterm Langmuira wykorzystano oprogramowanie KSV NIMA.

W celu utworzenia monowarstw na powierzchni subfazy nanoszono chloroformowe roztwory lipidów oraz ich mieszanin o końcowym stężeniu 2mg/ml. Do badań zostały wykorzystane następujące lipidy lub ich mieszaniny: DOPC, kardiolipina (CL) oraz mieszanina lipidów DOPC: kardiolipina w stosunku molowym 0,9:0,1. Pomiary przeprowadzono w dwóch temperaturach: 24°C oraz 36°C. W przedziale temperatur 24-36°C żaden z lipidów nie wykazywał przejścia fazowego [10].

Po ogrzaniu fazy nośnej, czyli po upływie około 10 minut dla pomiaru w 24°C lub 20 minut dla pomiaru w 36°C, na subfazę nanoszono przy pomocy mikrostrzykawki chloroformowe roztwory w/w lipidów oraz ich mieszanin w ilościach 20-40 µl w zależności od rodzaju lipidu. Po upływie około 10 minut od nakroplenia lipidu na subfazę rozpuszczalnik całkowicie odparowywał, co umożliwiało rozpoczęcie pomiaru i rejestrację ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę (Mma). Szybkość przesuwania barierki wynosiła 10 mm/min, co umożliwiło otrzymanie membran o wysokim stopniu uporządkowania. Monowarstwy

sprężane były do wartości ciśnienia 30 mN/m, takie ciśnienie gwarantuje ułożenie lipidów podobne jak w naturalnych błonach biologicznych. Wraz z przemieszczaniem się barierok wzrastało ciśnienie powierzchniowe oraz zmniejszały się odległości pomiędzy cząsteczkami lipidów. Wynikiem tego było utworzenie monowarstwy lipidowej na granicy faz woda/powietrze. Aby sprawdzić dokładność otrzymanych wyników każdy z pomiarów wykonano dwa razy a następnie gdy wartości te nie różniły się więcej niż 2-3%, obliczono średnią wartość powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę [\AA^2].

3. Analiza wyników

W poniższych badaniach technika Langmuira oraz analiza izoterm zostały wykorzystane do badania oddziaływania między lekiem a membraną biomimetyczną [11]. Zmieniając parametry subfazy oraz procesu tworzenia warstwy można śledzić wpływ różnych parametrów na sposób organizacji cząsteczek lipidu w monowarstwach Langmuira [12, 13].

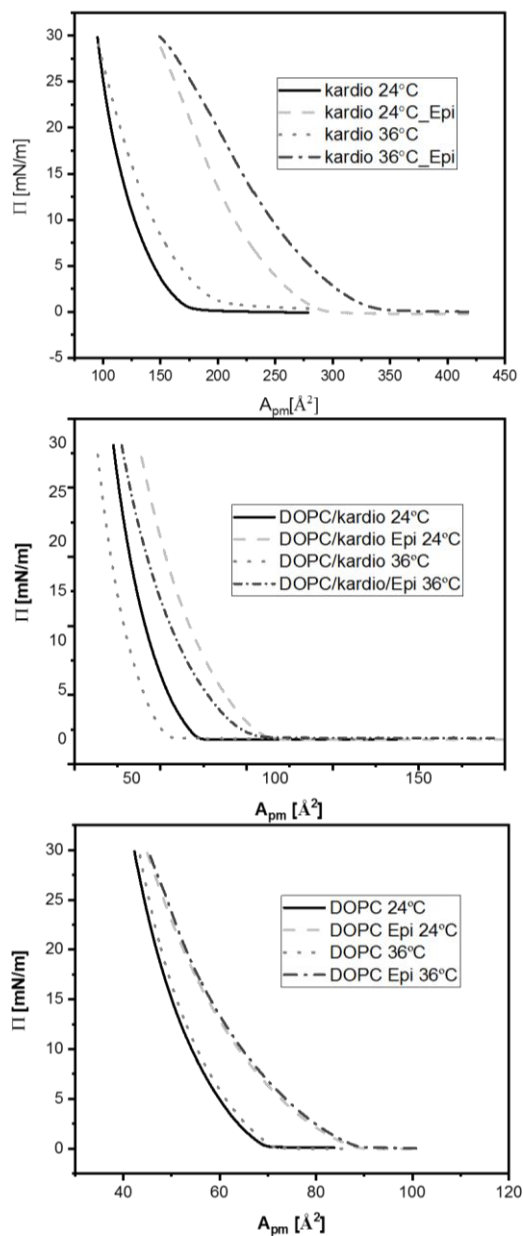
3.1. Ocena wpływu temperatury na strukturę monowarstw biomimetycznych

Pomiary wykonano dla dwóch różnych temperatur subfazy 24°C oraz 36°C. Wyższa temperatura była odpowiednikiem warunków, które panują w naturalnych układach biologicznych. Utrzymanie stałej temperatury pomiaru umożliwił podłączony do wanny termostat. Na podstawie analizy izoterm zarejestrowanych dla poszczególnych monowarstw można wnioskować, że wraz ze wzrostem temperatury fazy nośnej z 24 na 36 stopni Celsjusza jedynie nieznacznie maleje powierzchnia przypadająca na jedną cząsteczkę. W przypadku warstwy DOPC oraz kardiolipiny zmiany pola powierzchni pod wpływem temperatury nie są w ogóle zauważalne. Zarówno DOPC, jak i kardiolipina mają takie samo pole powierzchni w temperaturze 24°C oraz 36°C. Porównując wyniki otrzymane dla dwóch temperatur widać nieznaczny wzrost pola powierzchni przypadającego na cząsteczkę dla niższej temperatury.

W celu zbadania wpływu leku na organizację lipidów w monowarstwie biomimetycznej wykorzystano technikę Langmuira. Wykonanie doświadczenia było analogiczne do tworzenia monowarstw na wannie Langmuira z tą różnicą, że jako subfazę zastosowano roztwory farmaceutyku. Pomiary wykonano dla dwóch różnych stężeń epirubicyny oraz jako fazę nośną zastosowano roztwory buforowe o różnych wartościach pH. Aby dokonać charakterystyki monowarstw oraz ocenić wpływ farmaceutyku na lipidy budujące warstwy porównano izotermę Langmuira zarejestrowane w różnych warunkach.

Po wstępnym przeprowadzeniu pomiarów w różnych temperaturach dla monowarstw na subfazie, którą stanowiła woda, rozpoczęto badania z dodatkiem leku w fazie nośnej. Badania zależności temperaturowej wykonano najpierw dla roztworu leku o stężeniu 10^{-5} mol/dm³.

Zarówno dla izoterm zarejestrowanych w temperaturze 24°C, jak i 36°C możemy zaobserwować wzrost powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę dla wszystkich lipidów wraz z dodatkiem leku do subfazy. Największy wzrost zarówno w 24°C, jak i 36°C obserwujemy dla izoterm kardiolipiny. Lipid ten znajduje się w bardzo dużych ilościach w strukturze błon biologicznych komórek mięśnia sercowego. Ze względu na to, że leki antracyklinowe wykazują duże powinowactwo do komórek mięśniowych serca, co przejawia się wysoką kardiotoxycnością, najwięcej leku zostaje wbudowane do membran zawierających kardiolipinę.



Rysunek 2. Izotermie Langmuira zarejestrowane w różnych temperaturach w obecności i nieobecności leku w subfazie (opis krzywych na wykresach) [opracowanie własne]

Temperatura nie wpływa znacząco na zwiększenie ilości leku w strukturze membrany. Większy wzrost powierzchni przypadającej na cząsteczkę możemy również zauważyć dla warstwy DOPC z niewielkim udziałem kardiolipiny. Porównując wzrost powierzchni w obu temperaturach dla wszystkich lipidów można stwierdzić, że jest on proporcjonalny w większości przypadków i nie wykazuje się zależności pomiędzy zmianą temperatury a organizacją lipidów w monowarstwach w obecności epirubicyny.

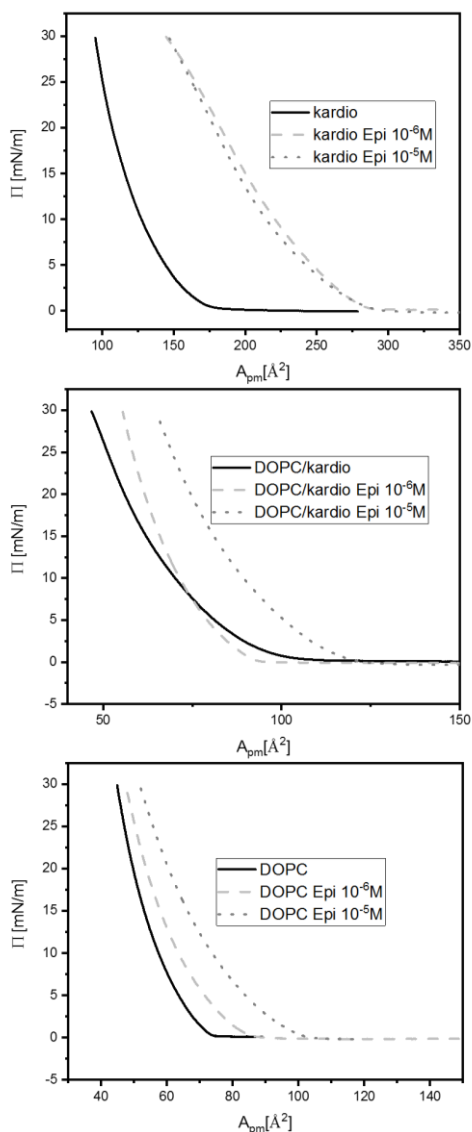
W związku z brakiem wpływu wyższej temperatury na ilość leku zaadsorbowanego w utworzonych monowarstwach dalsze pomiary prowadzono wyłącznie w 24°C, co znacznie ułatwiło prowadzenie badań. Pomiary w niższej temperaturze przebiegały szybciej, ponieważ czas oczekiwania na ogrzanie fazy nośnej uległ skróceniu.

3.2. Ocena wpływu stężenia leku na strukturę monowarstw biomimetycznych

Kolejna część badań związana była z określeniem wpływu stężenia antybiotyku na organizację lipidów w monowarstwach. W tym celu użyto dwóch stężeń leku: 10^{-5} mol/dm³ oraz 10^{-6} mol/dm³ [14]. Wymienione stężenia epirubicyny zostały celowo wybrane do badań, ponieważ są one bliskie wartości stężeń stosowanych w leczeniu onkologicznym. Jako subfazę zastosowano roztwory epirubicyny utworzone przez rozpuszczenie leku w wodzie destylowanej. Pomiary prowadzono wyłącznie w temperaturze 24°C dla wszystkich roztworów lipidów oraz ich mieszanin. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci izoterm Langmuira na rysunku 3. Podobnie jak w poprzednich przypadkach podstawą oceny była analiza uzyskanych krzywych w tym porównanie ich kształtu oraz pola powierzchni przypadającego na jedną cząsteczkę.

Wykazano wzrost powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę wraz z dodatkiem epirubicyny do fazy nośnej dla obu badanych temperatur. W opisanej zależności stężeniowej również widzimy wzrost powierzchni dla obu użytych stężeń, jednak nie jest on taki sam. Różnice pomiędzy uzyskanymi wartościami dla dwóch stężeń leku są znaczące i nie są proporcjonalne [15]. W przypadku niektórych lipidów, bądź mieszanin zauważalny jest bardzo duży wpływ leku na strukturę warstwy zarówno dla stężenia 10^{-5} mol/dm³, jak i 10^{-6} mol/dm³. Lipid wykazujący największe zmiany w tych warunkach to kardiolipina [16]. Zmiana stężenia leku w fazie nośnej na 10^{-5} mol/dm³ wywołuje bardzo duże zmiany w wartości A_{pm} , to jest o około 50 Å² czyli rzędu 50% wartości początkowej. Zastosowanie mniejszego stężenia antybiotyku (10^{-6} mol/dm³) nie ma wpływu na sposób adsorpcji terapeutyku na powierzchni membrany i tym samym nie powoduje zmian na izotermie.

W przypadku monowarstwy zbudowanej z kardiolipiny nawet niewielkie ilości leku w subfazie znacząco wpływają na kształt krzywej Π-A. Dla membrany zbudowanej z lipidu DOPC nie obserwuje się tak silnych zmian w obecności leku o stężeniu 10^{-6} M. W tym przypadku zmiany na izotermie mogą być zanedbywane. Dodatek 10-krotnie większego stężenia antybiotyku powoduje zmiany pola powierzchni przypadającego na powierzchnię rzędu 13%. Trzeci rodzaj z analizowanych membran zbudowany był z lipidu DOPC z domieszką kardiolipiny w ilości 0,1 mola. Okazuje się, że nawet tak niewielki dodatek kardiolipiny ma wpływ na ilość leku adsorbującego się na membranie. Przy stężeniu antybiotyku w subfazie 10^{-5} M widoczny jest aż 25% wzrost pola powierzchni na cząsteczkę monowarstwy.



Rysunek 3. Izotermi Langmuira zarejestrowane dla 3 rodzajów lipidów (kardiolipina, mieszanina DOPC_kardiolipina oraz DOPC) w obecności różnych stężeń epirubicyny (10^{-5} M oraz 10^{-6} M) [opracowanie własne]

3.3. Ocena wpływu pH fazy nośnej na strukturę monowarstw biomimetycznych

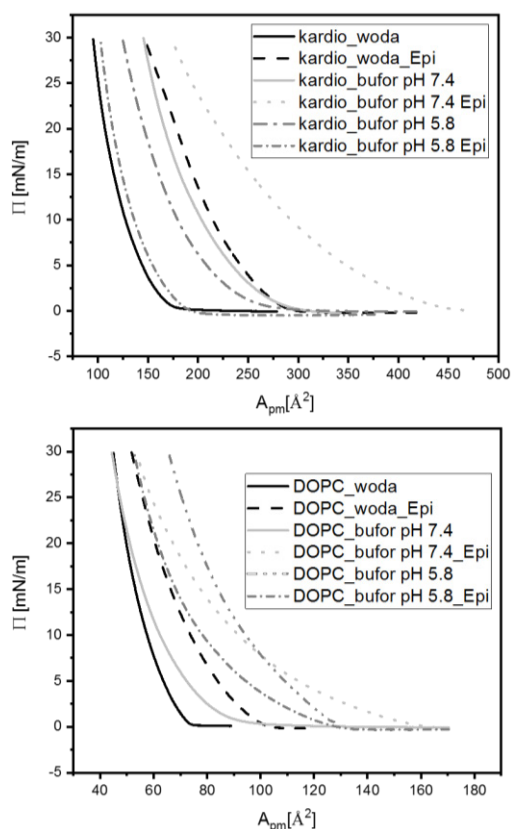
Do oceny wpływu pH na organizację lipidów w monowarstwach w obecności epirubicyny wykorzystano roztwory buforowe. Korzystając z uzyskanych wcześniej informacji badania prowadzono wyłącznie w temperaturze 24°C i dla wyższego stężenia leku, czyli 10^{-5} mol/dm³. Jako bufor wykorzystano bufor fosforanowy, który przygotowano z wodnych roztworów soli Na_2HPO_4 oraz NaH_2PO_4 w różnych stosunkach objętościowych. W badaniach wykorzystano roztwory o pH równym 5,8 oraz 7,4.

W wyborze pH buforów kierowano się informacją o odczynie jaki panuje w komórkach nowotworowych (pH ok. 5,8) oraz komórkach prawidłowych (pH ok. 7,4)

Do tak przygotowanej subfazy, którą stanowił roztwór buforu dodawano epirubicyny. Temperatura fazy nośnej we wszystkich pomiarach wynosiła 24°C.

Na początku wykonano pomiary tła, czyli dla monowarstw lipidowych utworzonych na fazie nośnej, którą stanowił 100 mM roztwór buforu. Następnie wykonano pomiary w obecności leku, gdzie jako subfazę zastosowano 100 mM roztwory buforowe z dodatkiem epirubicyny. W trakcie pomiarów uzyskano izotermę Langmuira, które wykorzystano następnie do analizy wyników. Porównano wartości powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę oraz kształt izoterm z uzyskanymi we wcześniejszych badaniach wynikami dla roztworów wodnych.

Poniżej zaprezentowano izotermę otrzymane dla lipidów w dwóch buforach o odczynie równym 5,8 oraz 7,4 w obecności oraz nieobecności epirubicyny o pH równym 10^{-5} M. W celu porównania na wykresach umieszczono również wyniki otrzymane dla monowarstw, gdzie fazę nośną stanowiła woda destylowana oraz wodny roztwór epirubicyny o stężeniu 10^{-5} mol/dm³. Temperatura fazy nośnej we wszystkich zamieszczonych pomiarach wynosiła 24°C.



Rysunek 4. Izotermę Langmuira zarejestrowane w różnych warunkach pH subfazy w obecności i nieobecności epirubicyny (opis krzywych na wykresach). Górny panel: monowarstwa-kardiolipina; dolny panel: monowarstwa-DOPC [opracowanie własne]

Porównując wartości powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę dla monowarstw na subfazie wodnej oraz tych, gdzie wykorzystano roztwory buforowe widzimy pewne różnice. Pierwszą z nich jest duży wzrost powierzchni dla większości układów w roztworze buforowym. W przypadku lipidu DOPC zmiany te widoczne są jedynie dla subfazy o odczynie kwasowym. Przesunięcie izotermi jest tu rzędu 45%. Kolejne dwie membrany (mieszanka DOPC-kardio oraz czysta kardiolipina) wykazują zmiany w polu powierzchni na subfazie zarówno w pH kwasowym, jak i obojętnym.

W przypadku kardiolipiny są to zdecydowanie większe przesunięcia na izotermach wynoszące około 30% i 50% odpowiednio dla buforu o pH 7,4 i 5,8. Wyjątek stanowi tutaj lipid DOPC oraz tiolipid, w którym ta zmiana jest na tyle mała, że można przyjąć brak wzrostu powierzchni.

Kolejną, bardzo istotną różnicą jest zmiana powierzchni Apm po dodatku epirubicyny do subfazy. Widać tutaj charakterystyczną zależność w roztworze o pH 5,8, która nie miała miejsca we wcześniejszych omawianych przypadkach. Mianowicie w przypadku roztworów buforowych epirubicyny (odczyn kwasowy) następuje spadek powierzchni w stosunku „izotermi tła” czyli rejestrowanej dla lipidu bez obecności epirubicyny. Powodem tego zjawiska może być zmiana orientacji lipidów w monowarstwach w pH o wartości 5,8. Zmiana zorientowania cząsteczek, czyli kąta nachylenia krzywej lub zwiększenia pola powierzchni informuje nas o oddziaływaniu leku z częścią hydrofilową lipidu. Podczas zastosowania środowiska kwasowego jako fazy nośnej w obecności leku dochodzi prawdopodobnie do bardziej prostopadłego ustawienia lipidów w monowarstwie, co objawia się spadkiem powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę.

Podsumowując, można stwierdzić, że zarówno podwyższenie, jak i obniżenie wartości pH fazy nośnej znacząco wpływa na ułożenie lipidów w monowarstwie, co powoduje zmianę kształtu krzywych oraz zmianę pola powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w monowarstwie.

4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania potwierdzają wpływ leku na błony biomimetyczne. Za pomocą analizy izoterm udowodniono, że farmaceutyk wykazuje duże powinowactwo do części hydrofilowej. Ponadto wykazano, że wraz ze zmianą parametrów fizykochemicznych można regulować reakcję leku z membranami, a tym samym zmieniać organizację lipidów w tych strukturach. Potwierdzono również, że lek, zgodnie z wcześniejszymi oczekiwaniami, najbardziej wpływa na membrany zawierające w składzie kardiolipinę. W przypadku pozostałych monowarstw zmiany w strukturze w obecności epirubicyny są nieco mniejsze. Analizując powyżej przedstawione wyniki można stwierdzić, że epirubicyna ulega wbudowaniu w struktury monowarstw lipidowych, ale nie niszczy ich. Uzyskane wyniki mogą być potencjalnym źródłem informacji w testach *in vivo* na żywych komórkach.

Podziękowania

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego Sonata (UMO-2016/23/D/ST4/0321) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Literatura

1. Matyszewska D., Nazaruk E., Campbell R.A., *Interactions of anticancer drugs doxorubicin and idarubicin with lipid monolayers: New insight into the composition, structure and morphology*, Journal of Colloid and Interface Science, 581, 2021, s. 403-416.
2. Nieciecka D., Kijewska K., Baumler S. M., Puszko A.K., Misicka A., Krysinski P., *Interactions of mitoxantrone-modified superparamagnetic Iron oxide nanoparticles with biomimetic membranes and cells*, Journal of Materials Science and Engineering, B 10, 2020, s. 34-48.
3. Townsend D., *Epirubicin*, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference 2007, s. 1-6.
4. Cai F., Antonio M., Luis F., Lin X., Wang M., Cai L., Cen C., Biskup E., *Anthracycline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: Preventive strategies and treatment*, Molecular and Clinical Oncology, 11, 2019, s. 15-23.
5. Neumann D., Korzeniowska K., Jankowski J., Jabłeczka A., *Kardiotoksyczność leczenia przeciwnowotworowego*, Choroby Serca i Naczyń, 13, 2016, s. 434-444.
6. Nieciecka D., Królikowska A., Kijewska K., Blanchard G. J., Krysinski P., *Hydrophilic iron oxide nanoparticles probe the organization of biomimetic layers: Electrochemical and spectroscopic evidence*, Electrochimica Acta, 209, 2016, s. 671-681.
7. Singh Z., Kaur H. *Toxicological aspects of antineoplastic drugs Doxorubicin and Epirubicin*, Journal of Clinical and Molecular Medicine, 2, 2019, s. 1-5.
8. Working K., Newman M.S., *Reduction of the cardiotoxicity of doxorubicin in rabbits and dogs by encapsulation in long-circulating pegylated liposomes*, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 289, 1999, s. 1128-1133.
9. Elderdfi M., Sikorski A.F., *Langmuir-monolayer methodologies for characterizing protein-lipid interactions*, Chemistry and Physics of Lipids, 212, 2018, s. 61-72.
10. www.avantilipids.com.
11. Nieciecka D., Królikowska A., Krysinski P., *Probing the interactions of mitoxantrone with biomimetic membranes with electrochemical and spectroscopic techniques*, Electrochimica Acta, 165, 2015, s. 430-442.
12. Nobrea T.M., Pavinatto F.J., Caselib L., Barros A., Timmons, Dynarowicz-Łątka P., Oliveira O.N., *Interactions of bioactive molecules & nanomaterials with Langmuir monolayers as cell membrane models*, Thin Solid Films, 593, 2015, s. 158-188.
13. Matyszewska D., *The influence of charge and lipophilicity of daunorubicin and idarubicin on their penetration of model biological membranes—Langmuir monolayer and electrochemical studies*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1862, 2020, s. 1-10.
14. Zhang H., Jiang H., Sun F., Wang H., Zhao J., Chen B., Wang X., *Rapid diagnosis of multidrug resistance in cancer by electrochemical sensor based on carbon nanotubes-drug supramolecular nanocomposites*, Biosens. Bioelectron., 26, 2011, s. 3361-3366.
15. Nieciecka D., Królikowska A., Joniec A., Krysinski P., *Partitioning of doxorubicin into Langmuir and Langmuir-Blodgett biomimetic mixed monolayers: electrochemical and spectroscopic studies*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 710, 2013, s. 59-69.
16. Aryal B., Rao V.A., *Deficiency in cardiolipin reduces Doxorubicin-induced oxidative stress and mitochondrial damage in human B-lymphocytes*, PLoS One, 11, 2016, s. 1-5.

Wpływ leku przeciwnowotworowego epirubicyny na sposób organizacji lipidów w membranach biomimetycznych

Streszczenie

W pracy otrzymano membrany biomimetyczne na granicy faz woda/powietrze oraz badano organizację lipidów w tych strukturach w obecności leku antracyklinowego – epirubicyny. Dzięki odtworzeniu struktury naturalnych błon biologicznych w postaci membran biomimetycznych można było zbadać wpływ farmaceutyku w odniesieniu do różnych parametrów fizykochemicznych. W pierwszym etapie badań utworzono membrany biomimetyczne, w skład których wchodziły lipidy naturalnie występujące w błonach komórkowych. W badaniach do analizy sposobu oddziaływania antybiotyku z membraną wykorzystano technikę Langmuira. Wyniki pokazują, że antracyklina bardzo silnie kumuluje się w membranie, w skład której wchodzi kardiolipina. Niewielka domieszka tego lipidu (nawet 10%) do monowarstwy powoduje, że znacząco zwiększa się powinowactwo terapeutyku do błony biomimetycznej.

Wydaje się, że wyniki przeprowadzonych eksperymentów oprócz interesujących aspektów poznawczych, mogą w przyszłości przyczynić się do projektowania i syntetyzowania leków o wyższej skuteczności i niższym działaniu ubocznym.

Słowa kluczowe: membrany biomimetyczne, antracykliny, epirubicyna, technika Langmuira

Influence of the anti-cancer drug epirubicin on the organization of lipids in biomimetic membranes

Abstract

The study investigated the organization of lipids in biomimetic membranes in the presence of an anthracycline drug – epirubicin. The membranes were created at the water/air interface by the Langmuir method. The Langmuir technique enables the formation of membrane as analogs of biological membranes under laboratory conditions. The advantage of Langmuir structures is that the physicochemical parameters can be easily modified during the experiment. This makes it possible to create conditions similar to physiological environment. The Langmuir technique was used also to study the way of interaction the antibiotic with the membrane. The results show that anthracycline accumulates very strongly in the membrane, which includes cardiolipin. A small addition of this lipid (even 10%) in the monolayer significantly increases the affinity of the therapeutic to the biomimetic membrane.

The results show that anthracycline very strongly accumulates in the membrane, which includes cardiolipin. The non-admixture of this lipid (even 10%) to the monolayer significantly increases the affinity of the therapeutic to the biomimetic membrane.

It seems that the presented results, except interesting cognitive aspects, may in the future contribute to the design and synthesis of drugs with higher efficacy and lower side effects.

Keywords: biomimetic membranes, anthracyclines, epirubicin, Langmuir technique

Diagnostyka zakażeń wirusem Epstein-Barr i jego rola w rozwoju wybranych chorób nowotworowych

1. Wstęp

Wirus Epstein-Barr (EBV), którego nazwa wywodzi się od nazwisk jego odkrywców, jest wirusem herpes typu 4 (HHV-4) i należy do podrodziny Gammaherpesvirinae, a rodziny Herpesviridae. Cechą charakterystyczną tej rodziny wirusów jest zdolność ustalania latencji w komórkach gospodarza.

Znane są dwa podtypy wirusa: EBV-1 i EBV-2, które różnią się między sobą regionem kodującym antygen jądrowy wirusa.

Typ EBV-1 jest spotykany częściej w Europie a EBV-2 jest charakterystyczny dla Afryki Centralnej i Nowej Gwinei [1-3].

Szacuje się, że liczba zakażonych EBV oscyluje między 90 a 95%, a w krajach rozwijających się to prawie 100% populacji. Zakażenie szerzy się drogą kropelkową, rzadziej przez przetoczenie preparatów krwiopochodnych i przeszczepy. Okres inkubacji wirusa to około 30-50 dni [1, 4].

EBV należy do wirusów onkogennych, limfotropowych i jest jednym z czynników etiologicznych m.in. nowotworów układu chłonnego czy jamy nosowo-gardłowej [1, 5].

Osoby ze sprawnym układem immunologicznym zakażenie EBV kończą pełnym wyzdrowieniem, jednak wirus może pozostać w organizmie w formie latentnej w limfocytach B i ulegać reaktywacji w stanach obniżonej odporności.

Niestety, nie jest dokładnie poznany mechanizm onkogenezy w przebiegu tego zakażenia wirusowego [5].

2. Wirus Epstein-Barr – budowa, przebieg zakażenia, faza latentna i reaktywacja

2.1. Budowa EBV

Wirion ma kształt sferyczny a jego zewnętrzną warstwę stanowi lipidowa osłonka, która zawiera glikoproteiny powierzchniowe, odpowiadające za adsorpcję do receptorów komórkowych i wnikanie wirusa do komórki. Sam kapsyd ma symetrię dwudziestoscienną i jest zbudowany ze 162 kapsomerów. Między kapsydem a osłonką znajduje się warstwa białkowa, zawierająca białka o aktywności enzymatycznej, niezbędne we wczesnych etapach zakażenia komórki. Genom EBV ma postać dwuniciowej, liniowej cząsteczki DNA o długości 172 par zasad i koduje prawie 100 białek [6-8].

Składa się on z sekwencji krótkiej i długiej, która zawiera fragmenty powtórzeniowe, sekwencje wewnętrznie powtórzone i terminalne.

Po fuzji z komórką gospodarza nukleokapsyd uwalniany jest do cytoplazmy a materiał genetyczny transportowany do jądra komórkowego. W zakażonej komórce, genom wirusa przyjmuje zazwyczaj formę pozachromosomalnego, kolistego episomu,

¹ anita.stanjek@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

ale czasami może też ulec integracji z chromosomami w formie linearnego DNA. Forma episomalna związana jest z fazą utajenia a liniowa z fazą lityczną wirusa [1].

2.2. Przebieg zakażenia

EBV to wyłącznie ludzkie wirusy. Docelowymi komórkami atakowanymi przez nie to komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej oraz gardła oraz limfocyty B. Uwolniony w cytoplazmie genom wirusa wnika do jądra komórki docelowej, a tam przy udziale polimerazy DNA gospodarza i enzymów wirusowych rozpoczyna się jego replikacja.

Potomne cząstki wirusa doprowadzają do „rozerwania” i lizy zaatakowanej komórki – jest to tzw. cykl lityczny. Uwolnione wirusy atakują następne komórki docelowe, szerząc zakażenie na sąsiadujące komórki. Ważnym następstwem zakażenia limfocytów B jest ich aktywacja w kierunku wzrostu i różnicowania się w komórki pamięci. W fazie wirerii zakażone komórki pamięci typu B migrują do krwi i wraz z nią rozprawdane są po całym organizmie. W tej fazie mogą zostać zakażone wątroba, tarczyca, mózg, opony móżgowo-rdzeniowe, mięsień sercowy i osierdzie oraz wiele innych narządów [9].

W fazie litycznej zakażone komórki ujawniają na swojej powierzchni białka charakterystyczne dla wirusa. Są to m.in. antygen błonowy (MP), wczesny kompleks antygenowy (EA) i kompleks antygenowy kapsydu wirusa (VCA). Białka te powodują pobudzenie i rozwój nieswoistej i swoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Swoiste przeciwciała neutralizujące, skierowane przeciwko tym białkom wirusa oraz zaktywowane limfocyty T i NK, przy pomocy licznych cytokin, doprowadzają do wyeliminowania większej liczby zakażonych komórek a tym samym ograniczenia zakażenia i ustąpienia objawów choroby. W niewielkiej liczbie komórek pamięci typu B a także w komórkach nabłonkowych wirus pozostaje w fazie „uśpienia” do końca życia gospodarza. Jest to tzw. faza latentna zakażenia [9, 10].

W stanie latencji genom wirusa ulega przemianie w kolisty, pozachromosomalny episom. Za utrzymywanie wirusowego DNA w postaci kolistej odpowiada jedno z białek wirusowych. Jest to antygen jądrowy EBNA-1. W stanie latencji kolisty DNA EBV replikuje w zakażonych limfocytach B i trafia do komórek potomnych żywiciela. Replikacja ta jest zgodna z cyklem komórkowym, podczas jednego cyklu komórkowego replikacja genomu EBV zachodzi tylko jeden raz.

Wirus, chcąc uniknąć eliminacji przez układ odpornościowy, zmniejsza liczbę eksponowanych antygenów w fazie latentnej. W fazie tej występują trzy różne modele ekspresji genów. W zależności od rodzajów powstających białek w każdym z tych typów, można wyróżnić trzy typy latencji [9, 10].

Każdy z tych typów jest charakterystyczny dla rozwoju określonego rodzaju chorób rozrostowych. Typ I związany z ekspresją białek m.in. EBNA-1, EBERs obserwujemy w rozwoju chłoniaka Burkitta. Drugi typ latencji z ekspresją np. LMP-1, LMP- 2A występuje w chłoniaku Hodgkina czy raku nosogardzieli. Typ III z ekspresją m.in. EBNA-2 czy EBNA-3 możemy stwierdzić w rozwoju chorób limfoproliferacyjnych związanych ze stosowaniem immunosupresji [9].

2.3. Reaktywacja

Reaktywacja wirusa czyli przejście z fazy latentnej w lityczną występuje podczas osłabionej odporności organizmu, która może wynikać z leczenia immunosupresyjnego.

Reaktywację wirusa wywołują również cytokiny, hormony steroidowe czy czynniki wzrostu nowotworu. Spontaniczna reaktywacja zachodzi jeden raz na około 104 komórki. Reaktywacja EBV jest szczególnie groźna dla osób po przeszczepach, wymagających immunosupresji, ponieważ może stanowić zagrożenie życia pacjenta. Objawy kliniczne to: gorączka, zapalenie płuc, wątroby, opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. W morfologii stwierdza się leukopenię a w rozmazie krwi obecność atypowych limfocytów. Reaktywacja EBV u osób po transplantacjach może wywołać rozwój potransplantacyjnej choroby limfoproliferacyjnej [11, 12].

3. Chorobotwórczość wirusa Epstein-Barr

EBV przenosi się przez ślinę, drogą kropelkową, drogą płciową, jak i przez przetoczenie krwi lub preparatów krwiopochodnych.

Podstawową jednostką chorobową wywoływaną przez wirus Epstein-Barr jest mononukleozą zakaźną.

Niestety, oprócz niej EBV może indukować wiele innych chorób, w tym choroby nowotworowe. Do najczęściej wiązanych z infekcją EBV należą: chłoniak Burkitta, inne chłoniaki niezłośliwe wywodzące się z limfocytów B, rak nosogardzieli, ziarnica złośliwa i inne. Istnieją również doniesienia o wpływie EBV na rozwój raka żołądka oraz raka piersi.

EBV wywołuje także zespoły limfoproliferacyjne u osób z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności. Podejrzewa się EBV również o udział w rozwoju chorób autoimmunologicznych, alergicznych oraz w tzw. zespole przewlekłego zmęczenia [11, 13, 14].

3.1. Mononukleozą zakaźną

Źródłem zakażenia i rezerwuarem wirusa są chorzy, ozdrowieńcy i osoby zdrowe, u których dochodzi do reaktywacji EBV z wydzielaniem wirusa ze śliną. Najczęściej chorują dzieci powyżej 4 roku życia, młodzież i młodzi dorośli. Nie obserwuje się sezonowości zachorowań. Okres rozwoju choroby to 30-50 dni i poprzedzony jest objawami zwiastującymi takimi jak: złe samopoczucie, brak apetytu, bóle mięśniowo-stawowe, czy dreszcze. Po tym okresie pojawiają się typowe dla mononukleozy objawy: ostre zapalenia gardła, z zajęciem migdałków i pojawieniem się biało-żółtych nalotów, gorączka do 40°C, która może trwać do trzech tygodni, powiększenie węzłów chłonnych, powiększenie wątroby i śledziony wysypka odro- i różyczkopodobna. Częstość występowania wysypki wzrasta jeśli lekarz zlecił stosowanie penicylin półsyntetycznych. Do powikłań w przebiegu mononukleozy zakaźnej dochodzi dość rzadko, należy do nich małopłytkowość, niedokrwistość hemolityczna, pęknięcie śledziony, zapalenie mózgu, mięśnia sercowego, trzustki czy jąder a także mięśniowe uszkodzenie wątroby. Uczucie zmęczenia, osłabienia może trwać nawet do 8 tygodni po chorobie [9, 15].

3.2. Choroby nowotworowe a EBV

Najczęściej choroba nowotworowa jest wynikiem stopniowej kumulacji mutacji w strukturze genomu komórki somatycznej, którą kieruje na drogę niekontrolowanej nowotworowej replikacji. Jednym z czynników, które mogą wywołać kancerogenezę jest infekcja: wirusowa, bakteryjna, grzybicza, a nawet zakażenie pasożytami.

Wirus Epsteina-Bar był pierwszym wirusem, który spełniał wszystkie kryteria konieczne do uznania go jako czynnik etiologiczny powstającego nowotworu:

- istnienie wyraźnego związku epidemiologicznego;
- stwierdzenie obecności antygenów bądź genomu wirusa w komórkach guza;
- izolacja z guza wirusa zdolnego do zakażenia oraz nowotworowej transformacji *in vitro* innych komórek [16].

Wirus EBV odgrywa rolę w powstawaniu wielu nowotworów limfoproliferacyjnych, jamy nosowo-gardłowej, żołądka czy piersi.

Niemal we wszystkich przypadkach można wykazać kancerogenną rolę EBV w odniesieniu do chłoniaka Burkitta, potransplantacyjnego zespołu limfoproliferacyjnego czy pozawęzłowego chłoniaka z komórek NK/T w obrębie jam nosa, gdzie znalezienie elementów genomu EBV w rozroście limfocytarnym jest jednym z kryteriów rozpoznania [11, 16].

3.2.1. Chłoniak Burkitta

Chłoniak Burkitta jest najbardziej złośliwym nowotworem układu chłonnego, wywodzącym się z dojrzałych limfocytów B ośrodków rozmnażania grudek chłonnych o niezwykle szybkiej dynamice podziałów komórek. Charakteryzuje się blisko 100% odsetkiem komórek mnożących się, burzliwym przebiegiem choroby, bezpośrednio zagrażającym życiu w ciągu kilku tygodni od wystąpienia pierwszych objawów [17].

Chłoniak ten występuje w dwóch postaciach: endemicznej i sporadycznej. Postać endemiczna dotyczy głównie dzieci z rejonu Afryki równikowej. W tym rejonie jest to najczęstszy nowotwór występujący u dzieci [11].

Typowy obraz choroby w obszarach endemicznych to szybko rosnący guz żuchwy lub jamy brzusznej u dziecka w wieku 5-8 lat. W przypadkach lokalizacji brzusznej często zajęta jest okolica jelit i okoliczne węzły chłonne z towarzyszącym wysiewem do wolnego płynu w otrzewnej, nerki oraz jajniki. Pierwotne zajęcie ośrodkowego układu nerwowego występuje w około 40% przypadków endemicznych.

W USA i w Europie najczęściej występuje umiejscowienie brzuszne, niekiedy prowadzące do niedrożności jelit [17].

EBV obecny jest w 96% przypadków endemicznych, zaś w postaci sporadycznej wirusa wykrywa się w 20-30% przypadków. Wirus wykrywany w komórkach chłoniaka Burkitta ma postać kolistą, wykazującą ekspresję genów zbliżoną do tej występującej w utajeniu typu I. W rozwoju endemicznej postaci BL podejrzewa się udział malarii jako kofaktora. We wszystkich chłoniakach Burkitta stwierdza się jedną z trzech chromosomalnych translokacji: 8:14, 8:2, 8:22, które skutkują konstytutywną ekspresją. Są to translokacje materiału genetycznego powodujące aktywację onkogenu *c-myc*, która może skutkować monoklonalnym wzrostem limfocytów B. Powstawaniu takich zmian chromosomowych sprzyja stymulacja limfocytów B przez EBV [11].

3.2.2. Chłoniak Hodgkina (ziarnica złośliwa)

Chłoniak Hodgkina charakteryzuje się obecnością olbrzymich nowotworowych komórek Reed-Sternberga o wielopłatowym jądrze oraz dużych jednojądrzastych komórek Hodgkina, które wywołują odczynową proliferację np. limfocytów, monocytów, histiocytów oraz makrofażów tworzących naciek ziarniczny. Główną masę nowotworu

stanowią tu komórki mikrośrodowiska a nie same nowotworowe komórki Reed-Sternberga [18].

W krajach rozwiniętych obserwuje się dwa szczyty zachorowań – w trzeciej dekadzie życia i po 50. roku życia, chorują częściej mężczyźni. W krajach rozwijających się choroba częściej występuje w dzieciństwie.

Etiologia choroby pozostaje niewyjaśniona.

Badania epidemiologiczne wskazują na związek zakażenia wirusem Epstein-Barr z rozwojem chłoniaka Hodgkina. Genom EBV jest wykrywany w 20-80% materiału histologicznego z węzłów chłonnych [19]. W zależności od charakteru otoczenia komórek nowotworowych wyróżnia się 4 podtypy typowej postaci chłoniaka Hodgkina:

- bogaty w limfocyty ze stwardnieniem guzkowym;
- mieszanokomórkowy;
- ubogolimfocytarny;
- nieklasyczną postać z przewagą limfocytów.

Najsilniejszy związek między rozwojem tego chłoniaka a obecnością genomu EBV stwierdza się w podtypie mieszanokomórkowym [11, 20].

W komórkach Hodgkina-Reed-Sternberga wykrywane są białka wirusowe, takie jak EBNA-1, LMP1, LMP2A oraz LMP2B. Dodatkowo wykrywa się między innymi EBERs. Jest to charakterystyczny model ekspresji dla utajenia typu II [11].

3.2.3. Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna (PTLD)

Poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna to grupa chorób charakteryzująca się niekontrolowaną proliferacją komórek układu chłonnego. Najczęściej proliferacji ulegają limfocyty B (90%), rzadziej limfocyty T (9%) lub komórki NK (0,5%).

Najistotniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju PTLD jest zakażenie EBV po transplantacji. Wzrasta ono u biorców EBV-seronegatywnych od 23% do 50%. Natomiast u biorców EBV-seropozytywnych wynosi od 0,7% do 1,9%. Niezależnie od rodzaju zakażenia (pierwotne albo reaktywacja) każde zarażenie EBV może prowadzić do proliferacji komórek układu chłonnego. Immunosupresja wywołuje również zmiany w działaniu systemu obrony przed infekcją EBV, obniżając liczbę limfocytów T z antygenem CD8. Ponadto, następuje transformacja blastyczna komórek zainfekowanych EBV, głównie limfocytów B.

Mutagenne działanie wirusa oraz częste rearanżacje genów łańcuchów immunoglobulin mogą spowodować groźne mutacje, transformację złośliwą limfocytów B i w konsekwencji ich monoklonalną ekspansję [11]. Ze względu na różnice występujące w przebiegu i w obrazie klinicznym wyróżnia się wczesną i późną poprzeszczepową chorobę limfoproliferacyjną. We wczesnej PTLD, pojawiającej się przed upływem roku po przeszczepie, znacznie częściej wykazuje się związek z zakażeniem EBV [1]. U dorosłych największe ryzyko występuje po przeszczepach wielonarządowych i jelitowych (> 20%), płuc (3-10%), serca (2-8%) i wątroby (1-5,5%). Większość z tych chorób ma ekspresję genów latencji typu III, ale wykazano również latencje typu I i II.

LMP1 kodowane przez EBV można określić jako główny protoonkogen ulegający ekspresji w większości PTLD z dodatnim EBV. Białko to aktywuje kilka szlaków sygnałowych, które przyczyniają się do ekspresji białek antyapoptotycznych, takich jak

Bcl-2 czy A20 oraz niektórych cytokin. Prawie wszystkie rodzaje tych zaburzeń są powiązane z tym wirusem a pojawianie się błędów na poziomie molekularnym silnie wpływa na rozwój złośliwości tego nowotworu [21, 22].

3.2.4. Nowotwory głowy i szyi

Większość spośród nich wywodzi się z nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, gardła i krtani a dominuje rak płaskonabłonkowy, który występuje w około 90% wszystkich przypadków. Głównymi kancerogenami są związki zawarte w dymie tytoniowym, alkohol, nieprawidłowa higiena jamy ustnej, niewłaściwa dieta oraz zakażenie wirusem brodawczaka i EBV. W przypadku niezróżnicowanego raka jamy nosowo-gardłowej wszystkie przypadki są związane z EBV [23]. EBV występuje w formie latentnej w większości nowotworów powiązanych z nabłonkiem, w przeciwieństwie do prawidłowego nabłonka, gdzie dochodzi zwykle do infekcji litycznej. Istotne jest ustalenie utajonej infekcji EBV, gdyż może to stanowić krytyczny etap w patogenezie nowotworów nabłonka. Głównymi białkami, które odpowiadają za onkogenność EBV są LMP1, LMP2 i EBNA. Uczestniczą one w ograniczaniu apoptozy, promują angiogenezę a także ulegają ekspresji w ludzkim nowotworze jamy nosowo-gardłowej oraz ustnej. Współuczestniczą one w progresji raka, jego inwazyjności i przerzutach, a także ułatwiają ucieczkę przed liniami obrony układu immunologicznego. W przypadku raka nosogardzieli związanego z EBV obserwuje się latencję typu II [21, 24].

3.2.5. Rak żołądka

Szacuje się, że około 10% raków żołądka jest spowodowana przez wirusa EBV. Zakażenie EBV może prowadzić nie tylko do przewlekłego zapalenia żołądka, ale i nowotworzenia. Nowotwór żołądka nie wykazuje tendencyjnego rozmieszczenia geograficznego [21, 25].

Rak żołądka związany z zakażeniem EBV jest wynikiem proliferacji monoklonalnych komórek nowotworowych, które są latentnie zainfekowane tym wirusem [26]. Częstotliwość tego nowotworu powiązanego z EBV na świecie wynosi średnio około 10%. Różnice w częstotliwości są spowodowane czynnikami geograficznymi i środowiskowymi. Szacuje się, że u około 75000-90000 ludzi rocznie rozwija się rak żołądka powiązany z EBV [25]. Ryzyko nowotworu żołądka wzrasta wraz z koinfekcją *Helicobacter pylori* oraz EBV. Lokalizacja rozwoju raka dotyczy zwykle środkowej lub górnej części żołądka i występuje jako powierzchownie zagłębione lub owrzodzone zmiany. Wykazano, że EBV-dodatni rak żołądka ma odmienny profil ekspresji białek i cechy kliniczne oraz patologiczne w porównaniu z EBV-ujemnym. W EBV-dodatnim raku żołądka występuje latencja typu I. Pomimo wielu postępów mechanizmy nowotworu żołądka powiązanego z EBV ciągle nie zostały w pełni wyjaśnione [21].

4. Diagnostyka zakażeń wirusem Epstein-Barr

4.1. Badania serologiczne w detekcji swoistych przeciwciał

Przeciwciała swoiste, mające znaczenie w diagnostyce, skierowane są przeciwko antygenowi kapsydowemu VCA, białkom fazy wczesnej EA oraz rodzinie antygenów jądrowych EBNA. W przebiegu zakażenia jako pierwsze pojawiają się przeciwciała klasy IgM skierowane przeciwko antygenowi kapsydowemu. Immunoglobuliny te naj-

wyższe stężenia osiągają w 2-3 tygodnie od zakażenia a utrzymują się do 3-4 miesięcy. Następnie pojawiają się przeciwciała przeciwko antygenowi kapsydowemu ale już klasy IgG. Wykrywamy je przez całe życie u osoby raz zakażonej EBV. Najwyższy poziom tych immunoglobulin przypada na 2-3 miesiące po infekcji. Kolejne pojawiają się przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko białkom wczesnej fazy. Ich obecność świadczy o replikacji wirusa między 3-4 tygodniem a 3-4 miesiącem od zakażenia. Następnie zanikają a mogą się ponownie ujawnić po ponownej reaktywacji wirusa.

W późniejszej fazie zakażenia wytwarzane są przeciwciała przeciwko EBNA-1, i one również pozostają w surowicy przez całe życie [11].

W diagnostyce serologicznej zakażeń EBV przydatne jest również oznaczenie awidności (sumy siły wiązania wszystkich miejsc wiążących) przeciwciał IgG skierowanych przeciwko antygenowi kapsydowemu. Badanie to pozwala odróżnić świeżą infekcję od dawno przebytej [27]. Metodami, które są stosowane do oznaczenia stężenia swoistych przeciwciał przeciwko antygenom EBV są:

- metody immunoenzymatyczne – najczęściej testy ELISA, krzywej standardowej;
- metody immunohistochemiczne;
- metody immunofluorescencyjne [11].

4.2. Diagnostyka molekularna

Metody molekularne znacznie poszerzają możliwości diagnostyczne zakażeń EBV u osób pozostających w immunosupresji oraz chorych na nowotwory. W wykrywaniu EBV stosuje się różne techniki diagnostyczne, takie jak hybrydyzacja *in situ*, PCR i PCR w czasie rzeczywistym oraz hybrydyzację Southern blot. Metody te pozwalają na wykrycie wirusa w zakażonych komórkach oraz monitorowanie jego ilości w tkankach. Dzięki zastosowaniu metody hybrydyzacji *in situ* genom EBV wykryto między innymi w komórkach Reeda-Sternberga i komórkach Hodgkina [9, 28].

Metoda real-time PCR pozwala monitorować poziom wirusii i ocenę skuteczności leczenia. Real-time PCR jest najczęściej stosowaną metodą do pomiaru viral load, niezwykle ważnej wartości w monitorowaniu odpowiedzi na zastosowane leczenie w zakażeniach. Mając na uwadze, zdolność EBV do ustalania zakażenia latentnego twierdzi się, że wykrycie obecności DNA tego wirusa jest niewystarczające do diagnozowania chorób z nim związanych. Ilościowy pomiar EBV DNA, w odpowiednio dobranym materiale klinicznym, jest istotny do rozróżnienia niskiego poziomu replikacji wirusa u osób klinicznie zdrowych od wysokiego poziomu replikacji, charakterystycznego dla chorób związanych z EBV.

Podczas ostrej fazy zakażenia, wirusowe DNA może być wykrywane w osoczu. Oznaczenie DNA wirusa Epsteina-Barr w materiale biologicznym za pomocą ilościowego testu wykorzystującego reakcję łańcuchowej polimerazy. Badanie ilościowe pozwala na oznaczanie ilości materiału genetycznego wirusa EBV w jednym mililitrze osocza i wyrażone jest w kopiach genomu wirusa na mililitr (kopii/ml) [29].

Techniki hybrydyzacji Southern blot i hybrydyzacji *in situ* z użyciem klonowanych fragmentów DNA lub RNA wirusa pozwalają wykryć nawet niepełne fragmenty jego genomu, które występują w krążących limfocytach lub w materiale biopsyjnym [28].

W diagnostyce zakażenia EBV można również stosować test ELISPOT, który polega na ocenie liczby komórek produkujących interferon [28].

ELISPOT opiera się na stosowaniu par przeciwciał wiążących oraz detekcyjnych z fazą stałą w trakcie hodowli komórkowej. Dzięki czemu możemy wykryć nawet pojedynczą komórkę wydzielającą interferon [30].

5. Podsumowanie

Szukając czynników mogących sprzyjać rozwojowi chorób nowotworowych nie należy zapominać o onkogennym działaniu wirusów. Długotrwała obecność wirusów, między innymi EBV, w organizmie może prowadzić do rozwoju różnych typów nowotworów.

Po przebyciu pierwotnego zakażenia wirusem Epsteina-Barr pozostaje on w organizmie do końca życia. Przyczynowy związek zakażenia EBV z wieloma nowotworami jest bezdyskusyjny. Istotna jest właściwa i konsekwentnie prowadzona diagnostyka, pozwalająca na monitorowanie faz zakażenia, zwłaszcza u osób, gdzie ryzyko rozwoju nowotworu jest największe.

Literatura

1. Żuk-Wasek A., Charakterystyka białek wirusa Epsteina-Barr – ich udział w zakażeniu latentnym i powiązanie ich z procesami nowotworzenia, *Postępy Mikrobiologii*, 51, 2012, s. 191-201.
2. Gorzer I., Niesters H.G., Cornelissen J.J., Puchhammer-Stockl E. Characterization of Epstein-Barr virus Type 1 variants based on linked polymorphism among EBNA-3A, -3B, and -3C genes, *Virus Research*, 118, 2006, s. 105-114.
3. Tiwawech D., Srivatanakul P., Karalak A., Ishida T., Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais, *Journal of Clinical Virology*, 42, 2008, s. 1-6.
4. Murray P.G., Young L.S., *The role of the Epstein-Barr virus in human disease*, *Frontiers in Bioscience*, 7, 2002, s. 519-540.
5. Nasiłowska-Adamska B., Grabarczyk P., Dzieciatkowski T., Windyga J., Ejduk A., Tomaszewska A., Szczepiński A., Prochorec-Sobieszek M., Lech-Marańda E., Hałaburda K., Mariańska B., Warzocha K., *Wczesna potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego oraz zakażeniem EBV u chorego po allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych*, *Hematologia*, 5, 2014, s. 81-88.
6. Leś K., Przybylski M., Łazińska B., *Diagnostyka laboratoryjna mononukleozy zakaźnej u chorych leczonych ambulatoryjnie*, *Postępy Nauk Medycznych*, 28, 2015, s. 42-47.
7. Arvin A., Fiume G.C., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K., *Human Herpes Viruses, Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*, Cambridge University Press, New York 2007, s. 341-378.
8. Acheson N.H., *Fundamentals of molecular virology*, John Wiley & Sons, Hoboken 2007, s. 134-146.
9. Ołdak E., *Mononukleozą zakaźną*, *Pediatrics po Dyplomie*, 16, 2012, s. 15-21.
10. Odumade O.A., Hogquist H.A., Balfour H.H., *Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr infections*, *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 2011, s. 193-209.
11. Bocian J., Januszkievicz-Lewandowska D., *Zakażenia EBV – cykl życiowy, metody diagnostyki, chorobotwórczość*, *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, 65, 2011, s. 286-298.

12. Bienias J., Krzemień S., Mazurek U., *Charakterystyka wirusa Epsteina-Barr – aspekty epidemiologiczne, biomolekularne i transplantologiczne*, Postępy Mikrobiologii, 46, 2007, s. 153-165.
13. Thompson M.P., Kurzrock R., *Epstein-Barr virus and cancer*, Clinical Cancer Research, 10, 2004, s. 803-821.
14. Szmidt A., Stańczyk-Przyłuska A., *Rola wirusa EBV w patogenezie chorób alergicznych*, Alergia Astma immunologia – przegląd kliniczny, 10, 2005, s.169-174.
15. Rajewski P., Rajewski P., Waleśkiewicz-Ogórek K., *Mononukleoza zakaźna – opis przypadku*, Forum Medycyny Rodzinnej, 4, 2015, s. 344-347.
16. Bień S., *Rola infekcji wirusem Epsteina i Barr w schorzeniach głowy szyi*, Polski Przegląd Otorynolaryngologiczny, 2. 2013, s. 127-136.
17. <http://onkologia.org.pl/chloniaki-nie-hodgkina>, 31.07.2013.
18. Wróbel T., Puła B., *Rozpoznawanie i leczenie chorych na chłoniaka Hodgkina*, Hematologia, 8, 2017, s. 163-176.
19. Azhar M., Ud Din H., Muhammad I., Hashmi S.N., Akhtar F., *Frequency of epstein-barr virus in classical hodgkin Lymphoma*, Journal of Ayub Medical College, 28, 2016, s. 271-275.
20. Flavell K.J., Murray P.G., *Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus*, Journal of Molecular Pathology, 53, 2000, s. 262-269.
21. Koleśnik M., Dworzańska A., Polz-Dacewicz M., *Wirus Epsteina-Barr w wybranych chorobach nowotworowych*, Postępy Biochemii, 66, 2020, s. 385-389.
22. Crombie J.L., LaCase A.S., *Epstein Barr virus associated B-cell lymphomas and iatrogenic lymphoproliferative disorders*, Frontiers in Oncology,9, 2019, s. 109.
23. Al-Thawadi H., Gupta I., Jabeen A., Skenderi F., Aboukassim T., Yas-meen A., Malki M.I., Batist G., Vranic S., Al Moustaffa A.E., *Co-presence of human papillomaviruses and Epstein-Barr virus is linked with advanced tumor stage: a tissue mi-croarray study in head and neck cancer patients*, Cancer Cell International, 20, 2020, s. 1-13.
24. Vranic S., Cyprian F.S., Akhtar S., Al Moustafa A.E., *The role of epstein-barr virus in cervical cancer: a brief update*, Frontiers in Oncology, 8, 2018, s. 113.
25. Kanda T., Yajima M., Ikuta K., *Epstein-Barr virus strain variation and cancer*, Cancer Science, 110, 2019, s. 1132-1139.
26. Shinozaki-Ushiku A., Kunita A., Fukayama M., *Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer*, International Journal of Oncology, 46, 2015, s. 1421-1434.
27. Lipkovs'ka I., Kopcza W., *Specyfika zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego z obecną utajoną postacią toksoplazmozy i zakażeniem wirusem Epsteina-Barra u kobiet, które poroniły*, Przypadki Medyczne.pl, 72, 2015, s. 333-336.
28. Demkow U., *Diagnostyka immunologiczna i molekularna zakażeń dróg oddechowych*, Pneumonologia i Alergologia Polska, 79, 2011, s. 446-453.
29. Trzcińska A., Siennicka J., *Metoda real – time PCR w diagnostyce zakażeń wirusem Epsteina-Barr*, Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, 61, 2009, s. 253-258.
30. Śpiewak R., *Test immunoenzymatyczny ELISPOT: Perspektywy zastosowań w alergologii i immunologii*, Alergologia i Immunologia Współczesna, 4,2007, s. 77-81.

Diagnostyka zakażeń wirusem Epstein-Barr i jego rola w rozwoju wybranych chorób nowotworowych

Streszczenie

EBV należy do wirusów onkogennych, limfotropowych i jest jednym z czynników etiologicznych m.in. nowotworów układu chłonnego czy jamy nosowo-gardłowej.

Osoby ze sprawnym układem immunologicznym zakażenie EBV kończą pełnym wyzdrowieniem, jednak wirus może pozostać w organizmie w formie latentnej w limfocytach B i ulegać reaktywacji w stanach obniżonej odporności. Przyczynowy związek zakażenia EBV z wieloma nowotworami jest bezdyskusyjny. Istotna jest właściwa i konsekwentnie prowadzona diagnostyka, pozwalająca na monitorowanie faz zakażenia, zwłaszcza u osób, gdzie ryzyko rozwoju nowotworu jest największe.

Słowa kluczowe: EBV, chorobotwórczość, nowotwory, diagnostyka

Diagnostics of Epstein-Barr virus infections and its role in the development of selected cancers

Abstract

EBV belongs to oncogenic and lymphotropic viruses and is one of the etiological factors, incl. cancers of the lymphatic system or the nasopharynx. People with an efficient immune system end up with EBV infection, but the virus may remain in the body in a lethal form in B lymphocytes and reactivate in states of reduced immunity. EBV causal relationship with many cancers is indisputable. Proper and consistent diagnostics is important, allowing monitoring of the phases of infection, especially in people where the risk of cancer development is the highest.

Keywords: EBV, pathogenicity, cancer, diagnostics

Contrast Enhanced MRI w tkance nerki *in vitro*

1. Wstęp

Metoda Contrast Enhanced MRI to obrazowanie rezonansem magnetycznym ze wzmocnionym kontrastem. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI) jest nieinwazyjną techniką obrazowania, stosowaną w radiologii do tworzenia obrazów anatomii i fizjologicznych procesów organizmu.

Rola MRI w ocenie uszkodzeń nerek bezustannie rośnie. Rezonans magnetyczny może być stosowany w sytuacji, gdy czynności nerek są nierozwinięte, podczas ciężkiej alergii na kontrast lub w momencie narażenia na promieniowanie, np. kobiet w ciąży. Podejmowane są próby użycia MRI do obrazowania czynności nerek, w tym współczynnika perfuzji przesączania kłębuszkowego, jak i wewnątrznerkowego wskaźnika tlenu.

Celem projektu było zastosowanie metody obrazowania rezonansem magnetycznym MRI do oceny wycinków tkankowych *in vitro* raka nerki, na podstawie zmiany stężenia wody w tkance zdrowej i nowotworowej. Minimalne fragmenty tkanki zdrowej zostały potwierdzone poprzez badanie histopatologiczne. Fragmenty tkanki zdrowej były trudniejsze do pomiaru ze względu na wielkość.

W pracy opisany został magnetyczny rezonans jądrowy (MRJ/MRI), kontrasty, jakie się stosuje do badań rezonansem magnetycznym, stałe czasowe T_1 oraz T_2 . Przyjrano się badaniom MRJ nerek. Rola rezonansu magnetycznego w ocenie nieprawidłowości nerek wciąż rośnie. Rezonans magnetyczny może być stosowany w przypadku upośledzenia czynności nerek, ciężkiej alergii na kontrast lub w przypadku kobiet w ciąży. Opisano zasady pomiaru T_1 i T_2 oraz wyróżniono kilka przykładów tych sekwencji. Następnie podano przebieg badań, metody pomiaru. Potem wyniki, jakie uzyskano i na końcu wnioski ze zrealizowanych badań.

2. Magnetyczny Rezonans Jądrowy (MRJ/MRI)

Magnetyczny Rezonans Jądrowy (MRJ) lub MRI (ang. *Magnetic Resonance Imaging*) – jest to technika diagnostyki obrazowej, która jest stosowana w medycynie do badań wszystkich wewnętrznych, anatomicznych struktur organizmu [1]. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego jest bezpieczne, gdyż jak dotąd, badania te nie wykazały szkodliwego wpływu na organizm człowieka [2].

System MRI wykorzystuje silne pole magnetyczne i impulsy o częstotliwości radiowej do tworzenia szczegółowych obrazów wewnętrznych struktur ciała w postaci przekrojów lub warstw [3]. Obrazowanie opiera się na zjawisku jądrowego rezonansu magnetycznego. Jest ono szczególnie dla jąder pierwiastków z nieparzystą liczbą neutronów lub protonów, co równa się z posiadaniem momentu pędu, zwanego spinem.

¹ mielnik030@gmail.com, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, <https://www.ur.edu.pl/kolegia/kolegium-nauk-przyrodniczych>.

² mcholewa@ur.edu.pl, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, <https://www.ur.edu.pl/kolegia/kolegium-nauk-przyrodniczych>.

³ dbartusik-aebisher@ur.edu.pl, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, <https://www.ur.edu.pl/kolegia/kolegium-nauk-medycznych>.

Cząstka mająca moment pędu i ładunek elektryczny posiada moment magnetyczny (μ) [2]. Moment magnetyczny jądra określamy wzorem (1) [4]:

$$(\mu = \gamma \cdot s) \quad (1)$$

gdzie: μ – moment magnetyczny, γ – stała magnetyczna jądra, s – moment pędu (spin)

W medycynie skaner rezonansu magnetycznego służy do obrazowania narządów ciała ludzkiego. System MRI składa się z bardzo silnego magnesu nadprzewodzącego, który wytwarza statyczne pole magnetyczne, mniejszych magnesów „gradientowych”, które umożliwiają bardzo precyzyjną zmianę pola magnetycznego, oraz wyznaczonych cewek dla określonych części ciała, które emitują fale radiowe. Podczas badania cewki gradientowe służą do ogniskowania pola magnetycznego na skanowanej części ciała. Sygnał radiowy jest włączany i wyłączany, a energia pochłaniana przez różne atomy jest odbijana z powrotem poza ciało. Cewki mierzą te fale radiowe, a następnie komputer oblicza sposób, w jaki zostały one pochłonięte lub odbite, aby sporządzić obrazy przekrojowe [3].

Podczas wykonywania badania, atomy umieszczone w polu magnetycznym są pobudzane częstotliwościami radiowymi dla atomów wodoru. Skutkuje to precesją momentów magnetycznych atomów w polu magnetycznym. Obraz z MRI jest otrzymywany poprzez przyglądanie się procesom relaksacji składowej prostopadłej i składowej momentu magnetycznego atomów, określanymi stałymi czasowymi T_1 i T_2 [5].

3. Kontrasty MRJ, stałe czasowe T_1 i T_2

Środki kontrastowe są przydatne w szczególności do rozpoznania i różnicowania guzów, niedokrwienia i zmian zapalnych. Użycie ich w badaniu MRI pozwala między innymi określić filtrację nerek, jak i poprawia jakość obrazowania niewielkich naczyń w angiografii MR [6].

W MRI jako środki kontrastowe stosuje się związki, które skracają czasy relaksacji T_1 , T_2 protonów. Tkanka gromadząca środek kontrastowy, zależnie od sekwencji, z której się korzysta, może uwidocznnić hiperintensywność sygnału (obrazy T_1 -zależne) lub hipointensywność (obrazy T_2 -zależne). Dzięki temu, uzyskuje się obrazy z lepszym kontrastem pomiędzy tkankami, w szczególności między tkankami prawidłowymi a patologicznymi. Ze względu na właściwości magnetyczne wykorzystywanych środków kontrastowych, dzielimy je na pozytywne (paramagnetyki, które skracają czas relaksacji T_1) oraz negatywne (obniżają intensywność sygnału w tkance, która została wzmocniona środkiem kontrastowym, skracając przy tym czas relaksacji T_2) [6].

Sekwencje oznaczamy jako [4]:

- TE – jest to czas, który upływa pomiędzy impulsem a pomiarem;
- TR – jest to czas, który upływa pomiędzy dwoma następnymi impulsami.

Obrazy T_1 -zależne lub T_2 -zależne otrzymujemy, zależnie od tego, jak długo czekamy na wynik pomiaru sygnału TE i następnie na pomiar impulsu TR. Gdy czekamy zasadniczo krótko (TE rzędu 20 ms, a TR maksymalnie do 700 ms), uzyskujemy obrazy T_1 -zależne. Jeśli natomiast czekamy długo (TE jest powyżej 60-80 ms, a TR od 2000 ms wzwyż), uzyskujemy obrazy T_2 -zależne [4].

Końcowy kontrast na obrazie rezonansem magnetycznym otrzymuje się przez zastosowanie wag proporcjonalnych, w szczególności do T_1 lub T_2 . Pośród wielu metod wyróżniamy 4 podstawowe sekwencje [5]:

- Obrazy T_1 -zależne – magnetyzacja podłużna (określa szybkość relaksacji protonów). Najlepiej opisują strukturę mózgu: istota biała jest w barwach jasnych, a istota szara oraz płyn mózgowo-rdzeniowy w barwach ciemnych;
- obrazy T_2 -zależne – magnetyzacja poprzeczna (określa szybkość zmniejszania się sygnału). Istota biała pokazana jest na ciemno, a istota szara oraz płyn mózgowo-rdzeniowy na jasno;
- FLAIR (ang. *Fluid Light Attenuation Inversion Recovery*) – jest to przekształcenie sekwencji T_2 -zależnej. Pola z niewielką ilością wody widnieją w barwach ciemniejszych, a te z dużą ilością wody są ukazywane w barwach jaśniejszych.
- Obrazowanie dyfuzyjne – przyzwala ono mierzyć dyfuzję molekuł wody w tkance. Odróżnia się między innymi:
 - obrazowanie zależne od dyfuzji, DWI – wyróżnia się dużą skutecznością przy obrazowaniu udarów mózgu,
 - obrazowanie tensora dyfuzji, DTI – może być przystosowane do obrazowania zmian w łąkach istoty białej.

4. MRJ nerki

Rola rezonansu magnetycznego w ocenie nieprawidłowości nerek stale rośnie. Rezonans magnetyczny może być stosowany w przypadku upośledzenia czynności nerek, ciężkiej alergii na kontrast lub w przypadku narażenia na promieniowanie, np. u dzieci i kobiet w ciąży. Ponadto rezonans magnetyczny może być stosowany jako metoda rozwiązywania problemów, gdy wyniki TK nie są diagnostyczne. Podejmowane są próby wykorzystania MRI do obrazowania czynności nerek, w tym współczynnika perfuzji przesączania kłębuszkowego i wewnątrznerkowego pomiaru tlenu [7, 8].

W rezonansie magnetycznym nerek szybkie techniki obrazowania są niezbędne ze względu na ruch oddechowy nerek. Jeśli to możliwe, badanie należy wykonać podczas jednego wstrzymania oddechu. Pacjent powinien otrzymać jasne instrukcje dotyczące techniki wstrzymywania oddechu. Jeśli pacjent ma trudności z wstrzymywaniem oddechu, pomocny może być krótki okres hiperwentylacji przed wstrzymaniem oddechu. Badanie należy wykonywać podczas wydechu, ponieważ pozycja nerek jest bardziej stała przy wydechu niż przy wdechu. Jeśli sekwencja jest zbyt długa, aby wykonać ją przy jednym wstrzymaniu oddechu, można zastosować wyzwalanie oddechu. Inną techniką kontroli ruchu oddechowego jest bramkowanie oddechowe za pomocą pulsu nawigacyjnego. W tej technice ruch membrany jest monitorowany przez bardzo szybką sekwencję MRI 1D. Jeśli wstrzymanie oddechu nie jest możliwe, można zastosować uśrednianie sygnału, ale jakość obrazów będzie ograniczona. Preferowane jest użycie cewki korpusu z układem fazowanym ze względu na lepszy stosunek sygnału do szumu. Aby zapobiec aliasingowi w obrazowaniu koronalnym, ramiona pacjenta powinny być uniesione nad głowę lub ramiona mogą być wsparte na poduszkach, przed płaszczyzną wieńcową przez nerki [9].

Choroby nerek często powodują zaburzenia czynności tych narządów. Pomiar czynności nerek może służyć jako wskaźnik ciężkości choroby i może kierować terapią. Najprostsze testy czynności nerek to kreatynina i klirens kreatyniny w surowicy. Jednak testy te nie dostarczają informacji na temat funkcji poszczególnych nerek. Ta informacja może być ważna w przypadku żyjącego dawcy nerki, przed nefrektomią lub w przypadku zwężenia tętnicy nerkowej. Scyntygrafia nerek dostarcza informacji na temat funkcji każdej nerki, ale w badaniu tym brakuje szczegółów anatomicznych. TK

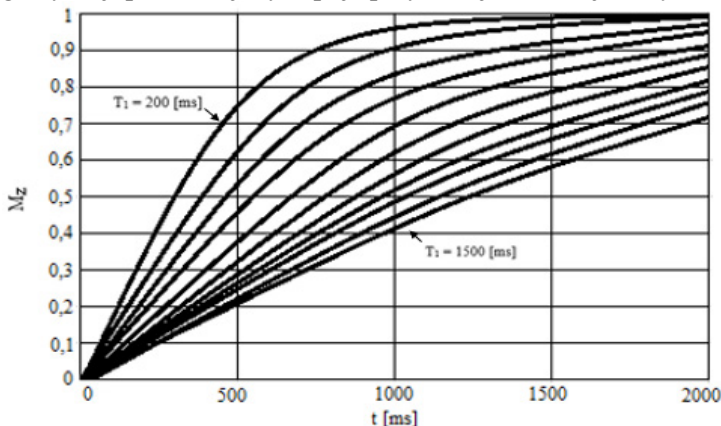
ma wadę promieniowania jonizującego i zastosowania kontrastu o potencjalnym działaniu nefrotoksycznym, który generalnie nie stanowi problemu w przypadku zdrowych nerek, ale może powodować pogorszenie funkcji nerek w przypadku, gdy są one chore. MRI może potencjalnie łączyć funkcjonalne i anatomiczne informacje o każdej nerce indywidualnie [10].

Rola MRI w obrazowaniu nerek nadal polega głównie na różnicowaniu zmian łagodnych i złośliwych u pacjentów, którzy nie mogą przejść tomografii komputerowej z dożylnymi jodowymi środkami kontrastowymi lub w przypadkach nie diagnostycznych wyników TK. MRI i CT wykazują porównywalną dokładność w wykrywaniu i charakteryzowaniu większości zmian nerek. MRI może mieć dodatkową wartość diagnostyczną w ocenie zmian z minimalną ilością tłuszczu lub z tłuszczem wewnątrzkomórkowym. Dane sugerują, że rezonans magnetyczny ma większą czułość w ocenie skomplikowanych torbieli, jednak implikacje kliniczne nadal wymagają zbadania. Istnieją dowody sugerujące, że MRI ma większą dokładność niż CT w ocenie wczesnego rozsiewu węzłów chłonnych. MRI jest odpowiednim narzędziem w przedoperacyjnej diagnostyce potencjalnych dawców nerek. Funkcjonalny rezonans magnetyczny nerki nie znalazł jeszcze szerokiego zastosowania klinicznego, ale ma duży potencjał. Dzięki ciągłemu rozwojowi technik funkcjonalnego rezonansu magnetycznego można spodziewać się coraz większej roli czynnościowego rezonansu magnetycznego w leczeniu pacjentów z chorobami nerek [11].

5. Relaksacje MRJ

5.1. Zasady pomiaru czasu relaksacji T_1

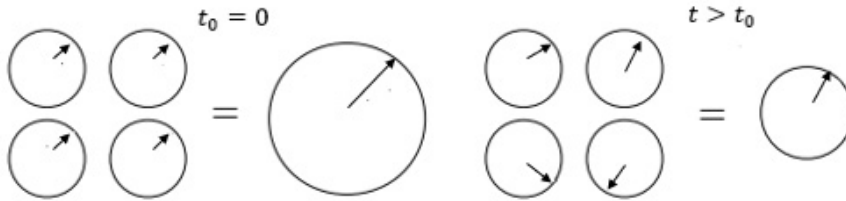
Imitowanie wektora magnetyzacji podłużnej powiązane jest z oddziaływaniem spinów z siecią atomów. Wibrujące atomy mogą generować zmienne pole magnetyczne o częstotliwości rezonansowej. Kwanty energii pola magnetycznego będą uaktywniały przejścia pomiędzy fazami energetycznymi i z upływem czasu spiny będą w sobie równoważne, w związku z tym przeważająca część obierze niższą energię, stąd wektor magnetyzacji podłużnej będzie mieścić się w pozycji wyjściowej. Przebieg imitowania wektora magnetyzacji podłużnej występuje przy stałej czasowej T_1 (rys. 1) [12].



Rysunek 1. Modyfikacja wektora magnetyzacji podłużnej po pobudzeniu impulsem 90° różne względem konta czasu relaksacji T_1 odmiennych tkanek. Wartość wektora dopasowana do stopnia spoczynku podczas równowagi termodynamicznej [opracowanie własne]

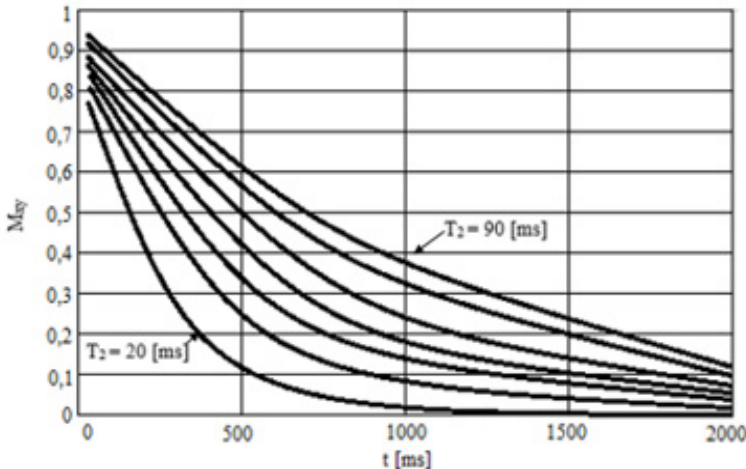
5.2. Zasady pomiaru czasu relaksacji T_2

Podczas pobudzenia każdy spin zaczyna wirować z tą samą fazą. Po wyłączeniu pobudzenia harmonia zanika, co skutkuje zanikiem składowej poprzecznej magnetyzacji, będącej źródłem sygnału MRI. Obydwa przebiegi zachodziłyby z równą stałą czasową, gdyby było to powiązane z takimi samymi wynikami, które przyczyniają się do powrotu stanu równowagi magnetyzacji podłużnej. Lecz jednak tak nie jest. Utrata składowej poprzecznej powiązana jest z różnorodnościami pola wewnątrz pojedynczych atomów. Należy ująć pola magnetyczne, utworzone poprzez elektrony krążące wokół jądra, które restrukturyzują wartość jednostajnego pola H_0 . Na to kumulują się nierówności w schemacie pola magnetycznego, na przykład w kościach. Wyniki te pokazują, że spiny w próbce różnią się prędkością kątową (rys. 2) [12].



Rysunek 2. Proces relaksacji poprzecznej ze stałą czasową T_2 [opracowanie własne]

Stała czasowa zaniknięcia składowej poprzecznej T_2 znana jest jako czas relaksacji poprzecznej (rys. 3) [12].



Rysunek 3. Modyfikacje wektora magnetyzacji poprzecznej po pobudzeniu dla tkanek o niejednorodnym czasie relaksacji T_2 . Wartość wektora jest znormalizowana do maksymalnej wartości [opracowanie własne]

5.3. Przykłady sekwencji pomiarowych T_1 i T_2

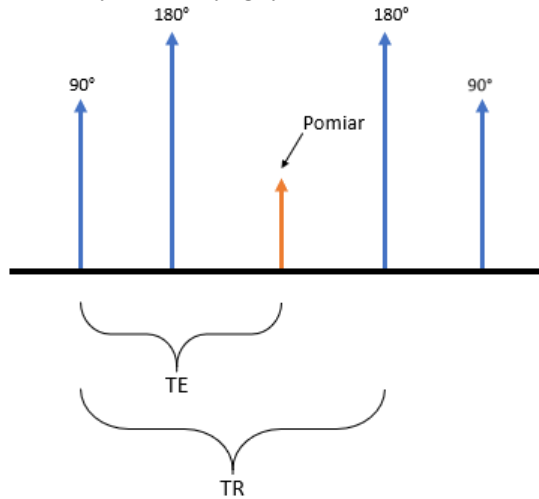
Sekwencja Spin Echo (SE), jest stosowana w badaniach układu mięśniowego, kostnego oraz w badaniach głowy. Uzyskujemy obrazy T_1 -zależne oraz T_2 -zależne, lecz T_2 -zależne potrzebują dłuższego czasu TR i otrzymanie ich trwałoby bardzo

długo. W sekwencji Spin Echo posługujemy się impulsem pobudzającym równym 90° i pulsem odwracającym równym 180° . Gdy czas pomiaru TE minie, uzyskuje się pomiar sygnału, a po minięciu czasu TR zostaje przekazany kolejny puls pobudzający (rys. 4) [4].

Równanie sygnału dla powtórzonej sekwencji echa spinowego w funkcji czasu powtórzenia, TR i czasu echa (TE) zdefiniowanego jako czas między impulsem 90° a maksymalną amplitudą w echu wynosi:

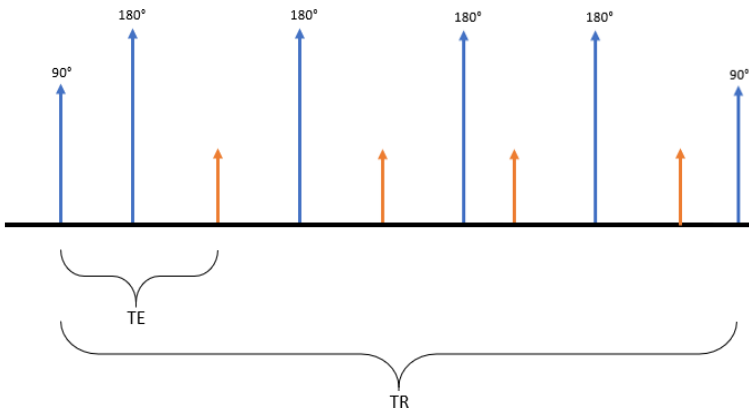
$$S = k \rho \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) e^{-\frac{TR}{T_2}} \quad (3)$$

To równanie jest ważne tylko wtedy, gdy $TR \gg TE$ [4].



Rysunek 4. Działanie sekwencji Spin Echo [opracowanie własne]

Sekwencja Fast Spin Echo (FSE) różni się od sekwencji Spin Echo (SE) tym, że w tym samym czasie TR wysłanych zostaje kilka impulsów 180° i pomiar sygnału następuje kilkakrotnie (rys. 5) [4].

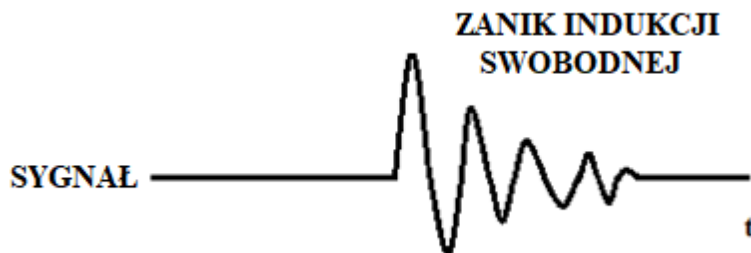


Rysunek 5. Działanie sekwencji Fast Spin Echo [opracowanie własne]

Sekwencja 90-FID

Zestaw impulsów RF przykładanych do próbki w celu wytworzenia określonej postaci sygnału NMR nazywany jest sekwencją impulsów. W sekwencji impulsów 90-FID namagnesowanie sieci jest obracane w dół do płaszczyzny $X'Y'$ za pomocą impulsu 90° . Wektor magnesowania sieci zaczyna procesować wokół osi $+Z$. Wielkość wektora również maleje z upływem czasu [13].

Diagram czasowy jest wieloosiowym wykresem pewnego aspektu sekwencji impulsów w funkcji czasu. Diagram czasowy dla sekwencji impulsów 90-FID zawiera wykres energii RF w funkcji czasu oraz wykres zależności sygnału od czasu (rys. 6) [13].



Rysunek 6. Diagram czasowy sekwencji 90-FID [opracowanie własne]

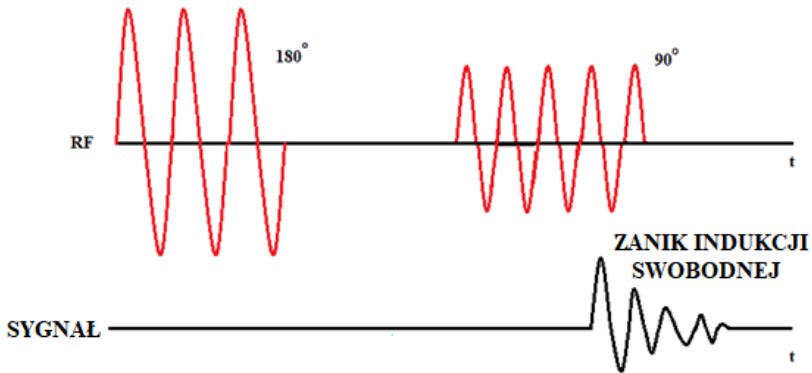
Kiedy ta sekwencja jest powtarzana, na przykład gdy potrzebna jest poprawa stosunku sygnału do szumu, amplituda sygnału po Transformacji Fouriera (S) będzie zależać od T_1 i czasu między powtórzeniami, zwanego czasem powtarzania (TR), sekwencja. W poniższym równaniu sygnału k jest stałą proporcjonalności i gęstością spinów w próbce [13].

$$S = k \rho \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) \quad (4)$$

gdzie: S – Transformata Fouriera, k – stała proporcjonalności i gęstości spinów w próbce, TR – czas repetycji, T_1 – relaksacja podłużna

Sekwencja odzyskiwania inwersji

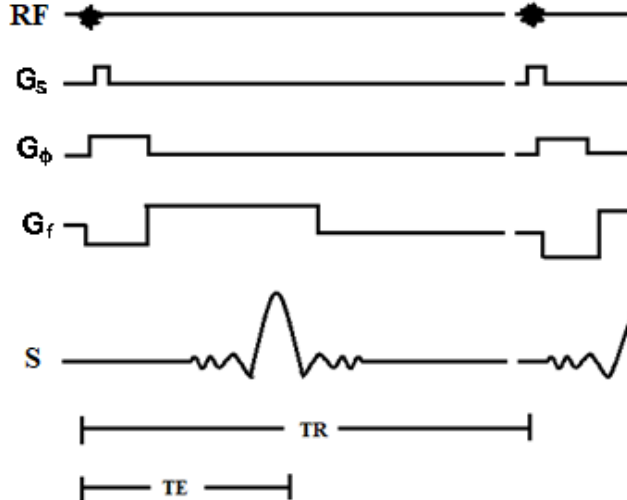
Sekwencja impulsów odzyskiwania inwersji może być również wykorzystana do rejestracji widma NMR. W tej sekwencji najpierw stosowany jest impuls 180° . Powoduje to obrócenie magnesowania siatki w dół do osi $-Z$. Magnetyzacja ulega relaksacji spinowo-sieciowej i powraca do swojej pozycji równowagi wzdłuż osi $+Z$. Zanim osiągnie równowagę, przykładany jest impuls 90° , który obraca magnetyzację wzdłuż płaszczyzny XY . W tym przykładzie impuls 90° jest stosowany zaraz po impulsie 180° . Gdy namagnesowanie pojawi się w płaszczyźnie XY , obraca się wokół osi Z i wygasa, dając FID [13]. Wykres czasowy pokazuje względne położenie dwóch impulsów częstotliwości radiowej i sygnału (rys. 7) [13].



Rysunek 7. Wykres czasowy ukazujący względne położenie impulsów częstotliwości radiowej i sygnału [opracowanie własne]

Obrazowanie gradientowe

Gdyby zastosować sekwencję obrazowania 90-FID (z ang. zanik indukcji swobodnej) przedstawioną powyżej, zarejestrowalibyśmy tylko połowę k-przestrzeni. Wytworzenie ekwiwalentu echa w środku okna akwizycji, gdy włączony jest gradient kodowania częstotliwości, dałoby nam zarówno lewą, jak i prawą połowę k-przestrzeni. Aby to osiągnąć, musi zostać włączony tak zwany gradient wind-up w kierunku kodowania częstotliwości (rys. 8) [13].



Rysunek 8. Zestawienie czasowe obrazowania metodą echa gradientowego [opracowanie własne]
 TR – czas repetycji, TE – czas echa, S – sygnał, G – gradient, RF – sygnał RF (pasmo częstotliwości wysyłanych przez cewkę nadawczą)

W tej sekwencji do obrazowanego obiektu przykładany jest selektywny impuls RF dla segmentu. Ten impuls RF zwykle wytwarza kąt obrotu między 0 a 90°, chociaż obrót 0° nie jest zbyt użyteczny, ponieważ nie wytwarza sygnału. Wraz z impulsem RF stosowany jest gradient wyboru wycinka [13].

Następnie stosowany jest gradient kodowania fazy. Gradient kodowania fazy zmienia się między Gm i -Gm w 128 lub 256 równych krokach, tak jak we wszystkich innych sekwencjach [13].

Gradient kodowania częstotliwości odgazowywania jest stosowany w tym samym czasie co gradient kodowania fazy, tak aby sprawić, że spiny będą w fazie w środku okresu pozyskiwania. Ten gradient jest ujemny w stosunku do gradientu kodowania częstotliwości włączonego podczas akwizycji sygnału. Echo jest wytwarzane, gdy gradient kodowania częstotliwości jest włączony, ponieważ gradient ten ponownie skupia fazowanie, które wystąpiło z gradientu odgazowującego. Za echo odpowiada odwrócenie gradientu. Aby nie mylić tego typu echa z echem wytwarzanym przez impuls 180° , echo to nazywa się echem gradientowym [13].

6. Badania

6.1. Przebieg badania

W badaniach wykorzystany został rezonans magnetyczny o polu 1,5 Tesla model Optima MR360 firmy General Electric Healthcare. Dodatkowo do wykonywania pomiarów z wykorzystaniem silnego pola magnetycznego wykorzystane zostały dedykowane cewki gradientowe. Analiza otrzymanych danych była wykonana za pomocą licencjonowanego pakietu MATLAB.

Badania przeprowadzono na nieutrwalonych przez formalinę fragmentach tkankowych. W pierwszym etapie została wyznaczona relaksacja podłużna i poprzeczna, co pozwoliło na charakterystykę badanej próbki. Podczas skanów wykorzystane zostały cewki gradientowe, które bezpośrednio wchodzą w skład stosowanego w praktyce układu pomiarowego. Na podstawie otrzymanego sygnału cyfrowego i rekonstrukcji obrazu, która powstaje dzięki zastosowaniu transformaty Fouriera, został otrzymany materiał do analizy. Kolejnym etapem była analiza danych, w której dokonana została dokładna ocena otrzymanych wyników, w celu wyznaczenia czasów relaksacji T_1 i T_2 w badanych próbkach. W kolejnym etapie, pod mikroskopem, oceniony został preparat histopatologiczny wykonany z przebadanego wycinka raka nerki. Wycinek zawiera komórki raka nerki oraz tkankę niezmienną nowotworowo. W ostatniej fazie eksperymentu zmiany widoczne w badaniu MRI zostały skorelowane z obrazem histopatologicznym w celu odnalezienia ewentualnych korelacji.

Podczas planowanych badań bazowano na zdobytej wiedzy i doświadczeniu w badaniach metodą rezonansu magnetycznego, jak również wyznaczaniu czasów relaksacji T_1 i T_2 we fragmentach tkankowych. Zwrócono uwagę na manewrowanie parametrami czasu echa (TE) i czasu repetycji (TR) oraz na starannym dobraniu wartości wyjściowych oraz kroku pomiarowego tak, aby uzyskać wiarygodne wyniki w jak najkorzystniejszym czasie. Kolejnym etapem była obróbka danych, w której została wykonana analiza statystyczna, oraz zostały wyznaczone czasy relaksacji T_1 , T_2 oraz mapy tych czasów w badanych wycinkach z raka nerki.

Ekspertyzy zostały przeprowadzone przy użyciu 1,5 Tesla rezonansu magnetycznego z wykorzystaniem cewek nadawczo-odbiorczych pracujących przy zadanej częstotliwości.

6.2. Metoda pomiaru

6 świeżo pobranych tkanek próbki raka nerki (rozmiar: $X = 10 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$, $Y = 10 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$, $Z = 10 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$; objętość w zakresie $1000 \text{ mm}^3 \pm 50 \text{ mm}^3$) pobrano od 6 pacjentów ze Szpitala Wojewódzkiego nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie. Badania na tkankach ludzkich uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego w Rzeszowie. Po otrzymaniu tkanki przechowywano ją przez 2 dni w 15 ml polipropylenowych, skalowanych probówkach stożkowych wyposażonych w zakrętkę (Kartell Labware, Mediolan, ITALY) w temperaturze 5°C w BIOBANKU UR.

Wszystkie procedury rezonansu magnetycznego wykonano na urządzeniu do rezonansu magnetycznego 1,5 Tesli Optima MR360 Advance firmy General Electric Healthcare (Milwaukee, Wisconsin, USA). Urządzenie działało pod wersją oprogramowania SV23.

Pobrano świeże próbki, bezpośrednio po chirurgicznym usunięciu guza, za pomocą magnesu o wysokiej rozdzielczości, w celu określenia czasów relaksacji T_1 i T_2 . Do akwizycji obrazu użyto 4-kanalowej cewki o małej elastycznej powierzchni.

W przypadku pomiarów T_1 wartości czasu powtarzania (TR) w zakresie 50-15000 ms z następującymi krokami (50, 100, 200, 300, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000, 10000 i 15000 ms) z czasem echa (TE) 3 ms. W oparciu o te wartości utworzono impulsowe szybkie echo spinowe (FSE) i wygenerowano obrazy MR dla każdej próbki. Protokół oprogramowania do określania czasu T_1 składał się z następujących kroków: Kalibracja, 3-płaszczyzna, Koronalny T_1 FSE (z różnymi ustawieniami czasu TR). Obrazy wykonano przy użyciu matrycy o wymiarach 320×224 , pola widzenia (FOV) $19 \text{ cm} \times 19 \text{ cm}$ i grubości warstwy 3,0 mm. Pomiaru powtórzono, SD wyniosło 5%.

Aby określić czas relaksacji T_2 , wykonano serie obrazów MRI o różnych czasach echa (TE). Obrazy MR uzyskano przy trzynastu różnych czasach echa (od 1 do 250 ms) z ustawieniem sekwencji: TR = 15000 ms, FOV $15 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$, rozmiar matrycy 320×224 , grubość wycinka 3,0 mm, szerokość pasma odbiornika 31,25 kHz, NEX = 3. Zwykle pobierano 1 warstwę wieńcową, aby pokryć całą tkankę przez środek. Całkowity czas skanowania w celu jednoczesnego pozyskania wszystkich obrazów ważonych T_2 wyniósł 2 godziny. Te parametry MR zastosowano dla wszystkich tkanek.

Użyto aplikacji pakietu oprogramowania VOLUME VIEWER na stacji roboczej AV4.6 (General Electric Healthcare) do pomiaru intensywności sygnału MR. Wartości czasu relaksacji T_1 i T_2 obliczono stosując nieliniowe korekty krzywych opisujących narastanie sygnału MR (dla T_1) i utratę sygnału (dla T_2).

7. Wyniki badań

7.1. Pomiary wartości T_1 i T_2 dla tkanek zdrowych i chorych nerki

Przy użyciu tych dwóch metod zaobserwowano różnice fizyko-chemiczne tkanki zdrowej i nowotworowej w diagnozie raka nerki. Poznanie tych różnic ma na celu lepsze zrozumienie procesów, które zachodzą w tkance nowotworowej, a co za tym idzie polepszenie diagnostyki przedoperacyjnej. Następnie tkanki, które zostały poddane badaniu oglądane były przez patologa pod mikroskopem i oceniany był typ nowotworu.

Wyniki pomiarów czasu relaksacji T_1 i T_2 dla obu typów tkanek przedstawiono w tabeli 1 i 2.

Tabela 1. Czasy relaksacji T_1 i T_2 6 tkanek raka nerki. Wszystkie wartości w milisekundach

Numery tkanek	T_1 (ms)		T_2 (ms)	
1	840	±22	67	±4
2	919	±54	74	±4
3	1043	±62	63	±4
4	864	±21	79	±4
5	773	±13	93	±4
6	874	±10	77	±4

Tabela 2. Czas relaksacji T_1 i T_2 6 tkanek raka nerki. Wszystkie wartości w milisekundach

Numery tkanek	T_1 (ms)		T_2 (ms)	
1	898	±2	69	±16
2	970	±34	70	±10
3	1200	±16	81	±11
4	980	±11	100	±12
5	790	±10	98	±5
6	950	±7	98	±14

7.2. Metoda doboru optymalnych wartości TR i TE dla kontrastu opartego na gęstości protonów w tkance

Technika ta używa bardzo długiego czasu między sygnałami RF (bardzo długi czas TR) i bardzo krótkiego opóźnienia między oknem wzbudzenia a oknem odczytu (krótki czas TE). Jest przydatne do anatomicznych skanów referencyjnych. Na rysunkach poniżej przedstawiona została metoda doboru optymalnych wartości TR i TE dla kontrastu opartego na gęstości protonów w tkance. TR z zakresu 1800-2000 ms i TE od 0 do 10 ms gwarantuje największy kontrast.

7.3. Metoda doboru optymalnych wartości TR i TE dla kontrastu T_2^* i T_2

Technika ta używa krótkiego czasu między sygnałami RF (długi czas TR) i długiego opóźnienia między oknem wzbudzenia a oknem odczytu (długi czas TE). Jest przydatna do anatomicznych skanów.

8. Metoda doboru optymalnych wartości dla kontrastu T1

Technika używa pośredniego czasu pomiędzy sygnałami RF (pośredni czas TR) i bardzo krótkiego czasu TE. Badanie przydatne do tworzenia kontrastu jako odniesienie anatomiczne.

9. Wnioski

MRI okazał się prawidłowym narzędziem do rozróżniania tkanki nowotworowej i zdrowej, jednakże liczba studiów jest ograniczona. Zastosowano kliniczny rezonans magnetyczny do pomiaru czasów relaksacji podłużnej spin-sieć (T_1) oraz poprzecznej spin-spin (T_2) w roztworze wodnym oraz tkankach nowotworu nerki. Badania zostały przeprowadzone w celu oceny możliwości monitorowania fotokonsumpcji tlenu przy użyciu klinicznego rezonansu magnetycznego o mocy pola 1.5 Tesli, wykorzystując rozpuszczony tlen jako endogeny środek kontrastowy MRI przed i po działaniu fotodynamicznym *in vitro*.

Badanie rezonansem magnetycznym dostarcza informacji o wielkościach czasów relaksacji wody i ich różnicach w tkance zdrowej i nowotworowej. Przy użyciu tych dwóch metod obserwujemy różnice fizykochemiczne tkanki zdrowej i nowotworowej w raku nerki.

Literatura

1. Domagała B., *Rezonans Magnetyczny*, <https://www.medonet.pl/zdrowie/zdrowie-dla-kazdego,rezonans-magnetyczny--rm--mri---na-czym-polega-to-badanie-,artykul,1721349.html>, 29.01.2021.
2. Nicolau C., Antunes N., Paño B., Sebastia C., *Imaging Characterization of Renal Masses. Medicina (Kaunas)*, 57(1), 2021, s. 51.
3. Wilson M.P., Patel D., Murad M.H., McInnes M.D.F., Katlariwala P., Low G., *Diagnostic Performance of MRI in the Detection of Renal Lipid-Poor Angiomyolipomas: A Systematic Review and Meta-Analysis. Radiology*, 296(3), 2020, s. 511-520.
4. Allgood E., Raman S.S., *Image Interpretation: Practical Triage of Benign from Malignant Renal Masses, Radiol Clin North Am.*, 58(5), 2020, s. 875-884.
5. Sweet D.E., Feldman M.K., Remer E.M., *Imaging of the acute scrotum: keys to a rapid diagnosis of acute scrotal disorders, Abdom Radiol (NY)*., 45(7), 2020, s. 2063-2081.
6. Pęczkowski P., *Podstawy fizyczne i historia obrazowania metodą rezonansu magnetycznego*, Warszawa, Wszelświat 2012.
7. Chu J.S., Wang Z.J., *Protocol Optimization for Renal Mass Detection and Characterization, Radiol Clin North Am.*, 58(5), 2020, s. 851-873.
8. Balthazar P., Joshi H., Heilbrun M.E., *Reporting on Renal Masses, Recommendations for Terminology, and Sample Templates, Radiol Clin North Am.*, 58(5), 2020, s. 925-933.
9. Grivas N., Thomas K., Drake T., Donaldson J., Neisius A., Petřík A., Ruhayel Y., Seitz C., Türk C., Skolarikos A., *Imaging modalities and treatment of paediatric upper tract urolithiasis: A systematic review and update on behalf of the EAU urolithiasis guidelines panel, J Pediatr Urol.*, 16(5), 2020, s. 612-624.
10. Lubner M.G., *Radiomics and Artificial Intelligence for Renal Mass Characterization, Radiol Clin North Am.*, 58(5), 2020, s. 995-1008.
11. Huang A.J., Lee V.S., Rusinek H., *MR imaging of renal function. European Radiology*, 17, 2007, s. 2780-2793.
12. Martirosian P., Klose U., Mader I., Schick F., *FAIR true-FISP perfusion imaging of the kidneys, Epub*, 51(2), 2004, s. 353-61.
13. Zulfiqar M., Ubilla C.V., Nicola R., Menias C.O., *Imaging of Renal Infections and Inflammatory Disease, Radiol Clin North Am.*, 58(5), 2020, s. 909-923.
14. Kocak B., Kus E.A., Yardimci A.H., Bektas C.T., Kilickesmez O., *Machine Learning in Radiomic Renal Mass Characterization: Fundamentals, Applications, Challenges, and Future Directions, AJR Am J Roentgenol.*, 215(4), 2020, s. 920-928.
15. Jynge P., Skjold A.M., Falkmer U., Andersson R.G.G., Seland J.G., Bruvold M., Blomlie V., Eidsaunet W., Karlsson J.O.G., *Contrast Agent for Imaging and Protection of Viable Tissue, Contrast Media Mol Imaging*, 2020, 2020, 3262835.

Contrast Enhanced MRI w tkance nerki in vitro

Streszczenie

Metoda Contrast Enhanced MRI to obrazowanie rezonansem magnetycznym ze wzmocnionym kontrastem. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI) jest nieinwazyjną techniką obrazowania, stosowaną w radiologii do tworzenia obrazów anatomii i fizjologicznych procesów organizmu.

Rola MRI w ocenie uszkodzeń nerek bezustannie rośnie. Rezonans magnetyczny może być stosowany w sytuacji, gdy czynności nerek są nierozwinięte, podczas ciężkiej alergii na kontrast lub w momencie

narażenia na promieniowanie, np. kobiet w ciąży. Podejmowane są próby użycia MRI do obrazowania czynności nerek, w tym współczynnika perfuzji przesączania kłębuszkowego, jak i wewnątrznerkowego wskaźnika tlenu.

Celem pracy było zastosowanie metody obrazowania MRI do oceny wycinków tkankowych *in vitro* raka nerki, na podstawie zmiany stężenia wody w tkance zdrowej i nowotworowej.

W badaniach wykorzystany został rezonans magnetyczny o polu 1,5 Tesla model Optima MR360 firmy General Electric Healthcare. Dodatkowo do wykonywania pomiarów w wykorzystaniem silnego pola magnetycznego wykorzystane zostały dedykowane cewki gradientowe. Analiza otrzymanych danych była wykonana za pomocą licencjonowanego pakietu MATLAB.

Badanie zostało przeprowadzone na fragmentach tkankowych nieutrwalonych przez formalinę. W pierwszym etapie została wyznaczona relaksacja podłużna (spin-sieć) i poprzeczna (spin-spin), dzięki której powstała charakterystyka badanej próbki. Po skanach, w których zostały użyte cewki gradientowe, na podstawie otrzymanego sygnału cyfrowego rekonstrukcji obrazu został otrzymany materiał do analizy. W kolejnym etapie przyjrano się danym, w których dokładnie oceniono otrzymane wyniki, by móc wyznaczyć czasy relaksacji T_1 i T_2 w badanych próbkach. Następnie, pod mikroskopem, został oceniony preparat histopatologiczny wykonany ze zbadanego wycinka raka nerki. Wycinek ma w sobie komórki raka nerki oraz tkankę niezmienną nowotworowo. W ostatnim etapie eksperymentu zmiany widoczne w badaniu MRI zostały zespolone z obrazem histopatologicznym, by odnaleźć ewentualne korelacje.

W celu określenia czasów relaksacji T_1 i T_2 , za pomocą magnesu o wysokiej rozdzielczości, zostało pobrane 6 tkanek raka nerki, bezpośrednio po chirurgicznym usunięciu guza. Podczas pomiarów T_1 tworzono impulsowe szybkie echo spinowe (FSE) i wygenerowano obrazy MR dla każdej z próbek. Podczas pomiarów T_2 wykonano serię obrazów MRI o trzynastu różnych czasach echa (TE) o odpowiednich ustawieniach sekwencji. Podczas pomiarów intensywności sygnału MR użyto oprogramowania VOLUME VIEWER. Słowa kluczowe: Contrast Enhanced MRI, MRI, relaksacja T_1 , relaksacja T_2

Contrast Enhanced MRI in kidney tissue *in vitro*

Abstract

The Contrast Enhanced MRI method is magnetic resonance imaging with enhanced contrast. MRI is a non-invasive imaging technique used in radiology to create images of the anatomy and physiological processes of the body.

The role of MRI in the assessment of kidney damage is constantly growing. Magnetic resonance imaging can be used when kidney function is underdeveloped, during severe allergy to contrast or at the time of exposure to radiation, e.g. pregnant women. Attempts are being made to use MRI for imaging renal function, including the glomerular filtration perfusion rate, such as and intrarenal oxygen index.

The aim of the study was to use the MRI imaging method to evaluate *in vitro* tissue specimens of kidney cancer, based on changes in water concentration in healthy and neoplastic tissue.

The research used 1.5 Tesla magnetic resonance model Optima MR360 by General Electric Healthcare. Additionally, for taking measurements with the use of a strong magnetic field, dedicated gradient coils were used. The analysis of the obtained data was performed using the licensed MATLAB package.

The study was conducted on tissue fragments not fixed by formalin. In the first stage, the longitudinal (spin-lattice) and transverse (spin-spin) relaxation was determined, thanks to which the characteristics of the tested sample were created. After the scans in which the gradient coils were used, the material for analysis was obtained on the basis of the obtained digital image reconstruction signal. In the next stage, the data in which the obtained results were carefully assessed in order to be able to determine the relaxation times T_1 and T_2 in the tested samples was examined. Then, under a microscope, a histopathological preparation made of the examined section of the kidney cancer was assessed. The excerpt contains kidney cancer cells and non-neoplastic tissue. In the last stage of the experiment, the changes visible in the MRI were fused with the histopathological image to find possible correlations.

In order to determine the relaxation times T_1 and T_2 , 6 kidney cancer tissues were harvested by means of a high resolution magnet, immediately after the surgical removal of the tumor. During the T_1 measurements, a pulsed fast spin echo (FSE) was created and MR images were generated for each of the samples. During the T_2 measurements, a series of MRI images with thirteen different echo times (TEs) with appropriate sequence settings were taken. The software VOLUME VIEWER was used during the MR signal intensity measurements.

Keywords: Contrast Enhanced MRI, MRI, relaxation T_1 , relaxation T_2

Diagnostyka raka nerki za pomocą czasów relaksacji rezonansu magnetycznego i metody fotodynamicznej

1. Wstęp

Przedstawiamy dotychczas zgromadzone doświadczenia w ocenie rezonansu magnetycznego nerki w stanie prawidłowym i uznanym za patologiczny klinicznie. W tym przypadku nowotworu w analizie i diagnozie chorób nerek konieczne jest zwięzłe i szybkie różnicowanie patologii [1-3]. Coraz częściej diagnozowanie tego rodzaju jest możliwe przy wykorzystaniu obrazowania urologicznego. Większość z napotykanych w nerkach zmian stanowią guzy torbielowate, które wymagają diagnozowania. Często pojedyncza technika obrazowania nie jest w stanie z pewnością określić torbielowości masy nerkowej. Właściwy dobór dodatkowej metody obrazowania często jest skuteczny w ustalaniu torbielowatych cech łagodnej zmiany.

2. Diagnostyka raka nerki

Obrazy magnetycznego rezonansu (MRI) ważone koronalnym czasem inwersji okazały się najbardziej użyteczną sekwencją pulsacyjną do oceny postępu raka nerki [4, 5]. Główny problem w obrazowaniu nerek wynika z degradacji obrazu z powodu ruchu oddechowego przenoszonego na narządy górnej części jamy brzusznej.

Drugim poważnym problemem w MRI jest brak zrozumienia potencjału sprzętu. W przeciwieństwie do konwencjonalnej radiografii i tomografii komputerowej, w których zachowanie wiązki promieniowania rentgenowskiego jest rozumiane w odniesieniu do tworzenia obrazu, w MRI wykorzystuje się nowe parametry do generowania obrazów. Jak stwierdzono wcześniej, intensywność sygnału MR wynika ze stężenia wodoru, czasów relaksacji T1 i T2 tkanki oraz przepływu protonów przez obrazowaną tkankę [6-8]. Na obrazach echa spinowego z wagą T1 proste torbiele nerkowe wyglądają jak okrągłe, jednorodne obszary o niskim sygnale, z gładkimi krawędziami zewnętrznymi i wyraźną granicą z pozostałym normalnym mięszem nerki lub sąsiadującymi torbielami. Wyniki te sugerują, że rezonans magnetyczny jest przydatny w różnicowaniu między torbielami prostymi, torbielami krwotocznymi i nowotworami, gdy tomografia komputerowa i ultrasonografia dają nieokreślone wyniki [9].

Po kilku latach stosowania obrazowania klinicznego, rezonans magnetyczny można teraz mierzyć w porównaniu z innymi technikami obrazowania radiologicznego przekrojowego w nerkach. Jego lepszej czułości w wykazywaniu chorób ośrodkowego układu nerwowego i serca nie dorównuje jeszcze podobny sukces w wykrywaniu chorób brzucha. Jednak MR ewoluuje dalej i oczekuje się dalszych ulepszeń sprzętu, oprogramowania i wyboru sekwencji impulsów [10]. Obrazy MR nerki opisywano w przypadku różnych chorób tego organu. Obrazy były skanami protonowymi, zwykle

¹ Zakład Patomorfologii i Katedra Nauk Morfologicznych, Uniwersytet Rzeszowski.

² Zakład Biochemii i Chemii Ogólnej, Kolegium Nauk Medycznych, Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Uniwersytet Rzeszowski.

³ Zakład Fotomedycyny i Chemii Fizycznej, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski.

wykonanymi za pomocą sekwencji impulsów, które dostarczyły różnych obrazów ważonych T1 i T2. Można zdiagnozować choroby ogniskowe: cysty zwykle można odróżnić od guzów, a w tych pierwszych można wykryć krwotoki różnego stopnia [10, 11].

Coraz częstsze jest przypadkowe rozpoznanie guzów nerek. Obrazowanie ma ogromne znaczenie dla scharakteryzowania tych guzów. Ultrasonografia umożliwia jedynie rozpoznanie guzów w organie nerki. Złotym standardem jest tomografia komputerowa, która musi spełniać precyzyjne kryteria jakościowe. MRI dostarcza o wiele więcej informacji w wybranych przypadkach niż ultrasonografia.

Główną patologią jest rak nerki, ale łagodne guzy można również podejrzewać w przypadku guzów o średnicy mniejszej niż 4 cm [12]. Obrazowanie naczyń guza może być przydatne w identyfikacji angiogennych naczyń krwionośnych, a także być potencjalnym markerem predykcyjnym odpowiedzi na leczenie antyangiogenne [13]. W ostatnim dziesięcioleciu nieinwazyjne techniki obrazowania tj komputerowa tomografia i rezonans magnetyczny zastąpiły angiografię cewnikową w ocenie tętnic nerkowych. Początkowo nefrektomię częściową wykonywano z otwartego dostępu chirurgicznego; od niedawna, z coraz większą częstotliwością, w wybranych przypadkach, zastosowano podejście laparoskopowe. W celu szybkiej diagnozy i odpowiedniego leczenia tych powikłań radiolodzy muszą znać prawidłowe i nieprawidłowe cechy nerki pooperacyjnej w tomografii komputerowej i rezonansie magnetycznym [14, 15]. Wraz z opracowaniem nowych, małoinwazyjnych metod leczenia małych guzów nerek, takich jak częściowa nefrektomia laparoskopowa, ablacja częstotliwością radiową i krioabłacja, znacznie wzrosła zależność od technologii obrazowania, zarówno śródoperacyjnych, jak i pooperacyjnych. Tomografia, rezonans magnetyczny i ultrasonografia okazały się niezwykle przydatne w tym zakresie, ale ich użyteczność wymaga dokładnego zrozumienia ograniczeń każdej z metod, właściwego zastosowania śródoperacyjnego i oczekiwanych wyników pooperacyjnych [16]. Celem tego badania jest określenie wykonalności, bezpieczeństwa i pośrednich wyników leczenia przezskórnej krioabłacji raka nerkowokomórkowego za pomocą otwartego poziomego rezonansu magnetycznego [17]. W trakcie procedury prowadzono podwójne cykle zamrażania i rozmrażania. Po udanej krioabłacji pacjenci byli regularnie obserwowani w celu oceny klinicznego wyniku leczenia [18].

U większości pacjentów nadal obserwuje się skuteczność w okresie przejściowym; jednak kilku doświadcza niepełnej abłacji, co grozi niepowodzeniem leczenia. Idealnych kandydatów do tej procedury nadal trzeba określić w dłuższej obserwacji i uważnej obserwacji [19].

Tomografia komputerowa ze wzmocnieniem kontrastowym materiałem pozostaje metodą z wyboru w celu wykrycia, diagnozy określenia stopnia zaawansowania i monitorowania chłoniaka nerek. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego jest szczególnie przydatne u pacjentów, u których dożylnie podanie środka kontrastowego zawierającego jod jest przeciwwskazane. Ultrasonografia, choć bardzo cenna w diagnostyce chłoniaka jądra lub najądrza, jest mniej czuła niż tomografia komputerowa i MR w wykrywaniu chłoniaka nerkowego. Typowe wyniki obrazowania chłoniaka nerki obejmują liczne słabo wzmocnione lub hipoechogeniczne masy, guzy zaotrzewnowe bezpośrednio naciekające nerki, obustronne powiększenie nerek i okołonerkowe masy tkanek miękkich. Torbielowate zmiany i guzy głównie zajmujące zatokę nerkową i układ

zbiorczy są rzadkie. O ile zmiany w nerkach nie ujawniają się w przebiegu rozległego chłoniaka, wskazana jest biopsja przezskórna w celu odróżnienia chłoniaka od przerzutów, hipowaskularnego raka nerkowokomórkowego, raka nabłonkowego lub infekcji atypowej, przy czym rutynowo prowadzi się badanie USG. Obecne techniki immunohistochemiczne pozwalają na dokładną diagnostykę i charakterystykę chłoniaka nerkowego. Radiolodzy powinni być zaznajomieni zarówno z typowymi, jak i nietypowymi objawami chłoniaka nerek i powinni zalecić wykonanie biopsji przezskórnej pod kontrolą obrazowania w celu potwierdzenia diagnostycznego, aby uniknąć niepotrzebnej nefrektomii [20]. Celem badania była ocena roli MRI w wykazaniu dokładnego charakteru guzów brodawkowatych nerki (P RCC) i możliwości jego zastosowania w selekcji pacjentów do częściowej operacji. Dziewięćdziesiąt siedem guzów mniejszych lub równych 3 cm [21]. Wszystkie raki jasnokomórkowe były hiperintensywne i niejednorodne w sekwencji ważonej T2. Wzmocnienie było mniejsze i opóźnione w typie brodawkowatym w porównaniu z typem jasnokomórkowym. MRI jest wystarczająco dokładne, aby przewidzieć „histologiczny” charakter raka brodawkowego nerki. Dodatkowym argumentem jest propozycja, aby guz można usunąć metodą częściowej operacji.

W przypadku zastosowań związanych z rakiem dokładna kontrola przestrzenna dostarczanej dawki termicznej jest obowiązkowa. Ciągłe zniszczenie docelowej objętości musi być osiągnięte w jak najkrótszym czasie, oszczędzając w jak największym stopniu sąsiednie zdrowe tkanki, a zwłaszcza gdy niektóre sąsiednie obszary są krytyczne [22]. Istnieje wiele metod obrazowania stosowanych w diagnostyce raka nerkowokomórkowego, najczęstszego raka nerki, który stanowi około 2-3% nowotworów złośliwych u dorosłych. Bardzo ważne jest wczesne wykrycie tego guza przy zastosowaniu prawidłowego podejścia diagnostycznego przy użyciu różnego obrazowania przekrojowego, podobnie jak wyniki kliniczne i laboratoryjne. Znajomość spektrum wyników badań obrazowych raka nerkowokomórkowego umożliwi klinicyście rozważenie odpowiedniego leczenia pacjentów i wyeliminowanie niepotrzebnych dalszych badań obrazowych [23]. Rzadko zgłaszano jedyne włókniste guzy nerek (SFT) [24]. Przezskórna kriobłację guzów nerek sąsiadujących z jelitem pod kontrolą MRI można bezpiecznie i skutecznie wykonać przy użyciu zewnętrznego ucisku dłonią w celu przemieszczenia pętli jelitowych [25].

Obrazowanie zależne od dyfuzji (D_w) jest od wielu lat narzędziem diagnostycznym w neuroradiologii, ale dopiero od końca lat 90. XX wieku, wraz z wprowadzeniem obrazowania echoplanarnego (EPI) i wykorzystaniem sekwencji zdolnych do wykonywania dyfuzji badania podczas pojedynczego wstrzymania oddechu, znalazły zastosowania diagnostyczne na poziomie brzucha [26-28]. Rejestracja obrazów MRI i micro-PET o wysokiej rozdzielczości łączy anatomiczne i funkcjonalne informacje o guzach i stanowi przydatne narzędzie do oceny terapii fotodynamicznej [29].

Funkcjonalne obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego nerek wykorzystuje niskocząsteczkowe środki kontrastowe. Czynniki te są markerami filtracji kłębuszkowej i nie są ani wydzielane, ani ponownie wchłaniane przez kanaliki, ale są filtrowane w kłębuszkach kłębuszkowych. Środki kontrastowe o niskiej masie cząsteczkowej dostarczają ograniczonych informacji funkcjonalnych. Opracowywana jest nowa generacja makromolekularnych magnetycznych środków kontrastowych do angiografii

MR. Środki te mogą dostarczać dodatkowych informacji dotyczących czynności nerek, których nie dostarczają leki o niskiej masie cząsteczkowej [30]. Udokumentowano różne specyficzne zastosowania makromolekularnych środków kontrastowych. Wydaje się, że albumina Gd wykrywa źródło białkomoczu i lokalizuje miejsce nawracającego białkomoczu po przeszczepie. Wychwył dendrymeru Gd odzwierciedla uszkodzenie proksymalnego prostego kanalika w zewnętrznym rdzeniu. Środki USPIO wykazują miejsca zmian zapalnych w nerkach. Makrocząsteczkowe środki kontrastowe do MR mogą odgrywać rolę w ocenie czynnościowych chorób nerek, chociaż nie są jeszcze szeroko stosowane w praktyce klinicznej [30]. Interpretacja wyników badań radiologicznych w guzach nerek leczonych metodami małoinwazyjnymi, takimi jak abłacja częstotliwością radiową, ma kluczowe znaczenie dla oceny adekwatności leczenia. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego jest powszechnie stosowane u pacjentów z niewydolnością nerek lub alergią na kontrast. Ponieważ doświadczenie MRI z RFA nerek jest ograniczone, przeanalizowaliśmy nasze doświadczenie i przedstawiliśmy wyjątkowe cechy MRI guzów nerek leczonych RFA [31]. Radiolog i urolog dokonali retrospektywnej oceny wszystkich skanów MRI, aby zidentyfikować charakterystyczne zmiany po RFA. Charakterystyka MRI skutecznie usuniętych guzów nerek obejmuje brak wzmocnienia, minimalne zmniejszenie rozmiaru w czasie oraz wysokie i niskie natężenie sygnału odpowiednio w obrazowaniu T1-zależnym i T2-zależnym. Znajomość tych wyników może pomóc radiologom i urologom w prawidłowej ocenie skuteczności RFA w uszkodzeniach nerek [31]. Wzmocnienie obręczy obwodowej jest częstym objawem w MR bezpośrednio po laparoskopowej krioabłacji nerek. Wzmocnienie obręczy ze wzrostem rozmiaru zmiany lub wzmocnieniem guzkowym jest bardziej istotne niż samo wzmocnienie obręczy. Potrzebnych jest więcej danych, aby zrozumieć postępowanie zmian w nerkach po krioabłacji [32]. Autorzy doszli do wniosku, że obrazy MR zależne od T1 w jednostce MR w środkowym polu są bardziej czułe niż obrazy ważone T2 w identyfikacji małych guzów nerek. MRI jest mniej dokładny w ocenie tych zmian niż tomografia i ultrasonografia. W szczególności, ponieważ małe zmiany w nerkach mogą zostać błędnie zdiagnozowane jako proste torbiele, zaleca się zastosowanie innych metod obrazowania – np. USG i TK – w przypadku pierwszej identyfikacji torbieli nerki na obrazach MR. USG ujawniło utratę prawidłowej architektury miąższowej z amputacją kompleksu echa centralnego z powodu masy echogenicznej. CT ujawniło poszerzenie miąższu nerki i zajęty odcinek miąższu, który został zastąpiony masą guza o niejednorodnej gęstości i minimalnym wzmocnieniu. MRI oznaczało zakrzep żyły nerkowej. RAG ujawniło, oprócz drobnych neowaskularyzacji z rumieńcem guza, hipowaskularyzację w zajętej obszarze. Oprócz tych funkcji uważamy, że w szczególności RP, USG, TK i RAG są przydatnymi narzędziami dla pacjentów z niewydolnością nerek [36, 37]. Porównawcze oznaczenie T1 z wielopunktowym odzyskiem inwersji i techniką echa spinowego przeprowadzono na fantomach zawierających roztwory Gd-DTPA o różnych wartościach T1 [38]. T1 i T2 nerek u 5 zdrowych ochotników i 27 pacjentów z guzami nerek oceniano przed operacją za pomocą aparatu rezonansu magnetycznego z elektromagnesem oporowym 0,1 T, a T1 i T2 guzów nerek porównano z wynikami patologicznymi: (i) T1 i T2 prawidłowego rdzenia nerkowego były dłuższe niż normalnej kory nerkowej i mięśnia lędźwiowego;

(ii) zarówno T1, jak i T2 raka miednicy nerkowej (RPC) były krótsze niż raka nerkowo-komórkowego [39].

W niniejszej analizie zbadano gatunek gadolinu obecny w nerce szczura po dożylnym podaniu środka kontrastowego do rezonansu magnetycznego na bazie gadolinu (Optimark™, zastrzyk Gadowersetamidu) szczurowi. Główne gatunki gadolinu w supernatancie ekstraktów tkanki nerek szczura określono metodą chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z optyczną spektrometrią emisyjną w plazmie indukcyjnie sprzężonej w trybie online (HPLC-ICP-OES) [40-42]. Potencjał zastosowania szybkiego rezonansu magnetycznego (MR) w połączeniu z deoksygenacją krwi wywołaną bezdechem do nieinwazyjnego monitorowania względnej perfuzji w jamie brzusznej szczura badano na dwóch modelach eksperymentalnych: ogniskowego niedokrwienia nerek wywołanego glicerolem i przeszczepionego guza wątroby [42]. Nowotwory nerek, w tym gruczolak kory nerkowej, rak nerkowokomórkowy (hiper-nephroma), oncocytoma, angiomyolipoma (hamartoma), włókniak rdzeniasty, guz aparatu przykłębuszkowego, nerczak zarodkowy (guz Wilmsa), nefroma mezoblastyczna, blastema nerkowa, mięsak i przerzuty wtórne. Omówiono zespoły stwardnienia guzowatego, choroby von Hippel-Lindau i nabytej [43-45]. Połączenie objętości skrzepliny guza z entropią i subiektywnym ogólnym wrażeniem inwazji ściany IVC zapewniło najwyższą dokładność rozpoznania. Połączenie obrazowania ADC i T1 pozwala przewidzieć wzmocnienie guzów Wilmsa oraz wiarygodnie identyfikuje i mierzy martwiczą tkankę bez gadolinu. Proponowana metoda może potencjalnie zmniejszyć koszty i obciążenie pacjentów z guzem Wilmsa, którzy są poddawani podłużnemu obrazowaniu kontrolnemu, ponieważ nie stosuje się środków kontrastowych [46]. W porównaniu z nerkową beznabłonkową AML, martwica lub torbielowate zwyrodnienie i krwotok z minimalną zawartością tłuszczu są charakterystycznymi objawami EAML w badaniu MRI [47]. Ocena ilościowa może być przydatna w różnicowaniu niektórych podtypów zmian łagodnych i złośliwych [48]. Celem niniejszego badania była ocena niedawno wprowadzonej techniki swobodnego oddychania, dynamicznego obrazowania rezonansu magnetycznego (MRI) ze wzmocnieniem kontrastowym, wykorzystującej połączenie radialnego pobierania próbek w przestrzeni k, obrazowania równoległego i wykrywania skompresowanego. Technika ta pozwala na retrospektywną rekonstrukcję 2 zestawów obrazów z tłumieniem ruchu z tej samej akwizycji: jednego o niższej rozdzielczości czasowej, ale poprawionej jakości obrazu do subiektywnej analizy obrazu, i jednego o wysokiej rozdzielczości czasowej do ilościowej analizy perfuzji [50, 51]. MRI znakowania spinów tętnicznych (ASL) pozwala na ilościowe określenie perfuzji tkanki bez podawania egzogennych środków kontrastowych. Nieinwazyjne monitorowanie mikrokrążenia tkankowego może przynieść korzyści pacjentom z zaburzeniami czynności nerek lub innymi przeciwwskazaniami do stosowania środków kontrastowych zawierających gadolin. Jak dotąd tylko nieliczne badania dotyczyły czułości, swoistości i wiarygodności technik ASL do oceny perfuzji nerek. Ponadto, niewiele wiadomo o wzajemnym oddziaływaniu między markerami perfuzji ASL i parametrami czynnościowej filtracji nerkowej. W artykule redakcyjnym omawiamy główne kwestie techniczne związane z ilościową oceną perfuzji nerek za pomocą ASL, a w szczególności najnowsze wyniki u pacjentów z chorobami nerek. Chociaż do tej pory klasyfikacja guzów litych nerek była przepro-

wadzana za pomocą biopsji przezskórnej, zespoły badawcze wykazały potencjalne zainteresowanie obrazowaniem w celu scharakteryzowania nieinwazyjnie różnych podtypów guzów nerek, w szczególności za pomocą obrazowania wieloparametrowego rezonansu magnetycznego (MR). Łącząc wszystkie cechy obrazowania MR kolejno opisywane w literaturze i stosując praktyczny algorytm oparty na odczytywaniu obrazów MR krok po kroku, czytelnicy są teraz w stanie zidentyfikować kilka profili obrazowania, które wydawały się być specyficzne dla każdego podtypu guza nerki. Chociaż wymagana jest obszerna, prospektywna walidacja, aby zweryfikować te wyniki w warunkach klinicznych, ten nowy paradygmat obrazowania może pomóc w przezwycięzeniu tradycyjnych ograniczeń obrazowania przy charakteryzowaniu guzów nerek ze względu na pokrywające się cechy morfologiczne. Te dane obrazowe byłyby pomocne w lepszej identyfikacji guzów nerek wymagających operacji, bez dalszych badań inwazyjnych, takich jak biopsje, skąd można zaproponować inne opcje (np. ablację przezskórną lub aktywny nadzór) [51].

Literatura

1. Cronan J.J., Zeman R.K., *Renal mass imaging: the internist's role*, Am J Med., 81(6), 1986, s. 1026-32.
2. Magnani F., Savoca C., Malfa P., Beritelli F., Motta M., Loreto C., *Magnetic resonance imaging in the study of renal cell carcinoma*, Rays., 11(3), 1986, s. 81-92.
3. Karstaedt N., McCullough D.L., Wolfman N.T., Dyer R.B., *Magnetic resonance imaging of the renal mass*, J Urol., 136(3), 1986, s. 566-570.
4. Brody A.S., Gooding C.A., *Magnetic resonance imaging*, Pediatr Rev., 8(3), 1986, s. 87-92.
5. Kangaroo H., Dietrich R.B., Ehrlich R.M., Boechar M.I., Feig S.A., *Magnetic resonance imaging of Wilms tumor*, Urology, 28(3), 1986, s. 203-207.
6. LiPuma J.P., Bryan P.J., Butler H.E., Resnick M.I., *Magnetic resonance imaging of the genitourinary tract*, Urol Clin North Am., 13(3), 1986, s. 531-550.
7. Brands W., Wetzel E., Diehm T., Gai H., Arnold D., *Bildgebende Verfahren und Verlaufskontrollen kinderchirurgischer Erkrankungen [Imaging procedures and follow-up in pediatric surgical diseases]*, Monatsschr Kinderheilkd., 134(6), 1986, s. 360-364.
8. Ramchandani P., Soulen R.L., Schnall R.I., Seidmon E.J., Friedman A.C., Radecki P.D., Caroline D.F., *Impact of magnetic resonance on staging of renal carcinoma*, Urology, 27(6), 1986, s. 564-568.
9. Hilpert P.L., Friedman A.C., Radecki P.D., Caroline D.F., Fishman E.K., Meziene M.A., Mitchell D.G., Kressel H.Y., *MRI of hemorrhagic renal cysts in polycystic kidney disease*, AJR Am J Roentgenol., 146(6), 1986, s. 1167-1172.
10. Papanicolaou N., Hahn P.F., Edelman R.R., Newhouse J.H., Pfister R.C., Stark D.D., Yoder I.C., Brady T.J., *Magnetic resonance imaging of the kidney*, Urol Radiol., 8(3), 1986, s. 139-150.
11. Newhouse J.H., Markisz J.A., Kazam E., *Magnetic resonance imaging of the kidneys*, Cardiovasc Intervent Radiol., 8(5-6), 1986, s. 351-366.
12. Raatschen H.J., Fu Y., Shames D.M., Wendland M.F., Brasch R.C., *Magnetic resonance imaging enhancement of normal tissues and tumors using macromolecular Gd-based cascade polymer contrast agents: preclinical evaluations*, Invest Radiol., 41(12), 2006, s. 860-867.
13. Descotes J.L., Doublet J.D., *Apport de l'imagerie et des biopsies dans le diagnostic des masses solides du rein [Renal imaging and biopsy for diagnosis of renal masses]*, Ann Urol (Paris), 40 (3), 2006, s. 86-90.

14. Geninatti Crich S., Bussolati B., Tei L., Grange C., Esposito G., Lanzardo S., Camussi G., Aime S., *Magnetic resonance visualization of tumor angiogenesis by targeting neural cell adhesion molecules with the highly sensitive gadolinium-loaded apoferritin probe*, *Cancer Res.*, 66(18), 2006, s. 9196-9201.
15. Glockner J.F., Vrtiska T.J., *Renal MR and CT angiography: current concepts*, *Abdom Imaging*, 32(3), 2007, s. 407-420.
16. Israel G.M., Hecht E., Bosniak M.A., *CT and MR imaging of complications of partial nephrectomy*, *Radiographics*, 26(5), 2006, s. 1419-1429.
17. Roy C., Jeantroux J., Tétékpor S., Lindner V., *Tumeurs du rein [Renal tumors]*, *J Radiol.*, 87(9), 2006, s. 1025-1054.
18. Anderson J.K., Shingleton W.B., Cadeddu J.A., *Imaging associated with percutaneous and intraoperative management of renal tumors*, *Urol Clin North Am.*, 33(3), 2006, s. 339-352.
19. Miki K., Shimomura T., Yamada H., Kishimoto K., Ohishi Y., Harada J., Egawa S., *Percutaneous cryoablation of renal cell carcinoma guided by horizontal open magnetic resonance imaging*, *Int J Urol.*, 13(7), 2006, s. 880-884.
20. Sheth S., Ali S., Fishman E., *Imaging of renal lymphoma: patterns of disease with pathologic correlation*, *Radiographics*, 26(4), 2006, s. 1151-1168.
21. Roy C., Sauer B., Lindner V., Lang H., Saussine C., Jacqmin D., *MR Imaging of papillary renal neoplasms: potential application for characterization of small renal masses*, *Eur Radiol.*, 17(1), 2007, s. 193-200.
22. Salomir R., Delemazure A.S., Palussière J., Rouvière O., Cotton F., Chapelon J.Y., *Image-based control of the magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound thermoablation*, *Top Magn Reson Imaging*, 17(3), 2006, s. 139-151.
23. Kim J., *Imaging findings of renal cell carcinoma*, *Expert Rev Anticancer Ther.*, 6(6), 2006, s. 895-904.
24. Fine S.W., McCarthy D.M., Chan T.Y., Epstein J.I., Argani P., *Malignant solitary fibrous tumor of the kidney: report of a case and comprehensive review of the literature*, *Arch Pathol Lab Med.*, 130(6), 2006, s. 857-861.
25. Tuncali K., Morrison P.R., Tatli S., Silverman S.G., *MRI-guided percutaneous cryoablation of renal tumors: use of external manual displacement of adjacent bowel loops*, *Eur J Radiol.*, 59(2), 2006, s. 198-202.
26. Colagrande S., Carbone S.F., Carusi L.M., Cova M., Villari N., *Magnetic resonance diffusion-weighted imaging: extraneurological applications*, *Radiol Med.*, 111(3), 2006, s. 392-419.
27. Hasni Bouraoui I., Jemni H., Arifa N., Chebil M., Ben Sorba N., Tlili K., *Aspect en imagerie du kyste hydatique du rein. A propos de 41 cas [Imaging of renal hydatid cyst based on a series of 41 cases]*, *Prog Urol.*, 16(2), 2006, s. 139-144.
28. de Bazelaire C., Rofsky N.M., Duhamel G., Zhang J., Michaelson M.D., George D., Alsop D.C., *Combined T2* and T1 measurements for improved perfusion and permeability studies in high field using dynamic contrast enhancement*, *Eur Radiol.*, 16(9), 2006, s. 2083-2091.
29. Fei B., Wang H., Muzic R.F. Jr, Flask C., Wilson D.L., Duerk J.L., Feyes D.K., Oleinick N.L., *Deformable and rigid registration of MRI and microPET images for photodynamic therapy of cancer in mice*, *Med Phys.*, 33(3), 2006, s. 753-760.
30. Choyke P.L., Kobayashi H., *Functional magnetic resonance imaging of the kidney using macromolecular contrast agents*, *Abdom Imaging*, 31(2), 2006, s. 224-231.
31. Svatek R.S., Sims R., Anderson J.K., Abdel-Aziz K., Cadeddu J.A., *Magnetic resonance imaging characteristics of renal tumors after radiofrequency ablation*, *Urology*, 67(3), 2006, s. 508-512.

32. Bolte S.L., Ankem M.K., Moon T.D., Hedican S.P., Lee F.T., Sadowski E.A., Nakada S.Y., *Magnetic resonance imaging findings after laparoscopic renal cryoablation*, *Urology*, 67(3), 2006, s. 485-489.
33. Del Viscovo L., Ginolfi F., Rotondo A., Smaltino F., *Errori della risonanza magnetica nella diagnostica dei piccoli tumori renali [Errors of magnetic resonance in the diagnosis of small renal tumors]*, *Radiol Med.*, 86(6), 1993, s. 847-850.
34. Takahashi N., Yanagiya H., Kawaguchi T., Higashino I., Suzuki T., *Diagnostic imaging of invasive renal pelvic cancer*, *Hinyokika Kyo*, 39(12), 1993, s. 1125-1129.
35. Lundby B., Berg K.J., Lien H.H., Aamdal S., *A double blind study to evaluate the tolerability of gadodiamide injection and its effect on renal function in patients undergoing cerebral magnetic resonance imaging*, *Br J Radiol.*, 66(790), 1993, s. 871-876.
36. Blüml S., Schad L.R., Stepanow B., Lorenz W.J., *Spin-lattice relaxation time measurement by means of a TurboFLASH technique*, *Magn Reson Med.*, 30(3), 1993, s. 289-295.
37. Takeda M., Katayama Y., Tsutsui T., Komeyama T., Mizusawa T., Saito K., Takahashi H., Tamaki M., Sato S., *Differential diagnosis of solid renal tumors by MRI. Comparison of in situ relaxation times measured with a 0.1 T imager and histological findings*, *NMR Biomed.*, 6(5), 1993, s. 329-332.
38. Würstlin S., Arlart I.P., Guhl L., Nagler-Reus N., Edelman R.R., *Magnetresonanztomographische Identifizierung und Charakterisierung renaler Raumforderungen mit GE-Sequenzen unter Applikation von Gd-DTPA Magnetic resonance tomographic identification and characterization of renal space-occupying lesions using GE-sequences with application of Gd-DTPA*, *Rofo.*, 158(6), 1993, s. 518-524.
39. Squillaci E., Vidiri A., Orlacchio A., Crecco M., Grandinetti M.L., Squillaci S., Simonetti G., *Stadiazione con RM delle neoplasie renali. Confronto con i dati chirurgici [MR staging in renal neoplasms. Comparison with surgical data]*, *Radiol Med.*, 85(6), 1993, s. 794-802.
40. Vexler V.S., de Crespigny A.J., Wendland M.F., Kuwatsuru R., Mühler A., Brasch R.C., Moseley M.E., *MR imaging of blood oxygenation-dependent changes in focal renal ischemia and transplanted liver tumor in rat*, *J Magn Reson Imaging*, 3(3), 1993, s. 483-490.
41. Ruckle H.C., Torres V.E., Richardson R.L., Zincke H., *Renal tumors*, *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2(2), 1993, s. 201-210.
42. Alayed A., Krishna S., Breau R.H., Currin S., Flood T.A., Narayanasamy S., Schieda N., *Diagnostic Accuracy of MRI for Detecting Inferior Vena Cava Wall Invasion in Renal Cell Carcinoma Tumor Thrombus Using Quantitative and Subjective Analysis*, *AJR Am J Roentgenol.*, 212(3), 2019, s. 562-569.
43. Rogers H.J., Verhagen M.V., Shelmerdine S.C., Clark C.A., Hales P.W., *An alternative approach to contrast-enhanced imaging: diffusion-weighted imaging and T1 weighted imaging identifies and quantifies necrosis in Wilms tumour*, *Eur Radiol.*, 29(8), 2019, s. 4141-4149.
44. Guo R., Kang S.H., Zhong Y., Guo A.T., Wang H.Y., Ye H.Y., *[Magnetic resonance imaging findings and differential diagnosis of renal epithelioid angiomyolipoma comparing with renal non-epithelioid angiomyolipoma]*, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, 98(45), 2018, s. 3701-3704.
45. Yano M., Fowler K.J., Srisuwan S., Salter A., Siegel C.L., *Quantitative multiparametric MR analysis of small renal lesions: correlation with surgical pathology*, *Abdom Radiol (NY)*, 43(12), 2018, s. 3390-3399.
46. Galmiche C., Bernhard J.C., Yacoub M., Ravaud A., Grenier N., Cornelis F., *Is Multiparametric MRI Useful for Differentiating Oncocytomas From Chromophobe Renal Cell Carcinomas?*, *AJR Am J Roentgenol.*, 208(2), 2017, s. 343-350.

47. Riffel P., Zoellner F.G., Budjan J., Grimm R., Block T.K., Schoenberg S.O., Hausmann D., "One Stop Shop": Free-Breathing Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Kidney Using Iterative Reconstruction and Continuous Golden-Angle Radial Sampling, *Invest Radiol.*, 51(11), 2016, s. 714-719.
48. Becker A.S., Rossi C., *Renal Arterial Spin Labeling Magnetic Resonance Imaging*, *Nephron.*, 135(1), 2017, s. 1-5.
49. Yamamoto A., Tamada T., Ito K., Sone T., Kanki A., Tanimoto D., Noda Y., *Differentiation of subtypes of renal cell carcinoma: dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging versus diffusion-weighted magnetic resonance imaging*, *Clin Imaging.*, 41, 2017, s. 53-58.
50. Ferreira A.M., Reis R.B., Kajiwarra P.P., Silva G.E., Elias J.Jr, Muglia V.F., *MRI evaluation of complex renal cysts using the Bosniak classification: a comparison to CT*, *Abdom Radiol (NY)*, 41(10), 2016, s. 2011-2019.
51. Cornelis F., Grenier N., *Multiparametric Magnetic Resonance Imaging of Solid Renal Tumors: A Practical Algorithm*, *Semin Ultrasound CT MR*, 38(1), 2017, s. 47-58.

Diagnostyka raka nerki za pomocą czasów relaksacji rezonansu magnetycznego i metody fotodynamicznej

Streszczenie

Badanie rezonansem magnetycznym (MRI) wykorzystuje czasy relaksacji wody w tkance zdrowej i nowotworowej. Natomiast badanie fotodynamiczne (PDT) mierzy stężenie tlenu singletowego. Dzięki tym dwóm metodom jest możliwe obserwowanie różnic w tkankach zdrowych oraz utkania nowotworowego. Praca stanowi przegląd literaturowy dotychczasowej wiedzy na temat zastosowania MRI i PDT w diagnostyce i terapii nowotworów nerki.

Słowa kluczowe: rak nerki, terapia fotodynamiczna, efekt toksyczny tlenu

Diagnostics of kidney cancer with the use of magnetic resonance relaxation times and the photodynamic method

Abstract

Magnetic resonance imaging (MRI) uses the relaxation times of water in healthy and cancerous tissue. In contrast, the photodynamic test (PDT) measures singlet oxygen concentrations. Thanks to these two methods, it is possible to observe the differences in healthy tissues and the neoplastic structure. The work is a literature review of the existing knowledge on the use of MRI and PDT in the diagnosis and therapy of kidney cancer.

Keywords: kidney cancer, photodynamic therapy, toxic singlet oxygen effect

Znaczenie cząsteczek mikroRNA jako biomarkerów w patogenezie, diagnostyce i terapii chłoniaka rozlanego z dużych komórek B

1. Wstęp. Biogeneza i funkcje cząsteczek mikroRNA

MikroRNA (miRNA) to niekodujące, krótkie, jednoniciowe cząsteczki o średniej długości 22 nukleotydów, wykazujące zdolność potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [1-3]. Geny kodujące miRNA często występują w skupiskach, znajdują się w intronach, eksonach oraz w obszarach, które nie ulegają translacji [3, 4]. Biogeneza cząsteczek mikroRNA obejmuje ścieżkę kanoniczną i ścieżkę niekanoniczną.

Kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA to dominujący szlak prowadzący do powstania pierwotnego transkryptu pri-miRNA (ang. *primary miRNA*) o długości kilku tysięcy par zasad [1, 3, 5]. Pri-miRNA ulega przetworzeniu przez kompleks zbudowany z białka jądrowego DGCR8 (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) oraz rybonukleazy Droscha. DGCR8 rozpoznaje N6-metyladenyłowany motyw GGAC, a także inne motywy pri-miRNA. Enzym Droscha rozszczepia dupleks cząsteczki pri-miRNA [1, 6]. Utworzone pre-miRNA są transportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy przez białka transportowe – eksportyny 5. W cytoplazmie zachodzi obróbka utworzonej cząsteczki pre-miRNA przez enzym Dicer, który prowadzi do utworzenia dwuniciowych dupleksów: miRNA-miRNA* (nić wiodąca-niś pasażerska*). Dojrzała postać cząsteczki miRNA zostaje włączona do kompleksu RISC (ang. *microRNA induced silencing complex*), w którym główną rolę odgrywają białka Ago (ang. *Agronaute*) umożliwiające zahamowanie translacji bądź degradację określonej, docelowej cząsteczki mRNA [1, 3].

Cząsteczki mikroRNA warunkują przyłączenie kompleksu RISC do mRNA czego skutkiem może być degradacja lub hamowanie translacji. Wiązanie między miRNA a mRNA zachodzi między sekwencją komplementarną miRNA a regionem 3'UTR mRNA nieulegającym translacji. Ponadto, poznano regiony niekanoniczne m.in. w regionach kodujących mRNA oraz w sekwencji 5'UTR, które także mogą podlegać interakcji z mikroRNA. Po identyfikacji docelowego mRNA, który pozostaje stabilny, kompleks miRISC hamuje proces translacji bądź powoduje degradację mRNA [7-10].

Składanie kompleksu RISC, interakcja cząsteczek miRNA z mRNA, a także hamowanie translacji to procesy zachodzące na szorstkiej siateczce śródplazmatycznej. Natomiast degradacja docelowego mRNA zachodzi w endosomach [11, 12]. Ponadto udowodniono, że mniejszy kompleks RISC występuje również w jądrach komórkowych ssaków i składa się tylko z miRNA oraz Ago2. MiRISC połączone z adaptorem –

¹ d201010@365.sum.edu.pl, Szkoła Doktorska Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach; Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

² jgola@sum.edu.pl, Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

zawierającym powtórzenia trinukleotydów 6A (TNRC6A, ang. *Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein*), sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*) oraz jądrowy sygnał eksportu (NES, ang. *nuclear export signal*) – zapewnia zmiany jądrowo-cytoplazmatyczne [7, 13]. W jądrze komórkowym cząsteczki mikroRNA mogą regulować kodujące i niekodujące transkrypty RNA [7, 14]. MiRNA mogą zarówno blokować, promować dojrzewanie pri-miRNA, kolokalizować w jąderku z rybosomalnymi RNA, a także wpływać na przebudowę chromatyny [7, 15-17].

Obecnie znane są również niekanoniczne szlaki biogenezy cząsteczek miRNA wykorzystujące kombinacje białek Dicer, Drosha, Eksportyny 5 i AGO2. Pre-miRNA, które powstają niezależnie od Drosha/DGCR8 wykazują podobieństwo do substratów enzymu Dicer. Natomiast w przypadku szlaku niezależnego od enzymu Dicer, endogenne transkrypty o strukturze spinki do włosów (shRNA) są przetwarzane przez enzym Drosha. W tym przypadku do zakończenia dojrzewania pre-miRNA niezbędne są białka AGO2 [1, 18].

Niekanoniczne cząsteczki mikroRNA mogą mieć również formę transportujących RNA (tRNA, ang. *transfer RNA*) o kształcie koniczyny, wykazujących zdolność generowania małych niekodujących RNA (tsRNA, ang. *tRNA-derived small RNA*): fragmenty tRNA – tRF (ang. *tRNA-derived fragment*) oraz wywołane stresem, pochodzące od tRNA – tiRNA (ang. *tRNA-derived stress-induced RNA*) [7, 19, 20]. Cząsteczki te mogą wpływać na stabilność mRNA docelowego, zarówno poprzez wiązanie bezpośrednio, blokowanie syntezy białek, bądź poprzez cięcie miejsca docelowego częściowo komplementarnego względem sekwencji miRNA [7, 20-22].

Cząsteczki mikroRNA, w związku z regulacją ekspresji wielu genów oraz wpływem, zarówno w stanie zdrowia, jak i choroby organizmu, na krytyczne procesy komórkowe takie jak: apoptoza, różnicowanie i proliferacja, mogą ulegać deregulacji i stać się czynnikami proonkogenymi [7, 23]. Główną zmianą mikroRNA w chorobach nowotworowych jest zaburzona ekspresja genów związana z delecją bądź amplifikacją tych regionów. Skutkiem jest niewłaściwy poziom ekspresji miRNA, które mogą działać zarówno jako onkogeny, jak i supresory wpływając na wzrost, proliferację i przeżycie komórek nowotworowych [7, 24]. Nowotwory wykazują więc specyficzną ekspresję charakterystycznych cząsteczek miRNA co daje szansę na sprecyzowanie i odkrycie swoistych biomarkerów użytecznych w procesie diagnozy, doboru schematu terapeutycznego a następnie monitorowania, prognozowania i określania ryzyka nawrotu choroby u pacjentów onkologicznych. Deregulację cząsteczek miRNA wykazano m.in. w nowotworach limfoproliferacyjnych w tym, w chłoniaku rozlanym z dużych komórek B (DLBCL, ang. *diffuse large B-cell lymphoma*).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej roli cząsteczek miRNA w DLBCL, ze szczególnym podkreśleniem tych miRNA, które w ostatnich latach były przedmiotem szczegółowych badań.

2. Chłoniaki rozlane z dużych komórek B

Chłoniaki rozlane z dużych komórek B to najczęściej występująca grupa chłoniaków wśród nowotworów układu chłonnego oraz wśród chłoniaków agresywnych. DLBCL to heterogenna grupa chłoniaków wywodząca się z obwodowych, dojrzałych limfocytów B [25-27].

Obowiązującą klasyfikacją DLBCL jest zaproponowany w 2016 roku przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) podział na następujące jednostki histologiczne [25, 28, 29]:

- DLBCL bliżej nieokreślony (DLBCL NOS, ang. *DLBCL not otherwise specified*);
- Pierwotny DLBCL ośrodkowego układu nerwowego (primary DLBCL CNS, ang. *primary DLBCL of the central nervous system*);
- Chłoniak z dużych komórek B z licznymi T i/lub histiocyty (THRLBCL, ang. *T-cell/histiocyte rich large B-cell lymphoma*);
- Pierwotny skórny DLBCL typu kończynowego (PCDLBCL-LT, ang. *primary cutaneous DLBCL leg type*);
- DLBCL związany z przewlekłym zapaleniem (ang. *DLBCL associated with chronic inflammation*);
- EBV+ DLBCL.

Poza powyższą klasyfikacją wyróżnia się następujące warianty morfologiczne DLBCL: immunoblastyczny, centroblastyczny oraz anaplastyczny. Ponadto stwierdzono występowanie dwóch molekularnych podgrup, w tym: ABC (ang. *activated B-cell*) – DLBCL z komórek B aktywowanych, wywodzący się z plazmoblastów, charakteryzuje się nadekspresją NFκB (ang. *NFκB, nuclear factor κB*) oraz typ GCB (ang. *germinal center B-cell*), wykazujący deregulację poziomu ekspresji onkogenu BCL6 [26, 29-34].

Podstawą rozpoznania DLBCL jest badanie histopatologiczne [29, 31]. Badania immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych dla receptorów cytoplazmatycznych oraz powierzchniowych umożliwiają rozpoznanie określonych podtypów chłoniaka DLBCL i różnicowanie z chłoniakami T/NK oraz B-komórkowymi, a także innymi chorobami nowotworowymi i zmianami odczynowymi [29, 35]. Najczęściej występującym objawem choroby jest powiększenie węzłów chłonnych [29, 31].

Terapia chorych na DLBCL, której celem jest osiągnięcie całkowitej remisji, powinna zostać wdrożona tuż po rozpoznaniu. U chorych na DLBCL wdraża się chemioterapię opartą na schemacie CHOP uwzględniającym cyklofosamid, prednizon, doksorubicynę oraz winkrystynę w połączeniu z monoklonalnym przeciwciałem IgG1 – rytuksymabem [31, 36]. Leczenie jest zależne od stopnia zaawansowania choroby, chorób współtowarzyszących, stanu chorego, wieku, a także czynników rokowniczych [32].

2.1. Patogeneza

Etiopatogeneza DLBCL wciąż pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Istnieją czynniki o potwierdzonym związku z zachorowaniem, w tym: czynniki środowiskowe, jatrogenne, immunologiczne, infekcyjne i genetyczne. Warto zwrócić uwagę na chłoniaki DLBCL powstające *de novo*, stanowiące większość występujących przypadków. Ponadto, u około 10% pacjentów chorych na chłoniaka o powolnym przebiegu choroby dochodzi do transformacji nowotworowej w bardziej agresywny typ chłoniaka bądź do progresji złośliwości [37, 38].

Bez względu na czynnik patogenetyczny wszystkie mechanizmy opierają się na zaburzeniach funkcji supresorów nowotworowych i/lub ekspresji genów onkogennych. Zaburzenia genów supresorowych (mutacje, delecje) zakłócają prawidłowe procesy

cyklu komórkowego, a także procesy proliferacji i różnicowania komórkowego [26, 32]. Dzięki technikom biologii molekularnej wyznaczono geny zaangażowane w patogenezę DLBCL. Jest to grupa genów biorących udział w wielu procesach komórkowych, w tym: rozwoju, wzroście, różnicowaniu i proliferacji komórek, a także geny kodujące czynniki transkrypcyjne [32, 39, 40].

Najczęstszym defektem molekularnym w podtypie GCB jest zwiększona ekspresja genu kodującego BCL6 (ang. *B-cell/lymphoma 6*) czyli białko biorące udział w hamowaniu ekspresji genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego oraz apoptozę [32, 41]. BCL6 w warunkach fizjologicznych, indukuje podziały komórkowe poprzez wpływ na inhibitory cyklu komórkowego p27 oraz p21. Ponadto, poprzez obniżenie poziomu ekspresji genu *ATR* (ang. *ataxia telangiectasia and Rad3 related*), *TP53* (ang. *tumor protein p53*) oraz *CHEK1* (ang. *checkpoint kinase 1*) zapobiega apoptozie komórki [31, 34, 42]. Kolejne zaburzenia molekularne występujące u pacjentów z podtypem GCB-DLBCL to: translokacja genu Bcl-2 do loci genów *IGH*, translokacje genu kodującego czynnik uczestniczący w erytropoezie i angiogenezie – *LMO2* (ang. *LIM domain only 2*) oraz delecja genu kodującego białko będące supresorem regulującym szlak PI3K/AKT – PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) biorący udział w regulacji proliferacji, wzrostu i przeżywalności komórek [31, 34, 43, 44].

W chłoniakach ABC-DLBCL zachodzi blokowanie różnicowania limfocytów B w wyniku m.in.: uszkodzenia funkcji genu *Blimp-1* (ang. *B lymphocyte induced maturation protein 1*), delecji genu *IRF4* (ang. *interferon regulatory factor 4*) oraz *PRDM* [26, 31, 45, 46]. W ABC-DLBCL dochodzi do aktywacji kompleksu indukującego szlak NF- κ B – CBM (*CARD11-BCL12-MALT1*), co prowadzi do zwiększonego poziomu ekspresji genu *BCL-2* [31, 44, 47, 48]. Bezpośrednią indukcję szlaku NF- κ B wywołuje delecja w genie *A20* [31, 44, 48]. Ponadto, w podtypie ABC obserwuje się translokację genu kodującego czynnik regulujący cykl komórkowy oraz programowaną śmierć komórki – *MYC* (ang. *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*) do loci genów *IGH* [43, 48].

Wciąż nie w pełni poznana patogeneza DLBCL, a także trudności w diagnostyce, terapii oraz określaniu czynników rokowniczych i predykcyjnych, stanowi duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. W związku z powyższym konieczne jest poszukiwanie swoistych biomarkerów, szczególnie uwzględniając rozwiązania biologiczne i molekularne. Dobrym kandydatem z potencjałem diagnostycznym, prognostycznym oraz predykcyjnym są cząsteczki mikroRNA.

3. Cząsteczki mikroRNA w DLBCL

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań mających na celu sprecyzowanie zmian ekspresji miRNA w DLBCL. Tym samym służących poznaniu mechanizmów regulujących ekspresję miRNA i ich działania na szlaki komórkowe. Do chwili obecnej zidentyfikowano wiele cząsteczek mikroRNA o zmiennej ekspresji w DLBCL w tym: miR-146a-5p/miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-150-5p, miR-21-5p, a także miR-28, miR-34a, miR-27b, miR-15a, miR-16-1, miR-221, miR-222 oraz miR-224 [49-59].

3.1. Cząsteczki miR-146a/b

Cząsteczki miR-146a są modulatorami odporności nabytej i wrodzonej [60,61]. Wykazano, że miR-146a działa jako silny supresor guza w chłoniakach z komórek NK/T. Wpływa hamująco na proliferację komórek, a także, poprzez hamujący wpływ na szlak NFκB, pobudza apoptozę. Supresja miR-146a powoduje wzrost poziomu ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 wpływając tym samym na oporność na wdrożoną terapię [62]. Liczne badania wskazują również na znaczący udział miR-146a w rozwoju DLBCL [60-63]. W badaniach Zhuang i wsp. wykazali wyższy poziom miR-146a u pacjentów chorych na DLBCL niż u osób zdrowych [63]. Pacjenci z niższą ekspresją miR-146a osiągnęli znacznie dłuższy czas przeżycia bez progresji, a także wyższy wskaźnik remisji oraz ogólnej odpowiedzi [49]. Działanie hamujące na proliferację komórek DLBCL wykazuje miR-146b [50]. Wu i wsp. [50] udowodnili, że u pacjentów ze złym rokowaniem występuje niski poziom ekspresji miR-146b-5p, a ponadto niska ekspresja jest czynnikiem prognostycznym negatywnej odpowiedzi na zastosowaną standardową terapię cyklofosfamidem, doksorubicyną, winkrystyną oraz prednizonem (CHOP). Również Ting i wsp. [64] wykazali iż nieprawidłowa ekspresja miR-146b-5p jest związana z krótszym czasem przeżycia pacjentów bez progresji/nawrotu bądź z opornością na wdrożone leczenie. W związku z powyższym, cząsteczki miR-146a/b są odpowiednimi biomarkerami diagnostycznymi oraz predykcyjnymi oporności na zastosowaną chemioterapię.

3.2. Cząsteczka miR-155

Cząsteczka miR-155 jest dobrze poznanym czynnikiem onkogennym komórek krwiotwórczych, a jej nadekspresja powoduje zaburzenia limfoproliferacyjne [65-67]. MiR-155 działa na docelowe mRNA w tym supresorowe czynniki: PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) oraz SHIP-1 (ang. *The SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase 1*), wpływające na regulację szlaku PI3K/PKB. Kolejnym celem miR-155 jest czynnik transkrypcyjny PU.1 wpływający na różnicowanie komórek B. Poprzez wiązanie omawianej cząsteczki mikroRNA z 3'UTR PU.1 dochodzi do zahamowania syntezy PU.1 a przez to również czynnika PAX5, tym samym prowadząc do rozpoczęcia szlaku różnicowania komórek plazmatycznych. Nadekspresja PU.1 powoduje zahamowanie różnicowania komórek B, a niedostateczna ekspresja PU.1 hamuje tworzenie tego typu komórek [65, 68]. W związku z tym miR-155 został uznany jako potencjalny biomarker nowotworów komórek układu krwiotwórczego i chłonnego [65]. Wielokrotnie wykazano udział miR-155 w patogenezie DLBCL. Huskova i wsp. [65] w przeprowadzonych badaniach wykazali znacząco podwyższoną ekspresję cząsteczki miR-155 w DLBCL. Badacze wykazali, iż wysoka ekspresja miR-155 była związana z krótszym czasem przeżycia pacjentów [65].

W ostatnich latach zostały przeprowadzone badania wykazujące związek między ekspresją miR-155 a patogenezą DLBCL. W badaniach Zhang i wsp. [69] wykazano znaczący wzrost ekspresji FOXP3 w komórkach DLBCL, a także na podstawie analizy klinicznej udowodniono, iż wzrost ekspresji FOXP3 jest czynnikiem złego rokowania [69]. Huang i wsp. [70] wykazali, że pacjenci z podtypem ABC wykazują znacząco wyższą ekspresję cząsteczki miR-155 niż pacjenci z podtypem GCB-DLBCL. Badacze wykazali, iż miR-155 reguluje m.in. p85α, który z kolei jest regulatorem szlaku PI3K-

AKT. Zwiększona ekspresja miR-155, obniżając p85 α , wykazuje działanie aktywujące wspomniany szlak. Dane przedstawione przez Huang i wsp. udowadniają, że obniżenie ekspresji miR-155 w komórkach ABC o zwiększonej ekspresji tej cząsteczki, zmniejszają aktywność AKT oraz ich żywotność. W komórkach linii GCB o niskiej ekspresji miR-155, zwiększenie poziomu ekspresji prowadzi do zwiększenia żywotności komórek [70]. Zheng i wsp. [71] zweryfikowali, iż miR-155 zwiększa proliferację komórek B w DLBCL oraz, poprzez hamowanie FOXO3, hamuje apoptozę. Ponadto, analizując cechy kliniczno-patologiczne pacjentów wykazano, iż niska ekspresja FOXO3 oraz zwiększona ekspresja miR-155 wiążą się ze złym rokowaniem chorych na DLBCL [71].

3.3. Cząsteczki miR-150

Coraz częściej zwraca się uwagę na rolę cząsteczek miR-150 w nowotworach hematologicznych, w tym stwierdzono istotnie niską ekspresję w DLBCL [72, 73]. Początkowo dobrze poznanym celem miR-150 był gen *MYB*, kodujący jedno z białek ulegające najczęściej deregulacji w nowotworach [74, 75]. W komórkach progenitorowych miR-150 nie ulega ekspresji, natomiast ekspresja c-Myb jest zwiększona. Badania te udowadniają, iż miR-150 wpływa na ekspresję *c-myb*. W konsekwencji doszło do obniżenia poziomu c-Myb i zablokowania rozwoju komórek B [74]. Ponadto, wskazuje się na rolę białka MYC w patogenezie DLBCL, które poprzez kontrole innych ludzkich genów może uczestniczyć w wielu procesach komórkowych w tym, m.in.: nasila wzrost, proliferację, angiogenezę, niestabilność genetyczną, a także przyspiesza tworzenie przerzutów. Ponadto wpływa on również na ekspresję miR-150 [75-80].

Badania przeprowadzone przez Mraz i wsp. [80] wskazują dwa geny – GAB1 oraz FOXP1 jako cele cząsteczek miR-150 w komórkach B [80]. GAB1 to cząsteczka umożliwiająca aktywację AKT, a tym samym nasilenie sygnalizacji BCR. Badacze wskazują iż istotny wzrost poziomu GAB1 oraz FOXP1 przy obniżonej ekspresji miR-150, wpływa na niekorzystne rokowanie kliniczne [74]. FOXP1 należący do podrodziny FOXP to czynnik transkrypcyjny odgrywający ważną rolę w kontroli dojrzewania komórek B oraz rozwoju nowotworów. Jedne z najnowszych badań Musilova i wsp. [81] wskazuje na istotną rolę Myc, miR-150 oraz FOXP1 w patogenezie chłoniaka grudkowego ulegającego transformacji do DLBCL. Wykazano, iż wzrost ekspresji genu kodującego białko Myc, obniża ekspresję miR-150, który następnie prowadzi do wzrostu poziomu czynnika FOXP1 promując przeżycie limfocytów B. Ponadto wysoki poziom FOXP1 wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentów chorych na DLBCL. FOXP1 wskazuje się jako niezależny czynnik prognostyczny [82].

Kolejnym odkrytym celem cząsteczki miR-150 jest CXCR4 będący receptorem chemokiny SDF-1. Receptor uczestniczy w przeżyciu, migracji, proliferacji komórek, a także w aktywacji zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych komórek [83]. Tano i wsp. [84] wykazali, że niedokrwienie może skutkować: zahamowaniem ekspresji miR-150 w jednojądrzastych komórkach pochodzących ze szpiku a tym samym aktywacją ekspresji genu *CXCR4* oraz mobilizacją komórek macierzystych celem naprawy i neowaskularyzacji. MiR-150 może być więc nowym celem terapeutycznym [84].

3.4. Cząsteczka miR-21-5p

MiR-21 jest cząsteczką zaangażowaną w różnicowanie, proliferację oraz hamowanie apoptozy komórek nowotworowych [85]. Odkryto, że onkogenna cząsteczka miR-21-5p ulega nadekspresji w DLBCL. Badania Liu i wsp. [86] wykazały, iż wzrost poziomu miR-21 hamuje apoptozę komórek DLBCL oraz nasila ich proliferację. Również wykazano, że wzrastająca ekspresja miR-21 jest dodatnio skorelowana z ekspresją genu kodującego antyapoptotyczne białko Bcl-2. W związku z powyższym sugeruje się, iż zarówno miR-21, jak i białko Bcl-2 mogą stać się skutecznymi celami terapeutycznymi [86]. Ponadto wykazano, że bezpośrednim celem miR-21 jest białko FOXO1 należące do rodziny FOXO (ang. *forkhead box transcription factor, class O*). FOXO odgrywa ważną rolę w rozwoju i różnicowaniu limfocytów B. Jednakże, nadal rola FOXO1 w DLBCL nie została dokładnie poznana. Go i wsp. [54] wykazali, iż hamowanie białka FOXO1 wpływa hamująco na bodźce proapoptotyczne co sugeruje iż w DLBCL FOXO1 wykazuje działanie proapoptotyczne. Ponadto po zahamowaniu miR-21, FOXO1 regulowało proapoptotyczne działanie białka BIM [54].

3.5. Inne cząsteczki mikroRNA

Wielokrotnie przeprowadzane badania mające na celu identyfikację cząsteczek miRNA w DLBCL zaowocowały wykryciem i poznaniem funkcji wielu innych niż omówione wyżej cząsteczki. Jednym z przykładów jest cząsteczka o zdefiniowanej aktywności przeciwnowotworowej – miR-28, która znacząco wpływa na aktywność szlaku sygnałowego BCR, ważnego w procesach komórkowych z uwagi na udział w regulacji śmierci oraz proliferacji komórek B [55]. Bartolomé-Izquierdo i wsp. [55] stwierdzili, iż poziom ekspresji cząsteczki miR-28 wykazuje, szczególnie w wariantach ABC-DLBCL, odwrotną korelację z poziomami Bcl-2, IKKB2 oraz NF- κ B2. Stąd badacze sugerują, że szczególnie podtyp ABC może być wrażliwy na terapię uwzględniającą miR-28 [55]. Celem terapeutycznym w DLBCL okazuje się być również cząsteczka miR-34a, celująca w FOXP1 będący onkogenem w DLBCL, wykazującym wyższy poziom ekspresji w agresywnych ABC-DLBCL [56, 82, 87]. MiR-34a jest markerem odpowiedzi na doksorubicynę. Okazuje się, że wysoki poziom ekspresji miR-34a wpływa na większą wrażliwość na zastosowanie wspomnianego leku. Przeciwnie, niski poziom ekspresji miR-34a wpływa na brak efektu terapeutycznego [56].

Kolejną cząsteczką mikroRNA o udowodnionym wpływie na odpowiedź na zastosowaną terapię jest miR-27b, będący celem HCP5 (ang. *HLA Complex P5*) – kompleksu uczestniczącego m.in. w oporności na apoptozę, proliferacji oraz migracji komórek nowotworowych [57,88]. MiR-27b jest częścią osi HCP5/miR-27b-3p/MET i wykazano, iż wyciąg z *Gardenia jasminoides Ellis* wpływa na wspomnianą oś, regulując proces apoptozy oraz proliferację komórek nowotworowych w DLBCL [57]. HCP5, poprzez osłabienie działania miR-27b-3p, zwiększał poziom ekspresji MET, przeciwdziałając apoptozie i hamowaniu proliferacji wywołanej przez genipozyd [57]. Powyższe wskazuje iż miR-27b może stanowić kolejny marker predykcyjny. MiR-15a i miR-16-1 to kolejne negatywne regulatory programowanej śmierci komórki, odgrywające kluczową rolę w ekspresji innych genów [58]. Obie cząsteczki wykazują istotne obniżenie ekspresji w przewlekłej białaczce limfocytowej (CLL, ang. *chronic lymphocytic leukemia*). Z uwagi na fakt iż komórki CLL i DLBCL pochodzą z tej samej linii

komórkowej, zwrócono uwagę na fakt, iż miR-15a i miR-16-1 mogą wykazywać istotną rolę również w patogenezie DLBCL [58, 89]. Badania przeprowadzone przez Tuncer i wsp. [89] wykazały, że poziom miR-15a nie uległ zmianie, w przeciwieństwie do miR-16a, którego poziom obniżył się znacząco w porównaniu do grupy kontrolnej [89]. Obserwacje te wskazują, iż wspomniane miRNA mogą pełnić funkcję biomarkerów w DLBCL.

W rozwoju omawianej choroby odgrywają również rolę cząsteczki miR-221, miR-222 oraz miR-224. MiR-221 oraz miR-222, kontrolują proliferację, migrację oraz apoptozę komórek nowotworowych [59]. MiR-221 wydaje się być odpowiednim markerem różnicującym podtypy DLBCL z uwagi na wyższy poziom ekspresji tej cząsteczki w podtypie ABC niż GCB [90]. Ponadto, miR-222 wpływa na mRNA białka PPP2R2A (ang. *protein phosphatase 2 regulatory subunit B alpha*) kontrolującego wzrost, podział i proliferację komórek nowotworowych [91-94]. Badania Sun i wsp. [91] potwierdziły wzrost ekspresji miR-222-3p w ABC-DLBCL, co wpływało na indukcję proliferacji oraz znoszenie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych. Ponadto, wykazano, że miR-222-3p hamuje ekspresję PPP2R2A poprzez oddziaływanie z regionem 3'UTR wspomnianego genu [91]. MiR-224 został do tej pory dobrze poznany m.in. w raku jajnika, piersi czy prostaty, jako czynnik regulujący apoptozę, proliferację oraz przerzuty komórek nowotworowych [95-98]. Okazuje się iż miR-224 wpływa na sygnalizację Wnt/ β -kateniny poprzez wiązanie z receptorem Fizzled 5, co prowadzi do hamowania migracji i proliferacji komórek raka piersi [99]. Okazuje się, że w DLBCL miR-224 ulega obniżonej ekspresji, a ponadto jest czynnikiem korelującym z rokowaniem pacjentów poddanych terapii R-CHOP [95].

4. Podsumowanie

Do chwili obecnej poznano wiele cząsteczek miRNA ulegających deregulacji w chłoniaku DLBCL, które stanowią kluczowe etapy jego patogenezy. Szczegółowe badania pozwoliły na scharakteryzowanie celu każdego miRNA i jego funkcji względem docelowego mRNA. Stąd miRNA wykazują dobry potencjał jako biomarkery użyteczne w precyzyjnej i szybkiej diagnostyce. Mogą stanowić szansę na stworzenie celowanych schematów terapeutycznych, a także służyć jako wskaźniki predykcyjne i rokownicze.

Literatura

1. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*, *Frontiers in Endocrinology*, 3(9), 402, 2018.
2. Ha M., Kim V.N., *Regulation of microRNA biogenesis*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 2014, s. 509-524.
3. Grenda A., Budzyński M., Filip A.A., *Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67, 2013, s. 174-185.
4. Wang Z., *MicroRNA: A matter of life or death*, *World Journal of Biological Chemistry*, 1(4), 2010, s. 41-54.
5. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*, *Genome Research*, 14(10A), 2004, s. 1902-1910.

6. Alarcon C.R., Lee H., Goodarzi H., Halberg N., Tavazoie S.F., *N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing*, Nature, 519(7544), 2015, s. 482-485.
7. Annese T., Tamma R., De Giorgis M., Ribatti D., *MicroRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis*, Frontiers in Oncology, 10, 2020, 581007.
8. Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N., *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?*, Nature Reviews Genetics, 9(2), 2008, s. 102-114.
9. Seok H., Ham J., Jang E.S., Chi S.W., *MicroRNA Target Recognition: Insights from Transcriptome-Wide Non-Canonical Interactions*, Molecules and Cells, 39(5), 2016, s. 375-81.
10. Jonas S., Izaurralde E., *Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing*, Nature Reviews Genetics, 16(7), 2015, s. 421-433.
11. Bose M., Barman B., Goswami A., Bhattacharyya S.N., *Spatiotemporal Uncoupling of MicroRNA-Mediated Translational Repression and Target RNA Degradation Controls MicroRNP Recycling in Mammalian Cells*, Molecular and Cellular Biology, 37(4), 2017, e00464-00416.
12. Stalder L., Heusermann W., Sokol L., Trojer D., Wirz J., Hean J., Fritzsche A., Aeschmann F., Pfanzagl V., Basselet P., Weiler J., Hintersteiner M., Morrissey D.V., Meisner-Kober N.C., *The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing*, The EMBO Journal., 32(8), 2013, s. 1115-11127.
13. Wei Y., Li L., Wang D., Zhang C.Y., Zen K., *Importin 8 regulates the transport of mature microRNAs into the cell nucleus*, Journal of Biological Chemistry, 289(15), 2014, s. 10270-10275.
14. Catalanotto C., Cogoni C., Zardo G., *MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions*, International Journal of Molecular Sciences, 17(10), 1712, 2016.
15. López-Urrutia E., Bustamante Montes L.P., Ladrón de Guevara Cervantes D., Pérez-Plasencia C., Campos-Parra A.D., *Crosstalk Between Long Non-coding RNAs, MicroRNAs and mRNAs: Deciphering Molecular Mechanisms of Master Regulators in Cancer*, Frontiers in Oncology, 9, 669, 2019.
16. Atwood B.L., Woolnough J.L., Lefevre G.M., Ribeiro M.S.J., Felsenfeld G., Giles K.E., *Human argonaute 2 is tethered to ribosomal RNA through MicroRNA interactions*, The Journal of Biological Chemistry, 291(34), 2016, s. 17919-17928.
17. Kalsotra A., Wang K., Li P.F., Cooper T.A., *MicroRNAs coordinate an alternative splicing network during mouse postnatal heart development*, Genes & Development, 24(7), 2010, s. 653-658.
18. Yang J.S., Maurin T., Robine N., Rasmussen K.D., Jeffrey K.L., Chandwani R., Papapetrou E.P., Sadelain M., O'Carroll D., Lai E.C., *Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(34), 2010, s. 15163-15168.
19. Stavast C.J., Erkeland S.J., *The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation*, Cells, 8(11), 1465, 2019.
20. Li S., Xu Z., Sheng J., *tRNA-derived small RNA: A novel regulatory small non-coding RNA*, Genes, 9(5), 246, 2018.
21. Haussecker D., Huang Y., Lau A., Parameswaran P., Fire A.Z., Kay M.A., *Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing*, RNA, 16(4), 2010, s. 673-695.
22. Kumar P., Anaya J., Mudunuri S.B., Dutta A., *Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets*, BMC Biology, 12, 78, 2014.

23. Ha T. Y., *MicroRNAs in Human Diseases: From Autoimmune Diseases to Skin, Psychiatric and Neurodegenerative Diseases*, Immune Network, 11(5), 2011, s. 227-244.
24. Reddy K.B., *MicroRNA (miRNA) in cancer*, Cancer Cell International, 15, 38, 2015.
25. Warzocha K., Puła B., *Rozpoznaie i leczenie chorych na chłoniaka rozlanego z dużych komórek B*, Hematologia, 8(2), 2017, s 113-131.
26. Juszczyński P., *Struktura genetyczna chłoniaków rozlanych z dużych komórek B: od mikromacierzy DNA do celowanej terapii*, Hematologia. 1(1), 2010, s. 15-28.
27. Fisher S.G., Fisher R.I., *The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma*, Oncogene, 23(38), 2004, s. 6524-6534,
28. Grygalewicz B., *Metody cytogenetyki molekularnej w różnicowaniu agresywnych B-NHL*, Acta Haematologica Polonica, 50(3), 2019, s. 109-115.
29. Swerdlow S.H., Campo E., Pileri S.A., Harris N.L., Stein H., Siebert R., Advani R., Ghielmini M., Salles G.A., Zelenetz A.D., Jaffe E.S., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*, Blood, 127(20), 2016, s. 2375-2390.
30. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues*, IARC Press, Lyon 2008, edycja 4, tom 2.
31. Bielska M., Lech-Marańda E., Pastorczak A., Młynarski W., *Onkogenne zaburzenia molekularne w podtypach chłoniaków rozlanych z dużych komórek B*, Hematologia, 4(4), 2013, s. 333-338.
32. Warzocha K., *Chłoniak rozlany z dużych komórek B - zasady postępowania w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii*, Hematologia, 4(2), 2013, s. 123-136.
33. Warzocha K., *Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych*, Via Medica, Warszawa 2013, s. 897-915.
34. Frick M., Dörken B., Lenz G., *New insights into the biology of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma*, Best Practice & Research Clinical Haematology, 25(1), 2012, s. 3-12.
35. Warzocha K., *Chłoniaki rozlane z dużych komórek B*, Onkologia w Praktyce Klinicznej – Edukacja, Tom 6, Supl. A, 2020, s. 411-438.
36. Jang G., Yoon D.H., Kim S., Lee D.H., Lee S.W., Huh J., Suh C., *Addition of rituximab to the CHOP regimen has no benefit in patients with primary extranodal diffuse large B-cell lymphoma*, The Korean Journal of Hematology, 46(2), 2011, s. 103-110.
37. Martelli M., Ferreri A.J., Agostinelli C., Di Rocco A., Pfreundschuh M., Pileri S.A. *Diffuse large B-cell lymphoma*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 87 (2), 2013, s. 146-171.
38. Hartge P., Wang S., *Overview of the etiology and epidemiology of lymphoma* P.M.A.J.O.C.B. Mauch, R. Dalla-Favera, N.L. Harris (Eds.), Non-Hodgkin's lymphomas, Lippincott, Williams and Wilkins, New York, NY (2004), s. 711-727.
39. Găman A.M., Bold A., Găman G., *The unexpected evolution of a case of diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Romanian Journal of Morphology and Embryology. 52(2), 2011, s. 719-722.
40. Tirado C.A., Chen W., Garcia R., Kohlman K.A., Rao N., *Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large b-cell lymphoma: a review of the literature*, Journal of Hematology & Oncology, 5, 54, 2012.
41. Gouveia G.R., Siqueira S.A., Pereira J., *Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma*, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 34(6), 2012, s. 447-451.
42. Cerchietti L.C., Ghetu A.F., Zhu X., Da Silva G.F., Zhong S., Matthews M., Bunting K.L., Polo J.M., Farès C., Arrowsmith C.H., Yang S.N., Garcia M., Coop A., Mackerell A.D. Jr,

- Privé G.G., Melnick A., *A small-molecule inhibitor of BCL6 kills DLBCL cells in vitro and in vivo*, *Cancer Cell*, 17(4), 2010, s. 400-411.
43. Nedomova R., Papajik T., Prochazka V., Indrak K., Jarosova M., *Cytogenetics and molecular cytogenetics in Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL)*, *Biomedical papers of the medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic.*, 157(3), 2013, s. 239-247.
 44. Lenz G., Wright G.W., Emre N.C., Kohlhammer H., Dave S.S., Davis R.E., Carty S., Lam L.T., Shaffer A.L., Xiao W., Powell J., Rosenwald A., Ott G., Muller-Hermelink H.K., Gascoyne R.D., Connors J.M., Campo E., Jaffe E.S., Delabie J., Smeland E.B., Rimsza L.M., Fisher R.I., Weisenburger D.D., Chan W.C., Staudt L.M., *Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 2008, s. 13520-13525.
 45. John S.A., Garrett-Sinha L.A., *Blimp1: a conserved transcriptional repressor critical for differentiation of many tissues*, *Experimental Cell Research*, 315(7), 2009, s. 1077-1084.
 46. Mandelbaum J., Bhagat G., Tang H., Mo T., Brahmachary M., Shen Q., Chadburn A., Rajewsky K., Tarakhovskiy A., Pasqualucci L., Dalla-Favera R., *BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma*, *Cancer cell*, 18(6), 2010, s. 568-579.
 47. Hara H., Izasa E., Nakaya M., Yoshida H., *L-CBM signaling in lymphocyte development and function*, *Journal of Blood Medicine*, 1, 2010, s. 93-104.
 48. Compagno M., Lim W.K., Grunn A., Nandula S.V., Brahmachary M., Shen Q., Bertoni F., Ponzoni M., Scandurra M., Califano A., Bhagat G., Chadburn A., Dalla-Favera R., Pasqualucci L., *Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma*, *Nature*, 459(7247), 2009, s. 717-721.
 49. Zhong H., Xu L., Zhong J.H., Xiao F., Liu Q., Huang H.H., Chen F.Y., *Clinical and prognostic significance of miR-155 and miR-146a expression levels in formalin-fixed/paraffin-embedded tissue of patients with diffuse large B-cell lymphoma*, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(5), 2012, s. 763-770.
 50. Wu P.Y., Zhang X.D., Zhu J., Guo X.Y., Wang J.F., *Low expression of microRNA-146b-5p and microRNA-320d predicts poor outcome of large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone*, *Human Pathology*, 45(8), 2014, s. 1664-1673.
 51. Li X.D., Li X.M., Gu J.W., Sun X.C., *MiR-155 regulates lymphoma cell proliferation and apoptosis through targeting SOCS3/JAK-STAT3 signaling pathway*, *European Review for medical and Pharmacological Sciences*, 24(14), 7577, 2020.
 52. Caramuta S., Lee L., Özata D.M., Akçakaya P., Georgii-Hemming P., Xie H., Amini R.M., Lawrie C.H., Enblad G., Larsson C., Berglund M., Lui W.O., *Role of microRNAs and microRNA machinery in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma*, *Blood Cancer Journal*, 3, e152, 2013.
 53. Handal B., Enlow R., Lara D., Bailey M., Vega F., Hu P., Lennon A., *Investigating the Expression of Oncogenic and Tumor Suppressive MicroRNA in DLBCL*, *Journal of the Association of Genetic Technologists*, 39(1), 2013, s. 14-20.
 54. Go H., Jang J.Y., Kim P.J., Kim Y.G., Nam S.J., Paik J.H., Kim T.M., Heo D.S., Kim C.W., Jeon Y.K., *MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma*, *Oncotarget*, 2015, 6(17), s. 15035-15049.
 55. Bartolomé-Izquierdo N., de Yébenes V.G., Álvarez-Prado A.F., Mur S.M., Lopez Del Olmo J.A., Roa S., Vazquez J., Ramiro A.R., *miR-28 regulates the germinal center reaction and blocks tumor growth in preclinical models of non-Hodgkin lymphoma*, *Blood*, 129(17), 2017, s. 2408-2419.

56. Marques C., Ranjbar B., Bach Laursen M., Falgreen S., Ellern Bilgrau A., Støve Bødker J., Krogh Jørgensen L., Nascimento Primo M., Schmitz A., Schmidt Ettrup M., Johnsen H.E., Bøgested M., Giehm Mikkelsen J., Dybkær K., *High miR-34a expression improves response to doxorubicin in diffuse large B-cell lymphoma*, *Experimental Hematology*, 44(4), 2016, s. 238-246.
57. Hu L., Zhao J., Liu Y., Liu X., Lu Q., Zeng Z., Zhu L., Tong X., Xu Q., *Geniposide inhibits proliferation and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphoma cells by inactivating the HCP5/miR-27b-3p/MET axis*, *International Journal of Medical Sciences*, 17(17), 2020, s. 2735-2743.
58. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 2002, s. 15524-15529.
59. Malpeli G., Barbi S., Tosadori G., Greco C., Zupo S., Pedron S., Brunelli M., Bertolaso A., Scupoli M.T., Krampera M., Kamga P.T., Croce C.M., Calin G.A., Scarpa A., Zamò A., *MYC-related microRNAs signatures in non-Hodgkin B-cell lymphomas and their relationships with core cellular pathways*, *Oncotarget*, 9(51), 2018, s. 29753-29771.
60. Zare N., Eskandari N., Mehrzad V., Javanmard S.H., *The expression level of hsa-miR-146a-5p in plasma-derived exosomes of patients with diffuse large B-cell lymphoma*, *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 24, 10, 2019.
61. Labbaye C., Testa U., *The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer*, *Journal of Hematology & Oncology*, 5, 13, 2012.
62. Paik J.H., Jang J.Y., Jeon Y.K., Kim W.Y., Kim T.M., Heo D.S., Kim C.W., *MicroRNA-146a downregulates NFκB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma*, *Clinical Cancer Research*, 17(14), 2011, s. 4761-4771.
63. Zhuang H., Shen J., Zheng Z., Luo X., Gao R., Zhuang X., *MicroRNA-146a rs2910164 polymorphism and the risk of diffuse large B cell lymphoma in the Chinese Han population*, *Medical Oncology*, 31(12), 306, 2014.
64. Ting C.Y., Liew S.M., Price A., Gan G.G., Bee-Lan Ong D., Tan S.Y., Bee P.C., *Clinical significance of aberrant microRNAs expression in predicting disease relapse/refractoriness to treatment in diffuse large B-cell lymphoma: A meta-analysis*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 144:102818, 2019.
65. Huskova H., Korecka K., Karban J., Vargova J., Vargova K., Dusilkova N., Trneny M., Stopka T., *Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas*, *International Journal of Hematology*, 102(4), 2015, s. 441-450.
66. Costinean S., Zanasi N., Pekarsky Y., Tili E., Volinia S., Heerema N., Croce C.M., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 2006, s. 7024-1029.
67. Babar I.A., Cheng C.J., Booth C.J., Liang X., Weidhaas J.B., Saltzman W.M., Slack F.J., *Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 2012, E1695-1704.
68. Lu D., Nakagawa R., Lazzaro S., Staudacher P., Abreu-Goodger C., Henley T., Boiani S., Leyland R., Galloway A., Andrews S., Butcher G., Nutt S.L., Turner M., Vigorito E., *The*

- miR-155-PU.1 axis acts on Pax5 to enable efficient terminal B cell differentiation*, Journal of Experimental Medicine, 211(11), 2014, s. 2183-2198.
69. Zhang J., Wei B., Hu H., Liu F., Tu Y., Zhao M., Wu D., *Preliminary study on decreasing the expression of FOXP3 with miR-155 to inhibit diffuse large B-cell lymphoma*, Oncology Letters, 14(2), 2017, s. 1711-1718.
 70. Huang X., Shen Y., Liu M., Bi C., Jiang C., Iqbal J., McKeithan T.W., Chan W.C., Ding S.J., Fu K., *Quantitative proteomics reveals that miR-155 regulates the PI3K-AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma*, The American Journal of Pathology, 181(1), 2012, s. 26-33.
 71. Zheng X., Rui H., Liu Y., Dong J., *Proliferation and Apoptosis of B-Cell Lymphoma Cells under Targeted Regulation of FOXO3 by miR-155*, Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, 12(1), 2020, e2020073.
 72. Musilova K., Mraz M., *MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex*, Leukemia, 29(5), 2015, s. 1004-1017.
 73. Malumbres R., Sarosiek K.A., Cubedo E., Ruiz J.W., Jiang X., Gascoyne R.D., Tibshirani R., Lossos I.S., *Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas*, Blood, 113(16), 2009, s. 3754-3764.
 74. Xiao C., Calado D.P., Galler G., Thai T.H., Patterson H.C., Wang J., Rajewsky N., Bender T.P., Rajewsky K., *MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb*, Cell, 131(1), 2007, s. 146-159.
 75. Sewastianik T., Prochorec-Sobieszek M., Juszczyński P., *Rola deregulacji czynnika transkrypcyjnego MYC w nowotworach układu chłonnego – konsekwencje molekularne, patogenetyczne, kliniczne i terapeutyczne*, Hematologia, 3(4), 2012, s. 313-326.
 76. Lin C.Y., Lovén J., Rahl P.B., Paranal R.M., Burge C.B., Bradner J.E., Lee T.I., Young R.A., *Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc*, Cell, 151 (1), 2012, s. 56-67.
 77. Patel J.H., Loboda A.P., Showe M.K., Showe L.C., McMahon S.B., *Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC*, Nature Reviews Cancer, 4(7), 2004, s. 562-568.
 78. Adhikary S., Eilers M., *Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6(8), 2005, s. 635-645.
 79. Nie Z., Hu G., Wei G., Cui K., Yamane A., Resch W., Wang R., Green D.R., Tessarollo L., Casellas R., Zhao K., Levens D., *c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells*, Cell, 151(1), 2012, s. 68-79.
 80. Mraz M., Chen L., Rassenti L.Z., Ghia E.M., Li H., Jepsen K., Smith E.N., Messer K., Frazer K.A., Kipps T.J., *miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXPI*, Blood, 124(1), 2014, s. 84-95.
 81. Musilova K., Devan J., Cerna K., Seda V., Pavlasova G., Sharma S., Oppelt J., Pytlik R., Prochazka V., Prouzova Z., Trbusek M., Zlamalikova L., Liskova K., Kruzova L., Jarosova M., Mareckova A., Kornauth C., Simonitsch-Klupp I., Schiefer A.I., Merkel O., Mocikova H., Burda P., Machova Polakova K., Kren L., Mayer J., Zent C.S., Trneny M., Evans A.G., Janikova A., Mraz M., *MiR-150 downregulation contributes to the high-grade transformation of follicular lymphoma by upregulating FOXPI levels*, Blood, 132(22), 2018, s. 2389-2400.
 82. Barrans S.L., Fenton J.A., Banham A., Owen R.G., Jack A.S., *Strong expression of FOXPI identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome*, Blood, 104(9), 2004, s. 2933-2935.
 83. Kopeć-Szłęzak J., Woźniak J., *Znaczenie receptora CXCR4 (CD184) w układzie krwiotwórczym*, Acta Haematologica Polonica, 37(4), 2006, s. 475-483.

84. Tano N., Kim H.W., Ashraf M., *MicroRNA-150 regulates mobilization and migration of bone marrow-derived mononuclear cells by targeting Cxcr4*, PLoS One, 6(10), 2011, e23114.
85. Pan X., Wang ZX., Wang R., *MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer*, Cancer Biology & Therapy, 10(12), 2010, s. 1224-1232.
86. Liu K., Du J., Ruan L., *MicroRNA 21 regulates the viability and apoptosis of diffuse large B cell lymphoma cells by upregulating B cell lymphoma 2*, Experimental and Therapeutic Medicine, 14(5), 2017, s. 4489-4496.
87. Banham A.H., Connors J.M., Brown P.J., Cordell J.L., Ott G., Sreenivasan G., Farinha P., Horsman D.E., Gascoyne R.D., *Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma*, Clinical Cancer Research, 11(3), 2005, s. 1065-1072.
88. Teng H., Wang P., Xue Y., Liu X., Ma J., Cai H., Xi Z., Li Z., Liu Y., *Role of HCP5-miR-139-RUNX1 Feedback Loop in Regulating Malignant Behavior of Glioma Cells*, Molecular Therapy, 24(10), 2016, s. 1806-1822.
89. Tuncer S.B., Akdeniz D., Celik B., Kilic S., Sukruoglu O., Aysar M., Ozer L., Ekenel M., Ozel S., Yazici H., *The expression levels of miRNA-15a and miRNA-16-1 in circulating tumor cells of patients with diffuse large B-cell lymphoma*, Molecular Biology Reports, 46(1), 2019, s. 975-980.
90. Lawrie C.H., Soneji S., Marafioti T., Cooper C.D., Palazzo S., Paterson J.C., Cattan H., Enver T., Mager R., Boulwood J., Wainscoat J.S., Hatton C.S., *MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma*, International Journal of Cancer, 121(5), 2007, s. 1156-1161.
91. Sun S., Wang H., Ji M., *Overexpression of miR-222-3p Promotes the Proliferation and Inhibits the Apoptosis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cells via Suppressing PPP2R2A*, Technology in Cancer Research & Treatment, 18, 2019, 1533033819892256.
92. Janssens V., Goris J., Van Hoof C., *PP2A: the expected tumor suppressor*, Current Opinion in Genetics & Development, 15(1), 2005, s. 34-41.
93. Dong R., Zheng Y., Chen G., Zhao R., Zhou Z., Zheng S., *MiR-222 overexpression may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting PPP2R2A*, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 60(1), 2015, s. 84-90.
94. Shen S., Yue H., Li Y., Qin J., Li K., Liu Y., Wang J., *Upregulation of miR-136 in human non-small cell lung cancer cells promotes Erk1/2 activation by targeting PPP2R2A*, Tumour Biology, 35(1), 2014, 631-640.
95. Ni H., Wang X., Liu H., Tian F., Song G., *Low expression of miRNA-224 predicts poor clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP*, Biomarkers, 20(4), 2015, s. 253-257.
96. Giricz O., Reynolds P.A., Ramnauth A., Liu C., Wang T., Stead L., Childs G., Rohan T., Shapiro N., Fineberg S., Kenny P.A., Loudig O., *HSA-MIR-375 is differentially expressed during breast lobular neoplasia and promotes loss of mammary acinar polarity*, The Journal of Pathology, 226(1), 2012, s. 108-119.
97. Iorio M.V., Visone R., Di Leva G., Donati V., Petrocca F., Casalini P., Taccioli C., Volinia S., Liu C.G., Alder H., Calin G.A., Ménard S., Croce C.M., *MicroRNA signatures in human ovarian cancer*, Cancer Research, 67(18), 2007, s. 8699-8707.
98. Mavridis K., Stravodimos K., Scorilas A., *Downregulation and prognostic performance of microRNA-224 expression in prostate cancer*, Clinical Chemistry, 59(1), 2013, s. 261-169.
99. Liu F., Liu Y., Shen J., Zhang G., Han J., *MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating Fizzled 5 expression*, Oncotarget, 7(31), 2016, s. 49130-49142.

Znaczenie cząsteczek miRNA jako biomarkerów w patogenezie, diagnostyce i terapii chłoniaka rozlanego z dużych komórek B

Streszczenie

Chłoniaki rozlane z dużych komórek B (DLBCL) to nowotwory wywodzące się z obwodowych, niedojrzałych limfocytów B, charakteryzujących się różnorodnością cech genetycznych, morfologicznych, klinicznych i biologicznych. Złożona patogeneza DLBCL do dziś pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Ponadto coraz częściej zwraca się uwagę na rolę małych, endogennych i niekodujących cząsteczek mikroRNA (miRNA), które odgrywają ważną rolę zarówno w stanie fizjologicznym, jak i patologicznym. MiRNA uczestniczą w szeregu ważnych procesów komórkowych w tym: apoptozie, różnicowaniu i proliferacji komórek. Cząsteczki mikroRNA są obiecującymi biomarkerami diagnostycznymi a także umożliwiają lepsze poznanie mechanizmów patogenetycznych DLBCL. MiRNA stanowią również nadzieję na powstanie celowanych, zoptymalizowanych schematów terapeutycznych oraz sprecyzowanie biomarkerów rokowniczych i predykcyjnych. Jednakże niezbędne są dalsze badania umożliwiające lepsze zrozumienie wpływu poziomu ekspresji miRNA na docelowe geny kontrolujące kluczowe szlaki komórkowe.

Niniejsza praca ma na celu przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej roli cząsteczek miRNA w patogenezie DLBCL. W publikacji przedstawiono charakterystykę miRNA, które w ostatnich latach były przedmiotem wielu badań w opisywanej jednostce chorobowej, w tym m.in.: miR-146a/b, miR-155, miR-150, miR-21-5p, miR-28, miR-34a, miR-27b, miR-15a, miR-16-1, miR-221, miR-222, a także miR-224.

Słowa kluczowe: mikroRNA, chłoniak rozlany z dużych komórek B, biomarkery, diagnostyka, terapia

The miRNAs importance as biomarkers in the pathogenesis, diagnosis and therapy of diffuse large B-cell lymphoma

Abstract

Diffuse large B cell lymphomas (DLBCL) are malignancies arising from peripheral immature B lymphocytes characterised by a variety of genetic, morphological, clinical and biological characteristics. The complex pathogenesis of DLBCL remains incompletely understood to this day. In addition, more and more attention is paid to the role of small, endogenous and non-coding microRNAs (miRNAs), which play an important role in both physiological and pathological states. MiRNAs are involved in a number of important cellular processes including apoptosis, cell differentiation and proliferation. MicroRNA molecules are promising diagnostic biomarkers and also enable a better understanding of the pathogenetic mechanisms of DLBCL. MiRNAs also offer hope for the development of targeted, optimised therapeutic regimens and the definition of prognostic and predictive biomarkers. However, more research is needed to better understand the effects of miRNA expression levels on target genes controlling key cellular pathways. This scientific work aims to gather the latest collective knowledge on the role of miRNAs in the pathogenesis of DLBCL.

This scientific work aims to present the current knowledge on the role of miRNAs in the pathogenesis of DLBCL. The publication presents the characteristics of miRNAs that have been the subject of many studies in the described disease in recent years, including: miR-146a / b, miR-155, miR-150, miR-21-5p, miR-28, miR-34a, miR-27b, miR-15a, miR-16-1, miR-221, miR-222, and also miR-224.

Keywords: microRNA, diffuse large B-cell lymphoma, biomarkers, diagnostics, therapy

Histopatologiczna ewaluacja tkanki raka piersi po chemioterapii

1. Wstęp

Celem przedstawionej pracy było wykazanie przydatności wykonywania ewaluacji histopatologicznej dla tkanki raka piersi po chemioterapii. Wykonanie serii pomiarów histopatologicznych z odpowiednio dobranymi parametrami pozwala, na podstawie otrzymanych obrazów, ocenić postępy terapii.

Chemioterapia neoadiuwantowa (NAC) jest szeroko stosowana w leczeniu raka piersi. Biopsja węzłów wartowniczych zastąpiła rozwarstwienie węzłów chłonnych pachowych u pacjentów, u których po NAC nastąpiła konwersja do stanu bez węzłów chłonnych [1]. Obecnie chirurgia, radioterapia i chemioterapia są najczęściej stosowanymi metodami leczenia raka piersi. Powszechnie wiadomo, że po tych zabiegach mogą wystąpić poważne komplikacje. Dobrze znane są wczesne i późne powikłania radioterapii. Powikłania te mogą być związane z bezpośrednim lub pośrednim wpływem promieniowania. Zespół zwłóknienia popromiennego to postępujące stwardnienie zwłóknienia tkanki wraz z różnymi objawami klinicznymi w polu napromieniania. Zwykle jest to późne wykrycie radioterapii i może być widoczne tygodnie lub nawet lata po leczeniu. Może to wpływać na wiele układów, takich jak układ mięśniowo-szkieletowy, tkanki miękkie, tkanki nerwowe i układ krążenia.

2. Ewaluacja tkanki raka piersi po chemioterapii

Ocena histopatologiczna przeprowadzona po wycięciu i otwartej biopsji z guza wykazuje często zwłóknienie będące wynikiem radioterapii [2]. MRI jest przydatne do oceny resztkowego raka po NAC. Wzmocnienie masy z wyższą komórkowością po NAC można ocenić dokładniej, co jest odpowiednie do oceny lumpektomii. Jednak w przypadku NME, który ma mniejszą komórkowość, wymagane są inne podejścia [3]. W badaniu tym stwierdzono, że znajomość spektrum morfologicznego zmian tkanki piersi wywołanych leczeniem jest ważna dla patologa, aby uniknąć błędnej diagnozy. Pomoże to lekarzowi w podjęciu racjonalnej decyzji dotyczącej leczenia miejscowo zaawansowanego raka piersi [4].

MRI może z dużą dokładnością przewidywać pCR u pacjentów HER-2 dodatnich, ale ma wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych u pacjentów HER-2 ujemnych, zwłaszcza u pacjentów otrzymujących leki antyangiogenne. Wyniki wskazują, że chemioterapia powinna być brana pod uwagę podczas stosowania MRI do interpretacji wyników terapeutycznych. Potrzeba więcej badań, aby ustalić rolę MRI w leczeniu pacjentów otrzymujących NAC, zwłaszcza w planowaniu operacji [5].

¹ Kliniczny Szpital Wojewódzki im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie, Zakład Fotomedycyny i Chemii Fizycznej.

² Kliniczny Szpital Wojewódzki im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie, Zakład Biochemii i Chemii Ogólnej.

³ Kolegium Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych, Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Uniwersytet Rzeszowski.

Neoadiuwantowa terapia systemowa (NST) jest standardową metodą leczenia miejscowo zaawansowanego raka piersi i częstą opcją w przypadku pierwotnie operowanej choroby. Ważne jest, aby opracować standardowe techniki obrazowania, które mogą monitorować i oceniać odpowiedź na NST, umożliwiając leczenie dostosowane do każdego pacjenta i ułatwiając planowanie operacji [6]. Zastosowanie parametrycznej techniki MRI umożliwiło standaryzację segmentacji i ilościową ocenę zmian perfuzji tkanki nowotworowej piersi w odpowiedzi na NST. To, czy ta technika może służyć do przewidywania nawrotu raka piersi i wskaźników przeżycia, wymaga dalszych badań klinicznych [6]. Wzrasta stosowanie chemioterapii jako leczenia podstawowego we wczesnym i miejscowo zaawansowanym raku piersi. Dopasowane pary tkanki piersi przed i po terapii oceniano pod kątem zmian morfologicznych w resztkowym przedziale tkanki złośliwej i łagodnej sutka [7]. Wartość diagnostyczna mammografii w ocenie odpowiedzi guza na chemioterapię indukcyjną zależy przede wszystkim od zakresu, w jakim można go wyodrębnić z sąsiedniej tkanki sutka. W przypadku guzów, których marginesy można określić o ponad 50% na podstawie mammografii podstawowej, wiarygodność diagnostyczna mammografii jest wysoka. Nieprawidłowo zdefiniowane masy najlepiej oceniać innymi procedurami obrazowania, takimi jak ultrasonografia lub rezonans magnetyczny [8]. Ocena obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MR) ze wzmocnieniem ultramałym superparamagnetycznym tlenkiem żelaza (USPIO) w przedoperacyjnej ocenie zaawansowania węzłów chłonnych pachowych u pacjentów z rakiem piersi z wykorzystaniem wyników histopatologicznych jako standardu odniesienia [9]. Wyniki te są znacznie wyższe niż w przypadku innych metod obrazowania [10]. Coraz częstsze stosowanie radioterapii (RT) i chemioterapii ogólnoustrojowej (CT) w leczeniu raka piersi wymaga od chirurgów i cytologów znajomości zmiennych zmian histologicznych inicjowanych przez te leki [11].

Rak piersi jest najczęstszą chorobą nowotworową u kobiet, stanowiącą około 26% wszystkich rozpoznawanych corocznie nowotworów i stanowi drugą po raku płuc przyczynę zgonów kobiet. Choć rokowanie w chorobie poprawiło się w ostatnich latach, znaczna liczba pacjentów będzie cierpieć na rozwój choroby i umrze z powodu tego nowotworu złośliwego, który pozostaje oporny na różne leki cytostatyczne, co jest główną przyczyną niepowodzeń terapeutycznych u ponad 90% pacjentów z rozwojem nowotworowym na tym poziomie [12]. Jin Long Capsule (JLC) może hamować oporność wielolekową, poprawiać skuteczność chemioterapii neoadiuwantowej i zmniejszać niepożądane reakcje raka piersi [13].

Terapia fotodynamiczna (PDT) połączona ze strategiami natleniania jest szeroko stosowana w leczeniu raka; jednakże PDT wzmocniony tlenem nie przyniósł idealnego efektu ze względu na złożoność, niejednorodność i nieodwracalne środowisko hipoksji generowane przez tkanki guza [14]. Photodynamic therapy (PDT) is a technique for producing localized necrosis with light after prior administration of a photosensitizing agent. This study investigates the nature, safety, and efficacy of PDT for image-guided treatment of primary breast cancer [15]. W porównaniu z binarną terapią raka indukowanego fotonami, taką jak terapia fototermiczna (PTT) i terapia fotodynamiczna (PDT), terapia wychwytywaniem neutronów boru (BNCT) pojawia się jako alternatywna nieinwazyjna strategia leczenia, która może przewyżczyć płytką penetrację światła [16].

Superparamagnetyczne nanocząsteczki tlenku żelaza (SPION) zostały niedawno uznane za wysoce wydajne środki do terapii fototermicznej [17]. Terapia fotodynamiczna (PDT) jako obiecująca nieinwazyjna i skuteczna metoda leczenia została zatwierdzona klinicznie do leczenia raka. Jednak słaba selektywność guza i oporność wywołana niedotlenieniem ogromnie ograniczają skuteczność PDT. Aby jeszcze bardziej zwiększyć siłę PDT, opracowaliśmy system dostarczania leków oparty na liposomach, łączący PDT i chemioterapeutyki [18]. W tym badaniu nanocząstki złota zostały sfunkcjonalizowane mieszaną monowarstwą ftalocyjaniny cynku i pochodnej laktozy. Badania ukierunkowane wykazały ekscytujący potencjał laktozy jako swoistego środka nakierowanego na receptory wiążące galaktozę, które ulegają nadekspresji na komórkach raka piersi [19]. Tradycyjna terapia fotodynamiczna (PDT) boryka się z krytycznymi problemami związanymi z małą głębokością światła wnikającego w tkanki i potencjalną fototoksycznością, które mają zostać rozwiązane poprzez opracowanie nowych metod terapeutycznych opartych na terapii dynamicznej, takich jak terapia sonodynamiczna [20]. Mając na uwadze ograniczenia kultur komórek jednowarstwowych i badań na zwierzętach wymagających dużej ilości zasobów, opracowano system hodowli mikroprzepływowych do tworzenia fizjologicznie istotnych trójwymiarowych (3D) tkanek [21]. Terapia fotodynamiczna (PDT) cieszy się coraz większym zainteresowaniem jako obiecująca metoda leczenia raka. Jednak ze względu na słabą penetrację tkanek przez światło PDT jest rzadko stosowane w leczeniu guzów głęboko osadzonych [22].

ALA-PDT uszkadza i zabija niektóre, ale nie wszystkie neurony i powoduje ograniczone zmiany mikronacyniowe w korze mózgowej myszy. Zmienia ekspresję niektórych białek zaangażowanych w epigenetyczną regulację transkrypcji, modyfikację histonów, naprawę DNA, import białek jądrowych i proliferację [23]. Celem tego badania było wykazanie, że nowe sensybilizatory do terapii fotodynamicznej (PDT) mogą być aktywowane przez absorpcję dwufotonową w obszarze bliskiej podczerwieni widma i po raz pierwszy wykazanie, że taka aktywacja może prowadzić do regresji guza na znacznej głębokości tkanek. W tych eksperymentach oceniano również wpływ naświetlania normalnych tkanek laserem impulsowym o wysokiej energii femtosekundowej i scharakteryzowano odpowiedź guzów ksenogenicznych na nasze protokoły PDT [24]. Ocena skuteczności terapii fotodynamicznej (PDT) z werteporfiną w leczeniu podmakawkowych przerzutów raka piersi do naczyń [25]. Postawiliśmy hipotezę, że receptor estrogenowy (ER) w komórkach raka piersi wrażliwych na hormony może być celem selektywnego fotodynamicznego zabijania komórek nowotworowych za pomocą koniugatów antyestrogen-porfiryna poprzez połączenie nadekspresji ER we wrażliwych na hormony komórkach raka piersi i właściwości zatrzymywania guza fotouczulaczy porfiryny. W tym badaniu opisujemy, że koniugat tamoksyfenu (TAM)-pirofeoforbid, który specyficznie wiąże się z ER alfa, powodował selektywne zabijanie komórek raka piersi MCF-7 pod wpływem światła. Dlatego jest potencjalnym kandydatem do ukierunkowanej na ER terapii fotodynamicznej nowotworów (PDT) tkanek i narządów, które odpowiadają na estrogeny/antyestrogeny [26]. Ponieważ rola sacharydów w rozpoznawaniu komórek, metabolizmie i znakowaniu komórek jest dobrze znana, koniugacja sacharydów z lekami jest aktywnym obszarem badań. Tak więc, jednym celem stosowania koniugatów sacharyd-lek jest nadanie większej specy-

ficzności wobec danego typu komórek lub innych celów [27]. Progresja raka piersi w ścianie klatki piersiowej dotyka do 5% pacjentek z rakiem piersi i jest głównym źródłem ich bólu. Opcje leczenia są ograniczone lub mogą nie być oferowane tym pacjentom. Terapia fotodynamiczna indukowana niskimi dawkami Photofrin (PDT) zapewnia doskonałą odpowiedź kliniczną przy minimalnej chorobowości. Przedstawiamy nasze dalsze doświadczenia z PDT w tym ustawieniu [28]. Progresja raka piersi w ścianie klatki piersiowej po niepowodzeniu operacji ratunkowej, radioterapii i terapii chemohormonalnej jest grzęzawiskiem o ograniczonych możliwościach terapeutycznych. Ponieważ terapia fotodynamiczna (PDT) zapewnia doskonale wyniki w zmianach skórnych, PDT może odgrywać rolę w tym wskazaniu. Jednak według wiedzy autorów opublikowane dane dla tej podgrupy pacjentów stosujących jedyny dostępny na rynku środek fotouczulający Photofrin, często wykazują wysoką chorobowość, co ogranicza przydatność PDT. Autorzy podają możliwość zmniejszenia dawki leku fotouczulającego jako sposób wykorzystania kinetyki fotowycielania w celu poprawy współczynnika terapeutycznego u tych osób [29]. Terapia fotodynamiczna (PDT) nowotworów złośliwych jest nową techniką leczenia raka. Po wstrzyknięciu dożylnym, fotouczulacz jest selektywnie zatrzymywany przez komórki guza, więc z czasem w guzie jest więcej uczulacza niż w normalnej sąsiadującej tkance. Fotouczulacz musi być zdolny do pochłaniania fali światła, które do niego dociera, a ilość światła docierającego do fotouczulacza zależy od właściwości tkanki, przez którą przechodzi. Pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali czynnik uczulający wytwarza aktywowane formy tlenu, tlen singletowy, który utlenia krytyczne elementy komórek nowotworowych [31, 32]. Systemy dostarczania leków, w których pośredniczą neutrofile, zyskały szerokie zainteresowanie ze względu na ich wyższą skuteczność w leczeniu raka. Wiadomo, że neutrofile, białe krwinki najczęściej występujące we krwi obwodowej, migrują do guzów w stanie zapalnym. W tym miejscu opracowujemy nowatorską strategię zwiększania naciekania neutrofili przez nowotwór za pomocą terapii fotodynamicznej/fototermicznej (PDT/PTT), aby dostarczyć nanokompleksy ibrutynibu (IBR) do immunoterapii raka [33]. Aby opracować metodę leczenia potrójnie ujemnego raka piersi, zbadaliśmy skuteczność dwufunkcyjnych nanosond teranostycznych (BN) podczas terapii fotodynamicznej (PDT) na raka piersi u ludzi i normalne komórki ludzkie [34, 35].

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym dotykającym kobiety, a podtyp potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC) jest szczególnie agresywny. Celem tego badania była ocena zróżnicowanego wzoru ekspresji mikroRNA (miRNA) między nieleczonymi komórkami MDA-MB-231 (model komórek TNBC) a tymi, które przeżyły terapię fotodynamiczną (PDT), aby uzyskać wgląd w mechanizmy przeżycia komórek [36]. W terapii fotodynamicznej (PDT) cząsteczki fotouczulacza (PS) są naświetlane światłem w celu wytworzenia reaktywnych form tlenu (RFT), których obecność prowadzi następnie do śmierci komórki. Obecnie metoda ta jest ograniczona do leczenia chorób skóry z powodu małej penetracji tkanek światła widzialnego lub ultrafioletowego wymaganego do wytworzenia RFT [37].

Rak piersi to rak z przerzutami, który może rozprzestrzeniać się na inne narządy, takie jak kości, wątroba i mózg. Istnieje wiele metod leczenia raka piersi, takich jak chirurgia i chemioterapia, ale prowadzą one do oporności i skutków ubocznych. Dlatego ogromne

znaczenie ma odkrycie nowych terapii o wysokiej skuteczności i niskiej toksyczności, które wybiórczo wpływają na komórki rakowe [38].

Werteporfina (VP) jest od dawna stosowana klinicznie w leczeniu zwyrodnienia plamki związane z wiekiem (AMD) za pomocą terapii fotodynamicznej (PDT) [39]. Rozprzestrzenianie się pierwotnego nowotworu złośliwego jest główną przyczyną większości zgonów związanych z rakiem. Do dziś schemat leczenia i dostępne leki są nadal niewystarczające, aby poradzić sobie z tymi schorzeniami. W pracy przedstawiono nową koncepcję terapeutyczną opartą na terapii fotodynamicznej (PDT) komórek inicjujących przerzuty [40]. Maksymalizacja akumulacji leku przeciwnowotworowego w guzie jest priorytetem w celu osiągnięcia minimalnie inwazyjnej terapii przeciwnowotworowej, co stawia wysokie wymagania w zakresie zdolności systemów dostarczania leków do celowania w guz. W tym przypadku przyjęliśmy nową strategię „lekomórka” poprzez konstrukcję nanoplatformy, aby osiągnąć wysoką agregację i dystrybucję wewnątrz guza [42]. Kierując się charakterystycznymi działaniami fizjologicznymi, właściwościami biologicznymi i unikalnymi modalnościami teranostycznymi, nanocząstki krzemu (SiNP) są jednym z obiecujących materiałów do opracowania nowatorskich wielofunkcyjnych nanoplatform do zastosowań biomedycznych. W tej pracy oceniliśmy możliwość wykorzystania syntetyzowanych laserowo nanocząstek Si jako fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej wzbudzonej dwufotonowo (TPE-PDT). Tutaj zastosowaliśmy prostą strategię syntezy ultraczystych i monodispersyjnych SiNP przy użyciu sekwencji ablacji laserowej i fragmentacji płytki krzemowej w roztworze wodnym, co zapobiega jakimkolwiek specyficznemu etapowi oczyszczania. Analiza strukturalna ujawniła kulisty kształt nanocząstek o wąskim rozkładzie wielkości skupionym na średniej średnicy wielkości 62 nm \pm 0,42 nm, a ujemny ładunek powierzchniowy $-40 \pm 0,3$ mV zapewniał dużą stabilność bez sedymentacji przez długi okres czasu. Badania *in vitro* na liniach ludzkich komórek nowotworowych (piersi i wątroby) oraz zdrowych komórkach ujawniły ich niską cytotoxycyzość bez żadnego bodźca świetlnego i ich potencjał terapeutyczny w trybie TPE-PDT przy 900 nm z obiecującą śmiercią komórek wynoszącą 45% w przypadku MCF-7 komórki raka piersi, jako konsekwencja wewnątrzkomórkowego uwalniania reaktywnych form tlenu. Ich emisja luminescencji wewnątrz komórek była wyraźnie obserwowana w regionie UV-Vis. W porównaniu z nanocząsteczkami Si syntetyzowanymi drogami chemicznymi, które są często połączone z dodatkowymi modułami o właściwościach fotochemicznych i fotobiologicznych w celu wzmocnienia efektu fotodynamicznego, SiNP syntetyzowane laserowo wykazują obiecujące właściwości terapeutyczne i obrazowe umożliwiające opracowanie zaawansowanej strategii w dziedzinie nanomedycyny. Celem badania jest ocena skuteczności fotodynamicznej purpuryny 18 (pu-18) w leczeniu potrójnie ujemnego raka piersi zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Do oceny fotodynamicznego działania pu-18 *in vitro* zastosowano dwa stany komórek 4T1, hodowlę 2D i sferoidy 3D. Wyniki badania *in vitro* wykazały, że w przypadku hodowli komórek 4T1 2D terapia fotodynamiczna (PDT) wykazała znaczną fotocytotoksyczność przy niskich stężeniach pu-18 po napromieniowaniu światłem [43]. Ukierunkowana terapia fotodynamiczna (TPDT) to nieinwazyjna i specyficzna dla miejsca metoda leczenia, która została wykorzystana do eradykacji komórek nowotworowych za pomocą fotoaktywowanych chemikaliów lub fotouczulaczy (PS), w obecności naświetlania

światłem laserowym i tlenu w tkankach molekularnych [44]. Po naświetleniu wybiórczo wywołali znaczną regresję guza guzów z nadekspresją HER2 podczas jednej sesji terapeutycznej. Dlatego sugeruje się, że PDT ukierunkowane na nanociała jako nowe dodatkowe leczenie raka piersi HER2-dodatniego, szczególnie interesujące w przypadku raka piersi HER2-dodatniego opornego na trastuzumab. Obecnie potrzebne są dalsze badania, aby ocenić wartość tego podejścia w praktyce klinicznej [45]. Terapia fotodynamiczna (PDT) jest skuteczna w leczeniu różnych rodzajów raka, takich jak rak podstawnokomórkowy i inne powierzchowne nowotwory. Jednak nadal potrzebne są ulepszenia w dostarczaniu fotouczulaczy, a zastosowanie PDT przeciwko głębiej zlokalizowanym guzom było przedmiotem wielu badań [46]. Rak piersi jest jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów u kobiet, charakteryzującym się dużą zachorowalnością i śmiertelnością. Przerzuty guza są powiązane z większością zgonów spowodowanych rakiem piersi; tak więc hamowanie przerzutów może zapewnić kierunek terapeutyczny w przypadku raka piersi. W niniejszym badaniu do zahamowania przerzutów w komórkach raka piersi MCF-7 zastosowano terapię fotodynamiczną, w której pośredniczy pirofeoforbid- α ester metylowy (MPPa-PDT) [47]. Immunoterapia raka przyniosła obiecujące odpowiedzi kliniczne w ostatnich latach dzięki możliwości kontrolowania przerzutów [48]. Terapia fotodynamiczna (PDT), jako metoda przeciwnowotworowa oparta na fotowzbudzeniu uczulającym światłem kierowanym przez guz, ma tę zaletę, że jest specyficzna dla danego miejsca w porównaniu z konwencjonalną chemioterapią lub radioterapią [49]. Bez wątplenia rak to globalny kryzys, który wymaga natychmiastowej interwencji. Pomimo stosowania konwencjonalnych metod leczenia w ciągu ostatnich dziesięcioleci, można przyznać, że są one drogie, inwazyjne, wiążą się z wieloma skutkami ubocznymi, a tym samym obniżają jakość życia [50]. Niedotlenienie, jako ważna cecha w miejscach guza, znacznie utrudnia działanie fotouczulaczy, wpływając w ten sposób na skuteczność terapii fotodynamicznej (PDT). Dlatego zaprojektowanie i przygotowanie nowego fotouczulacza o wysokiej światłoczułości w warunkach niedotlenienia stanowi wielkie wyzwanie, które wymaga pilnego rozwiązania [51].

Rak jest chorobą bardzo trudną do leczenia, zarówno pod względem skuteczności leczenia, jak i skutków ubocznych. Aby przezwyciężyć te problemy, przeprowadzono szeroko zakrojone badania dotyczące możliwości ulepszenia leczenia poprzez zastosowanie terapii skojarzonej oraz poprzez badanie metod terapeutycznych o zmniejszonych skutkach ubocznych (takich jak terapia fotodynamiczna (PDT) [52]. Przerzuty raka nadal stanowią przeszkodę dla dobrego rokowania i jakości życia chorych na raka piersi. Aby poprawić efekt terapeutyczny raka piersi, potrzebne są strategie leczenia, które mogą hamować raka piersi z przerzutami podczas leczenia raka pierwotnego [53].

3. Wnioski

W ostatnich latach obserwujemy coraz większą liczbę zachorowań na raka piersi, który jest jednym z najczęściej występujących rodzajów nowotworu wśród kobiet. Dlatego niezwykle istotne okazują się skuteczna diagnostyka i wdrożenie odpowiedniego schematu leczenia oraz monitorowanie stosowanych terapii w jak najwcześniejszym stadium raka. W tym celu proponujemy wdrożenie badań histopatologicznych *in vitro* z wykorzystaniem metody rezonansu magnetycznego w celu optymalizacji diagnostyki.

Literatura

1. Ha S.M., Cha J.H., Kim H.H., Shin H.J., Chae E.Y., Choi W.J., *Diagnostic performance of breast ultrasonography and MRI in the prediction of lymph node status after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer*, Acta Radiol., 58(10), 2017, s. 1198-1205.
2. Sarsenov D., Aktepe F., Özmen V., *Radiation Fibrosis Syndrome Imitating Breast Cancer Recurrence; A Case Report*, J Breast Health, 13(1), 2017, s. 40-42.
3. Zhou J., Li G., Sheng F., Qiao P., Zhang H., Xing X., *Magnetic resonance imaging evaluation of residual tumors in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy: surgical implications*, Acta Radiol., 57(5), 2016, s. 529-537.
4. Hafiz F., Choudhury T., Kamal M., Banu S.G., *The spectrum of pathological changes in breast cancer following neoadjuvant chemotherapy*, Mymensingh Med J., 23(2), 2014, s. 272-280.
5. Chen J.H., Feig B., Agrawal G., Yu H., Carpenter P.M., Mehta R.S., Nalcioglu O., Su M.Y., *MRI evaluation of pathologically complete response and residual tumors in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy*, Cancer, 112(1), 2008, s. 17-26.
6. Chou C.P., Wu M.T., Chang H.T., Lo Y.S., Pan H.B., Degani H., Furman-Haran E., *Monitoring breast cancer response to neoadjuvant systemic chemotherapy using parametric contrast-enhanced MRI: a pilot study*, Acad Radiol., 14(5), 2007, s. 561-573.
7. Moll U.M., Chumas J., *Morphologic effects of neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer*, Pathol Res Pract., 193(3), 1997, s. 187-196.
8. Huber S., Wagner M., Zuna I., Medl M., Czembirek H., Delorme S. *Locally advanced breast carcinoma: evaluation of mammography in the prediction of residual disease after induction chemotherapy*, Anticancer Res., 20(1B), 2000, s. 553-538.
9. Michel S.C., Keller T.M., Fröhlich J.M., Fink D., Caduff R., Seifert B., Marinček B., Kubik-Huch R.A., *Preoperative breast cancer staging: MR imaging of the axilla with ultra-small superparamagnetic iron oxide enhancement*, Radiology, 225(2), 2002, s. 527-536.
10. Bongers V., Perre C., de Hooge P., *The use of scintimammography for detecting the recurrence of loco-regional breast cancer: histopathologically proven results*, Nucl Med Commun., 25(2), 2004, s. 145-149.
11. Moore G.H., Schiller J.E., Moore G.K., *Radiation-induced histopathologic changes of the breast: the effects of time*, Am J Surg Pathol., 28(1), 2004, s. 47-53.
12. Zob D., Vasilescu M., Gruia M., Anghel R., *Breast cancer. Screening criteria*, Chirurgia (Bucur), 108(4), 2013, s. 557-562.
13. Yang T.Y., Yi W., Wen J., Gan C.Y., Yang Y.C., Dai M., *Therapeutic effect of Jin Long capsule combined with neoadjuvant chemotherapy on invasive breast cancer and the expression change of multidrug resistance proteins*, Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 41(2), 2019, s. 118-123.
14. Xu T., Ma Y., Yuan Q., Hu H., Hu X., Qian Z., Rolle J.K., Gu Y., Li S., *Enhanced Ferroptosis by Oxygen-Boosted Phototherapy Based on a 2-in-1 Nanoplatfrom of Ferrous Hemoglobin for Tumor Synergistic Therapy*, ACS Nano., 14(3), 2020, s. 3414-3425.
15. Banerjee S.M., El-Sheikh S., Malhotra A., Mosse C.A., Parker S., Williams N.R., MacRobert A.J., Hamoudi R., Bown S.G., Keshitgar M.R., *Photodynamic Therapy in Primary Breast Cancer*, J Clin Med., 9(2), 2020, s. 483.
16. Li L., Li J., Shi Y., Du P., Zhang Z., Liu T., Zhang R., Liu Z., *On-Demand Biodegradable Boron Nitride Nanoparticles for Treating Triple Negative Breast Cancer with Boron Neutron Capture Therapy*, ACS Nano., 13(12), 2019, s. 13843-13852.
17. Bilici K., Muti A., Sennaroğlu A., Yagci Acar H., *Indocyanine green loaded APTMS coated SPIONs for dual phototherapy of cancer*, J Photochem Photobiol B., 201, 2019, s. 111648.

18. Yang Y., Yang X., Li H., Li C., Ding H., Zhang M., Guo Y., Sun M., *Near-infrared light triggered liposomes combining photodynamic and chemotherapy for synergistic breast tumor therapy*, Colloids Surf B Biointerfaces, 173. 2019, s. 564-570.
19. García Calavia P., Chambrier I., Cook M.J., Haines A.H., Field R.A., Russell D.A., *Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose- phthalocyanine functionalized gold nanoparticles*, J Colloid Interface Sci., 512, 2018, s. 249-259.
20. Huang P., Qian X., Chen Y., Yu L., Lin H., Wang L., Zhu Y., Shi J., *Metalloporphyrin-Encapsulated Biodegradable Nanosystems for Highly Efficient Magnetic Resonance Imaging-Guided Sonodynamic Cancer Therapy*, J Am Chem Soc., 139(3), 2017, s. 1275-1284.
21. Yang Y., Yang X., Zou J., Jia C., Hu Y., Du H., Wang H., *Evaluation of photodynamic therapy efficiency using an in vitro three-dimensional microfluidic breast cancer tissue model*, Lab Chip, 15(3), 2015, s. 735-744.
22. Ma L., Zou X., Chen W., *A new X-ray activated nanoparticle photosensitizer for cancer treatment*, J Biomed Nanotechnol., 10(8), 2014, s. 1501-1508.
23. Demyanenko S.V., Uzdensky A.B., Sharifulina S.A., Lapteva T.O., Polyakova L.P., *PDT-induced epigenetic changes in the mouse cerebral cortex: a protein microarray study* Biochim Biophys Acta., 1840(1), 2014, s. 262-270.
24. Starkey J.R., Rebane A.K., Drobizhev M.A., Meng F., Gong A., Elliott A., McInnerney K., Spangler C.W., *New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse*, Clin Cancer Res., 14(20), 2008, s. 6564-6573.
25. Isola V., Pece A., Pierro L., *Photodynamic therapy with verteporfin of choroidal malignancy from breast cancer*, Am J Ophthalmol., 142(5), 2006, s. 885-887.
26. Fernandez Gacio A., Fernandez-Marcos C., Swamy N., Dunn D., Ray R., *Photodynamic cell-kill analysis of breast tumor cells with a tamoxifen-pyropheophorbide conjugate*, J Cell Biochem., 99(3), 2006, s. 665-670.
27. Chen X., Hui L., Foster D.A., Drain C.M., *Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: targeting and incapacitating cancer cells*, Biochemistry, 43(34), 2004, s. 10918-10929.
28. Cuenca R.E., Allison R.R., Sibata C., Downie G.H., *Breast cancer with chest wall progression: treatment with photodynamic therapy*, Ann Surg Oncol., 11(3), 2004, s. 322-327.
29. Allison R., Mang T., Hewson G., Snider W., Dougherty D., *Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality*, Cancer, 91(1), 2001, s. 1-8.
30. McCaughan J.S. Jr., *Photodynamic therapy: a review*, Drugs Aging, 15(1), 1999, s. 49-68.
31. Fritsch C., Becker-Wegerich P.M., Schulte K.W., Neuse W., Lehmann P., Ruzicka T., Goerz G., *Photodynamische Therapie und Mamillenplastik eines grossflächigen Rumpfhautbasalioms der Mamma. Effektive Kombinationstherapie unter photodynamischer Diagnostik [Photodynamic therapy and breast-plasty of a extensive superficial trunk skin basalioma of the breast. An effective combination therapy with photodynamic diagnosis]*, Hautarzt, 47(6), 1996, s. 438-442.
32. Babu B., Mack J., Nyokong T., *Photodynamic activity of Sn(IV) tetrathien-2-ylchlorin against MCF-7 breast cancer cells*, Dalton Trans., 2021.
33. Qiu Q., Li C., Yan X., Zhang H., Luo X., Gao X., Liu X., Song Y., Deng Y., *Photodynamic/ photothermal therapy enhances neutrophil-mediated ibrutinib tumor delivery for potent tumor immunotherapy: More than one plus one?*, Biomaterials, 269, 2021, s. 120652.

34. Castilho M.L., Jesus V.P.S., Vieira P.F.A., Hewitt K.C., Raniero L., *Nanomedicine based on Chlorin e6-EGF conjugated gold nanoparticles as a therapeutic agent for triple negative breast cancer*, Photodiagnosis Photodyn Ther., 2021, s. 102186.
35. Dai L., Shen G., Wang Y., Yang P., Wang H., Liu Z., *PSMA-targeted melanin-like nanoparticles as a multifunctional nanoplatform for prostate cancer theranostics*, J Mater Chem B., 2021.
36. Dos Santos A.F., Inague A., Arini G.S., Terra L.F., Wailemann R.A.M., Pimentel A.C., Yoshinaga M.Y., Silva R.R., Severino D., de Almeida D.R.Q., Gomes V.M., Bruni-Cardoso A., Terra W.R., Miyamoto S., Baptista M.S., Labriola L., *Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells*, Cell Death Dis., 11(12), 2020, s. 1070.
37. Cupido-Sánchez M.G., Herrera-González N.E., Mendoza C.C.B., Hernández M.L.M., Ramón- Gallegos E., *In silico analysis of the association of hsa-miR-16 expression and cell survival in MDA-MB-231 breast cancer cells subjected to photodynamic therapy*, Photodiagnosis Photodyn Ther., 2020, s. 102106.
38. Borodziuk A., Kowalik P., Duda M., Wojciechowski T., Minikayev R., Kalinowska D., Klepka M., Sobczak K., Kłopotowski Ł., Sikora B., *Unmodified Rose Bengal photosensitizer conjugated with NaYF₄:Yb,Er upconverting nanoparticles for efficient photodynamic therapy*, Nanotechnology, 31(46), 2020, s. 465101.
39. Yousefi Sadeghloo A., Khorsandi K., Kianmehr Z., *Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells*, Photochem Photobiol Sci., 19(11), 2020, s. 1580-1589.
40. Wei C., Li X., *The Role of Photoactivated and Non-Photoactivated Verteporfin on Tumor*, Front Pharmacol., 11, 2020, s. 557429.
41. Raschpichler M., Preis E., Pinnapireddy S.R., Baghdan E., Pourasghar M., Schneider M, Bakowsky U., *Photodynamic inactivation of circulating tumor cells: An innovative approach against metastatic cancer*, Eur J Pharm Biopharm., 157, 2020, s. 38-46.
42. Liang S., Sun M., Lu Y., Shi S., Yang Y., Lin Y., Feng C., Liu J., Dong C., *Cytokine-induced killer cells-assisted tumor-targeting delivery of Her-2 monoclonal antibody-conjugated gold nanostars with NIR photosensitizer for enhanced therapy of cancer*, J Mater Chem B., 8(36), 2020, s. 8368-8382.
43. Al-Kattan A., M A Ali L., Daurat M., Mattana E., Gary-Bobo M., *Biological Assessment of Laser-Synthesized Silicon Nanoparticles Effect in Two-Photon Photodynamic Therapy on Breast Cancer MCF-7 Cells*, Nanomaterials (Basel), 10(8), 2020, s. 1462.
44. Huang P., Zhang B., Yuan Q., Zhang X., Leung W., Xu C., *Photodynamic treatment with purpurin 18 effectively inhibits triple negative breast cancer by inducing cell apoptosis*, Lasers Med Sci., 2020.
45. Montaseri H., Kruger C.A., Abrahamse H., *Review: Organic nanoparticle based active targeting for photodynamic therapy treatment of breast cancer cells*, Oncotarget, 11(22), 2020, s. 2120-2136.
46. Deken M.M., Kijanka M.M., Beltrán Hernández I., Slooter M.D., de Bruijn H.S., van Diest P.J., van Bergen En Henegouwen P.M.P., Lowik C.W.G.M., Robinson D.J., Vahrmeijer A.L., Oliveira S., *Nanobody-targeted photodynamic therapy induces significant tumor regression of trastuzumab resistant HER2-positive breast cancer, after a single treatment session*, J Control Release, 323, 2020, s. 269-281.
47. Rodrigues M.C., Vieira L.G., Horst F.H., de Araújo E.C., Ganassin R., Merker C., Meyer T., Böttner J., Venus T., Longo J.P.F., Chaves S.B., Garcia M.P., Estrela-Lopis I., Azevedo R.B., Muehlmann L.A., *Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in*

- a murine 4T1 breast adenocarcinoma model*, J Photochem Photobiol B., 204, 2020, s. 111808.
48. Huang L., Lin H., Chen Q., Yu L., Bai D., *MPPa-PDT suppresses breast tumor migration/invasion by inhibiting Akt-NF- κ B-dependent MMP-9 expression via ROS*, BMC Cancer, 19(1), 2019, s. 1159.
 49. Chen L., Zhou L., Wang C., Han Y., Lu Y., Liu J., Hu X., Yao T., Lin Y., Liang S., Shi S., Dong C., *Tumor-Targeted Drug and CpG Delivery System for Phototherapy and Docetaxel-Enhanced Immunotherapy with Polarization toward M1-Type Macrophages on Triple Negative Breast Cancers*, Adv Mater, 31(52), 2019, s. 1904997.
 50. Girotti AW., *Nitric Oxide-Mediated Resistance to Antitumor Photodynamic Therapy*, Photochem Photobiol., 96(3), 2020, s. 500-505.
 51. R Mokoena D., P George B., Abrahamse H., *Enhancing Breast Cancer Treatment Using a Combination of Cannabidiol and Gold Nanoparticles for Photodynamic Therapy*, Int J Mol Sci., 20(19), 2019, s. 4771.
 52. Lu J., Yang L., Zhang W., Li P., Gao X., Zhang W., Wang H., Tang B., *Photodynamic therapy for hypoxic solid tumors via Mn-MOF as a photosensitizer*, Chem Commun (Camb), 55(72), 2019, s. 10792-10795.
 53. Pinto da Silva L., Magalhães C.M., Núñez-Montenegro A., Ferreira P.J.O., Duarte D., Rodríguez-Borges J.E., Vale N., Esteves da Silva J.C.G., *Study of the Combination of Self-Activating Photodynamic Therapy and Chemotherapy for Cancer Treatment*, Biomolecules, 9(8), 2019, s. 384.
 54. Huang Z., Wei G., Zeng Z., Huang Y., Huang L., Shen Y., Sun X., Xu C., Zhao C., *Enhanced cancer therapy through synergetic photodynamic/immune checkpoint blockade mediated by a liposomal conjugate comprised of porphyrin and IDO inhibitor*, Theranostics, 9(19), 2019, s. 5542-5557.

Histopatologiczna ewaluacja tkanki raka piersi po chemioterapii

Streszczenie

Niniejsza praca polega na przeglądzie doniesień z ostatnich lat dotyczących postępów w diagnostyce i leczeniu raka piersi (BC). BC jest chorobą heterogenną o cechach morfologicznych i molekularnych, które wpływają na rokowanie i odpowiedź na leczenie. Diagnostyka raka piersi na podstawie MRI jest standardem u pacjentek z miejscowo zaawansowanym zapaleniem BC i BC.

Słowa kluczowe: rak piersi, MRI, PDT

Histopathological evaluation of breast cancer tissue after chemotherapy

Summary

This work consists of a review of reports from the last years regarding progress in breast cancer (BC) diagnostics and treatment. BC is a heterogeneous disease with morphological and molecular features that influence prognosis and response to treatment. Breast cancer diagnosis based on MRI is standard in patients with locally advanced BC and BC inflammation.

Keywords: breast cancer, MRI, PDT

Terapia fotodynamiczna jako metoda przyszłości w leczeniu raka prostaty

1. Wstęp

W pracy dokonano przeglądu dotychczasowych osiągnięć w zakresie zastosowania terapii i diagnostyki fotodynamicznej w leczeniu raka prostaty. W metodzie wykorzystuje się fotouczulacz, który jest podawany pacjentowi doustnie lub dożylnie (zależy od rodzaju fotouczulacza) w z góry ustalonym czasie przed zabiegiem (może to być kilka dni, kilka godzin a nawet kilkanaście minut). Następnie wprowadza się źródło światła do wzbudzenia fotouczulacza i wytworzenia toksycznego tlenu singletowego.

W ostatnich latach nastąpił wzrost liczby badań i rozwoju terapii ogniskowych raka prostaty, co jest konsekwencją wysokiego odsetka raka prostaty [1]. Przeprowadzono przegląd dostępnej literatury na temat leczenia laserowego zlokalizowanego raka prostaty. Wyszukiwanie w PubMed i Embase zostało przeprowadzone przy użyciu następujących słów kluczowych: „Zlokalizowany rak prostaty”, „Rak prostaty niskiego ryzyka”, „Terapia ogniskowa”, „Rezonans magnetyczny w zlokalizowanym raku prostaty”, „Ogniskowa ablacja laserowa”.

2. Terapia Fotodynamiczna w Leczeniu Raka Prostaty

Terapia fotodynamiczna za pomocą TOOKAD jest jedyną terapią ogniskową ocenianą w badaniu klinicznym III fazy, wykazującą niższy wskaźnik progresji i dłuższy czas do progresji w porównaniu z aktywnym nadzorem. Pomimo faktu, że terapie ogniskowe nadal nie są zalecane poza kontekstem badań klinicznych i braku badań porównawczych między różnymi technikami, wydaje się, że terapie ogniskowe laserowe mają przyszłość w ramach nowych podejść do miejscowego raka prostaty [1]. Połączenie celowanej naczyniowo terapii fotodynamicznej z antycytotoksycznym antygenem 4 związanym z limfocytami T jest skuteczną terapią w syngenicznym mysim modelu raka. Obecne wyniki sugerują tę terapię jako potencjalną opcję leczenia zarówno guzów pęcherza, jak i górnych dróg oddechowych w przyszłych badaniach klinicznych [2]. Duża kumulacja LC-Pyro w guzie umożliwiła silną PDT, co spowodowało znaczne opóźnienie wzrostu guza w modelu podskórnego przeszczepu ksenogenicznego. Podejście to można zastosować do poprawy farmakokinetyki istniejących i przyszłych celowanych środków PDT w celu zwiększenia akumulacji guza i skuteczności leczenia [3]. Obecnie nie ma jasnych zaleceń co do tego, która z tych technologii jest odpowiednia dla indywidualnych cech pacjenta. Naszym zamiarem było dokonanie przeglądu literatury pod kątem specjalnych aspektów różnych technologii, które mogą być korzystne w zależności od indywidualnych cech pacjenta i guza [4]. Terapia fotodyna-

¹ Zakład Patomorfologii i Katedra Nauk Morfologicznych, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski.

² Zakład Biochemii i Chemii Ogólnej, Kolegium Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski.

³ Zakład Fotomedycyny i Chemii Fizycznej, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski.

miczna (PDT) to ewoluująca metoda leczenia guzów powierzchniowych, która jest nieinwazyjna i niesie ze sobą minimalne ryzyko toksyczności. Łączy wybiórcze dla nowotworu barwniki fotouczulające, tlen tkankowy i ukierunkowane oświetlenie, aby wytworzyć cytotoksyczne reaktywne formy tlenu (RFT) w obrębie guza. Oprócz bezpośredniego działania na komórki nowotworowe PDT uszkadza i ogranicza mikrokrążenie guza oraz wywołuje miejscową odpowiedź zapalną, która stymuluje odpowiedź immunologiczną przeciwko guzowi. W przeciwieństwie do operacji lub radioterapii, PDT nie wpływa na otaczającą macierz zewnątrzkomórkową; tak więc gojenie się tkanek jest doskonałe, a PDT rzadko powoduje blizny [5]. Jest wygodny do wykonania, mało inwazyjny i może być prowadzony w warunkach ambulatoryjnych [6]. Pojawiła się potrzeba opracowania terapii ablacyjnych, które próbowałyby zmniejszyć obciążenie leczeniem, zachowując kontrolę nad rakiem i unikając chorobowości psychologicznej związanej z nadzorem [7]. Porównanie różnych podejść ogniskowych jest złożone ze względu na istotną niejednorodność badań. W porównaniu z rakiem prostaty, który dotyka wyłącznie mężczyzn, rak urotelialny pęcherza moczowego jest najczęstszym rakiem układu moczowo-płciowego dotykającym zarówno mężczyzn, jak i kobiety. W około 75% przypadków rak pęcherza moczowego występuje jako wielogniskowy nieinwazyjny guz brodawkowaty o dużej liczbie nawrotów, co prowadzi do częstych resekcji przezcewkowych wymagających hospitalizacji. Przypadki te utorały drogę do diagnozy fotodynamicznej. Od lat 90. technika ta jest stosowana do identyfikacji guzów pęcherza moczowego, zwłaszcza wysoce agresywnego raka in situ, w łatwiejszy i pełniejszy sposób w porównaniu z konwencjonalną cystoskopią w świetle białym. W artykule przedstawiono aktualny przegląd metody, wskazań i wyników diagnozy fotodynamicznej w leczeniu raka urotelialnego pęcherza [8]. Trwa debata na temat leczenia raka gruczołu krokowego ograniczonego do narządów, szczególnie u mężczyzn z chorobą niskiego ryzyka wykrytą w badaniach przesiewowych PSA. Potrzebna jest równowaga między szkodliwością a korzyściami wynikającymi z leczenia. Opracowywane są nowe techniki, których celem jest oferowanie podobnych efektów leczenia do obecnych terapii radykalnych, przy jednoczesnym ograniczaniu związanych z nimi szkodliwych skutków tych terapii. W tym przeglądzie badamy potencjał jednej z takich technik, terapii fotodynamicznej (PDT), w leczeniu raka prostaty ograniczonego do narządów. PDT wykorzystuje lek fotouczulający, który jest aktywowany w prostacie przez światło laserowe o małej mocy, dostarczane za pomocą światłowodów. Włókna są umieszczane w igłach, w gruczole krokowym pod kontrolą ultrasonografii przezodbytnicznej i szablonu kroczonego. Po aktywacji fotouczulacza przez światło i utworzeniu reaktywnych form tlenu, w miejscu interakcji między fotouczulaczem, światłem i tlenem następuje martwica. Trwają badania kliniczne mające na celu zbadanie zastosowania PDT w pierwotnym i ratunkowym leczeniu raka prostaty ograniczonego do narządów. Dokonujemy przeglądu tych badań, potencjalnych strategii zwiększonych efektów fotodynamicznych i obecnych ograniczeń PDT w przypadku raka prostaty [9]. Terapia fotodynamiczna polega na podaniu źródła energii w postaci światła o określonej długości fali na uprzednio fotouczuloną tkankę związkami chemicznymi, w obecności tlenu, dzięki czemu powstają duże ilości wolnych rodników i pochodnych tlenu (hydroksyl związki) powoduje martwicę leczonej tkanki. Poprawa techniki w ostatnich latach pozwoliła na jej niedawny rozwój jako metody terapeu-

tycznej w przypadku zlokalizowanego raka prostaty. Obecnie toczy się kilka badań klinicznych u pacjentów z rakiem prostaty ograniczonym do narządów, zarówno jako leczenie pierwszego rzutu, jak i leczenie ratujące. Nie ma ryzyka rozsiewu raka w otaczających tkankach ani kumulacyjnej toksyczności farmakologicznej. Dlatego technikę można powtarzać tak często, jak potrzeba i można ją podawać na wcześniej napromienioną tkankę. Przegląd literatury pokazuje, że leczenie fotodynamiczne stanie się opcją terapeutyczną dla pacjentów z rakiem prostaty w bardzo bliskiej przyszłości [10, 11]. Przy dawkach Tookad 2 mg/kg, leczenie 50 J/cm² wywoływało niewielką zmianę właściwości przewodzenia nerwu odpiszczelowego. Jednak leczenie 100 J/cm² spowodowało miejscowe uszkodzenie nerwu i zmniejszenie prędkości przewodzenia nerwu, a leczenie 200 J/cm² poważnie uszkodziło nerw [12]. Specyficzny antygen błonowy prostaty (PSMA) jest silnie wyrażany na powierzchni większości komórek raka prostaty i jest uważany za obiecujący cel w obrazowaniu i leczeniu raka prostaty. Możliwe jest ustalenie sondy teranostycznej ukierunkowanej na PSMA w celu wczesnej diagnostyki i leczenia tego typu raka. Ta wielofunkcyjna sonda może mieć duży potencjał w precyzyjnej i wczesnej terapii raka prostaty [13]. Rak prostaty jest najczęstszym nowotworem złośliwym i główną przyczyną zgonów z powodu raka u mężczyzn. Dlatego rozwój nowatorskich strategii wykonywania skojarzonych metod obrazowania i terapii raka prostaty ma kluczowe znaczenie i może mieć znaczący wpływ na opiekę nad pacjentami [14]. Immunogenna śmierć komórek (ICD) to rodzaj śmierci komórek nowotworowych wywoływanych przez niektóre leki chemioterapeutyczne, wirusy onkolityczne, terapie fizykochemiczne, terapię fotodynamiczną i radioterapię. Polega na aktywacji układu odpornościowego przeciwko rakowi u immunokompetentnych gospodarzy [15]. Terapia fototermiczna (PTT) i terapia fotodynamiczna (PDT) pojawiły się jako wysoce perspektywiczne metody terapeutyczne w leczeniu raka. Niezależnie od tego, krytycznym wyzwaniem nadal pozostaje badanie skutecznej strategii maksymalizacji synergicznej skuteczności PTT i PDT ze względu na niską wydajność fotokonwersji. Co ważne, agregacja zespołu poprawia stabilność pęcherzyków, realizując synergistyczne działanie PTT i PDT w terapii raka prostaty. Struktura ta charakteryzuje się dobrym wychwytem komórkowym, wysoce skuteczną akumulacją guza, wysoką wydajnością konwersji fototermicznej i doskonałymi właściwościami zwiększonej odporności na fotowysielanie, które są korzystne w przypadku fluorescencyjnego obrazowania guzów metodą ICG [16]. Pojawiła się terapia fotodynamiczna raka prostaty, jednak ocena jej mechanizmu działania nie została jeszcze wyjaśniona. Niniejsze badanie ma na celu zbadanie mechanizmu i znaczenia terapii fotodynamicznej raka prostaty *in vitro* [17]. Terapia fotodynamiczna (PDT), minimalnie inwazyjna metoda leczenia raka polegająca na aktywacji fotouczulacza przez określoną długość fali światła, jest uważana za obiecującą opcję leczenia lekoopornego raka prostaty. Wirus hemaglutynujący otoczki japońskiej (HVJ-E) może służyć jako wysoce skuteczna terapia przeciwnowotworowa poprzez selektywne dostarczanie leków i wzmacnianie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [18]. Teranostyka fotodynamiczna, która pozwala na jednoczesną terapię fotodynamiczną (PDT) i precyzyjne raportowanie odpowiedzi terapeutycznej, pojawiła się jako intrygujący kierunek w rozwoju medycyny precyzyjnej. Opracowano tutaj ultra wydajną fotodynamiczną platformę teranostyczną, opartą na połączeniu i wzmocnieniu teranostycznego fotouczulacza

TPCI z innymi terapiami w celu uzyskania synergistycznego efektu przeciwnowotworowego i synchronicznego raportowania odpowiedzi terapeutycznej [19]. Lokalne i przerzutowe nawroty raka prostaty często występują po próbie wyleczenia guza pierwotnego, a do 66% wznów miejscowych wiąże się z dodatnimi marginesami. Dlatego podczas chirurgicznej resekcji gruczolakoraka prostaty potrzebne są technologie, które mogą poprawić wizualizację marginesów guza i terapie adiuwantowe w celu usunięcia pozostałych tkanek guza. Środki fotodynamiczne mogą łączyć zarówno fluorescencję w chirurgii sterowanej obrazem (IGS), jak i terapię fotodynamiczną (PDT) w celu wycięcia i ablacji komórek nowotworowych [20]. Raki płaskonabłonkowe głowy i szyi (HNSCC) charakteryzują się wysoką śmiertelnością, chociaż zidentyfikowano już kilka potencjalnych celów terapeutycznych. Ekspresja receptora hormonu uwalniającego gonadotropinę (GnRH-R) jest mniej badana w przypadku raka głowy i szyi, dlatego zbadaliśmy znaczenie terapeutyczne celowania w GnRH-R u pacjentów z HNSCC. Nasze wyniki wskazują, że połowa próbek pochodzących od pacjentów wykazywała wysoką ekspresję GnRH-R, co wiązało się z gorszymi rokowaniami, co czyniło ten receptor obiecującym celem dla dostarczania leków w oparciu o GnRH. Terapia fotodynamiczna jest klinicznie zatwierdzonym leczeniem HNSCC, a skuteczność i selektywność można zwiększyć poprzez kowalencyjne sprzężenie fotouczulacza z peptydem kierującym GnRH-R [21, 22]. Celem niniejszej pracy jest opracowanie wysoce skutecznych cząsteczek kierujących, które są specyficznie ukierunkowane na mezoporowate nanocząsteczki krzemionki przeznaczone do terapii fotodynamicznej raka prostaty. Wybraliśmy strategię opracowania nowego związku, który umożliwia poprawę celowania w niezależny od kationów receptor mannozo-6-fosforanu, który jest nadeksprymowany w raku prostaty [23]. Rak prostaty jest jedną z głównych przyczyn zgonów mężczyzn na całym świecie. Terapia fotodynamiczna (PDT) to nowa pojawiająca się i obiecująca strategia leczenia raka prostaty. PDT wykorzystuje połączenie światła i fotouczulacza do zabijania komórek rakowych. Jednak większość fotouczulaczy gromadzi się w normalnych tkankach, w szczególności w skórze i oczach, i mogą być aktywowane przez światło słoneczne, powodując poważne skutki uboczne, takie jak przedłużona nadwrażliwość skóry na światło, które ograniczają kliniczne zastosowanie PDT [24]. Terapia fotodynamiczna jest obiecującą alternatywą dla konwencjonalnych metod leczenia raka. Niemniej jednak poprawa penetracji światła *in vivo* i skuteczności celowania w komórki rakowe pozostaje głównym wyzwaniem w klinicznej terapii fotodynamicznej. Badanie miało na celu opracowanie wielofunkcyjnych nanocząstek magnetycznych sprzężonych z fotouczulaczem i cząsteczkami celującymi w raka poprzez prosty proces modyfikacji powierzchni w celu PDT. Aby selektywnie celować w komórki rakowe i funkcjonalność PDT, nanocząstki magnetyczne rdzeniowe (Fe₃O₄) zostały kowalencyjnie związane z chloriną e6 (Ce6) jako PS i kwasem foliowym (FA). Po napromieniowaniu źródłem światła o długich falach 660 nm, nanocząsteczki Fe₃O₄-Ce6-FA o dobrej biokompatybilności wywierały wyraźne działanie przeciwnowotworowe poprzez apoptozę, co potwierdzono analizując translokację błony plazmatycznej, fragmentację jądra, aktywność kaspazy-3/7 w komórkach raka prostaty (PC-3) i piersi (MCF-7). Ce6, stosowany tutaj jako PS, jest zatem bardziej przydatny dla PDT ze względu na jego zdolność do wytwarzania wysokiej wydajności kwantowej tlenu singletowego, która jest spowodowana głęboką

penetracją ze względu na jego pasmo absorpcji o dużej długości fali; jednakże wymagane są dalsze badania *in vivo*, aby zweryfikować jego działanie biologiczne w zastosowaniach klinicznych [25]. Wysokie wskaźniki zachorowalności na raka prostaty (PCa) zwiększają zapotrzebowanie na ulepszone strategie terapeutyczne. Guzy prostaty charakterystycznie wyrażają specyficzny antygen błonowy prostaty (PSMA), proteazę związaną z błoną. Ponieważ PSMA ulega silnej nadekspresji na złośliwych komórkach guza prostaty, a szybkość jego ekspresji koreluje z agresywnością choroby, ten związany z guzem biomarker daje możliwość opracowania nowych strategii diagnostyki i terapii PCa. Poczyniono znaczne postępy w celowaniu w PSMA, począwszy od podejść immunoterapeutycznych po terapeutyczne małe cząsteczki. W niniejszym przeglądzie omówiono różnorodność [26]. Jedną z zalet PDT jest to, że często pozwala ona obejść oporność nowotworu na środki chemioterapeutyczne, takie jak cisplatyna i doksorubicyna. Jednakże wykazano również istniejącą i nabytą oporność na PDT [27]. Rak prostaty jest jednym z najczęstszych nowotworów i jedną z głównych przyczyn zgonów, z powodu raka, w Stanach Zjednoczonych. Mężczyźni, u których zdiagnozowano chorobę, zwykle przechodzą radykalną prostatektomię, która często skutkuje nietrzymaniem moczu i impotencją. U większości pacjentów po niecałkowitej prostatektomii podczas operacji często dochodzi do nawrotu choroby. Spektroskopia absorpcji atomowej wykazała, że docelowe AuNP akumulują się 4-krotnie więcej w PC3pip niż w guzach PC3flu. Przewiduje się, że opisany tu system nanocząstek zapewni chirurgiczne wytyczne dotyczące resekcji guza prostaty i interwencji terapeutycznej, gdy operacja jest niewystarczająca [28]. Terapia fotodynamiczna jest obiecującą metodą leczenia raka, ale jej zastosowanie w przypadku guzów głęboko osadzonych jest utrudnione głównie przez płytką penetrację światła widzialnego. Terapia fotodynamiczna za pośrednictwem promieni rentgenowskich zyskała dużą wagę ze względu na nieograniczoną penetrację promieni rentgenowskich. Jednak nadal nie osiągnięto znaczących wyników ze względu na niską wydajność luminescencji scyntylicyjnych nanocząstek i słaby transfer energii do fotouczulacza [27, 29]. Wraz z pojawieniem się nieinwazyjnej terapii fotodynamicznej, której celem jest szybka eradykacja komórek nowotworowych, osiągnięto nowe kamienie milowe w onkologii. Związek chemiczny, nitrobenzaldehyd, wstrzyknięty do guza, aktywuje się pod wpływem światła ultrafioletowego (UV) i zaburza wewnętrzną i zewnętrzną dynamikę komórek rakowych. Technika ta może mieć ogromną wartość terapeutyczną w niszczeniu licznych linii nowotworowych, w tym raka piersi, prostaty, trzustki itp. Bez powodowania niepożądanych ogólnoustrojowych skutków ubocznych [30]. Terapia fotodynamiczna jest obiecująca dla ogniskowej terapii raka prostaty. Jednak skuteczność terapeutyczna wymaga poprawy, a dalszy rozwój PDT dla PCa wiąże się z wyzwaniem, takimi jak niepewność gromadzenia się fotouczulaczy (PS) w miejscu guza i trudności w wizualizacji zmian za pomocą konwencjonalnego obrazowania ultrasonograficznego. Opracowaliśmy nowe mikropęcherzyki szczepione porfiryne i zaproponowaliśmy strategię integracji PGL-MB z obrazowaniem w USA, aby wyeliminować te ograniczenia i zwiększyć skuteczność PDT [31]. Obserwacja wpływu terapii fotodynamicznej za pośrednictwem feoforbidu na proliferację, apoptozę, inwazję i przerzuty komórek ludzkiego raka prostaty PC-3 *in vitro* oraz zbadanie jego możliwego mechanizmu [32]. Subkomórkowa lokalizacja fotouczulacza jest znana z określania terapeutycznej sku-

teczności terapii fotodynamicznej (PDT). Błona komórkowa jest optymalnym celem, który obiecuje skuteczny wynik leczenia [33]. Rak prostaty to trzecia najczęstsza przyczyna zgonów mężczyzn w Stanach Zjednoczonych, a jego opcje leczenia obejmują zabiegi chirurgiczne, leki przeciwhormonalne na nowotwory wrażliwe na androgeny i radioterapię. Alternatywnym leczeniem jest zastosowanie terapii fotodynamicznej, która polega na aktywacji fotouczulacza o określonej długości fali światła w obecności tlenu, generując przejściowe stężenia reaktywnych form tlenu [34]. Terapia fotodynamiczna ukierunkowana na naczynia selektywnie zaburza funkcję naczyń, wywołując uszkodzenia oksydacyjne w naczyniach krwionośnych, zwłaszcza w komórkach śródbłonna. Chociaż skuteczna eradykacja guza i doskonały profil bezpieczeństwa są dobrze udowodnione zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych, wiadomo, że niepełne zamknięcie naczyń i angiogeneza powodują nawrót guza po PDT ukierunkowanej na naczynia [35].

Podsumowując, Europejskie Towarzystwo Urologiczne (EAU) zaleca dwa rodzaje podejścia terapeutycznego odpowiednie dla pacjentów z rakiem prostaty – leczenie odroczone i leczenie aktywne. Jedną z odroczonej metod leczenia jest uważne czekanie. Zabieg ten jest zalecany dla pacjentów z przewidywaną długością życia poniżej 10 lat i ma charakter paliatywny. Celem jest zminimalizowanie toksyczności związanej z leczeniem. Drugim odroczonej rodzajem leczenia jest aktywny nadzór. Ma zastosowanie do pacjentów, których oczekiwana długość życia przekracza 10 lat i zmniejsza toksyczność związaną z leczeniem bez pogarszania ogólnego wskaźnika przeżycia. Wymaga częstych obserwacji z wykorzystaniem wielu markerów oceny (w tym poziomu PSA, wieloparametrowego MRI, biopsji kontrolnej).

Literatura

1. Yebes A., Gómez Rivas J., Toribio C., Álvarez-Maestro M., Cansino R., Aguilera A., Martínez-Piñero L., *Láser en cáncer de próstata. Aplicaciones [Laser in prostate cancer. Applicability.]*, Arch Esp Urol., 73(8), 2020, s. 724-734.
2. Corradi R.B., LaRosa S., Jebiwott S., Murray K.S., Rosenzweig B., Somma A.J., Gomez R.S., Scherz A., Kim K., Coleman J.A., *Effectiveness of the combination of vascular targeted photodynamic therapy and anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 in a preclinical mouse model of urothelial carcinoma*, Int J Urol., 26(3), 2019, s. 414-422.
3. Harmatys K.M., Overchuk M., Chen J., Ding L., Chen Y., Pomper M.G., Zheng G., *Tuning Pharmacokinetics to Improve Tumor Accumulation of a Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Phototheranostic Agent*, Bioconjug Chem., 29(11), 2018, s. 3746-3756.
4. Ganzer R., Arthanareeswaran V.K.A., Ahmed H.U., Cestari A., Rischmann P., Salomon G., Teber D., Liatsikos E., Stolzenburg J.U., Barret E., *Which technology to select for primary focal treatment of prostate cancer?-European Section of Urotechnology (ESUT) position statement*, Prostate Cancer Prostatic Dis., 21(2), 2018, s. 175-186.
5. Dobson J., de Queiroz G.F., Golding J.P., *Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects*, Vet J., 233, 2018, s. 8-18.
6. Bugaj A.M., *Vascular targeted photochemotherapy using padoporfin and padeliporfin as a method of the focal treatment of localised prostate cancer - clinician's insight*, World J Methodol., 6(1), 2016, s. 65-76.
7. Marien A., Gill I., Ukimura O., Betrouni N., Villers A., *Target ablation--image- guided therapy in prostate cancer*, Urol Oncol., 32(6), 2014, s. 912-923.

8. Otto W., Burger M., Fritsche H.M., Rössler W., Wieland W.F., Denzinger S., *The enlightenment of bladder cancer treatment: origin and progress of photodynamic diagnosis*, *Future Oncol.*, 7(9), 2011, s. 1057-1066.
9. Moore C.M., Pendse D., Emberton M., *Photodynamic therapy for prostate cancer – a review of current status and future promise*, *Nat Clin Pract Urol.*, 6(1), 2009, s. 18-30.
10. Ramírez Backhaus M., Trassiera Villa M., Vera Donoso C.D., Jiménez Cruz J.F., *Terapia fotodinámica en el cáncer de próstata localizado [Photodynamic therapy in localised prostate cancer]*, *Actas Urol Esp.*, 31(6), 2007, s. 633-641.
11. Moore C.M., Hoh I.M., Bown S.G., Emberton M., *Does photodynamic therapy have the necessary attributes to become a future treatment for organ-confined prostate cancer?*, *BJU Int.*, 96(6), 2005, s. 754-758.
12. Dole K.C., Chen Q., Hetzel F.W., Whalen L.R., Blanc D., Huang Z., *Effects of photodynamic therapy on peripheral nerve: in situ compound-action potentials study in a canine model*, *Photomed Laser Surg.*, 23(2), 2005, s. 172-176.
13. Dai L., Shen G., Wang Y., Yang P., Wang H., Liu Z., *PSMA-targeted melanin-like nanoparticles as a multifunctional nanoplatfor for prostate cancer theranostics*, *J Mater Chem B.*, 2021.
14. Tekin V., Aweda T., Kozgus Guldu O., Biber Muftuler F.Z., Bartels J., Lapi S.E., Unak P., *A novel anti-angiogenic radio/photo sensitizer for prostate cancer imaging and therapy: $^{89}\text{Zr-Pt@TiO}_2\text{-SPHINX}$, synthesis and in vitro evaluation*, *Nucl Med Biol.*, 94-95, 2021, s. 20-31.
15. Ahmed A., Tait S.W.G., *Targeting immunogenic cell death in cancer*, *Mol Oncol.*, 14(12), 2020, s. 2994-3006.
16. Hu J., Luo H., Qu Q., Liao X., Huang C., Chen J., Cai Z., Bao Y., Chen G., Li B., Cui W., *Cell Membrane-Inspired Polymeric Vesicles for Combined Photothermal and Photodynamic Prostate Cancer Therapy*, *ACS Appl Mater Interfaces.*, 12(38), 2020, s. 42511-42520.
17. Xu D.D., Leong M.M.L., Wong F.L., Lam H.M., Hoeven R., *Photodynamic therapy on prostate cancer cells involve mitochondria membrane proteins*, *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 31, 2020, s. 101933.
18. Akter S., Inai M., Saito S., Honda N., Hazama H., Nishikawa T., Kaneda Y., Awazu K., *Photodynamic therapy by lysosomal-targeted drug delivery using talaporfin sodium incorporated into inactivated virus particles*, *Laser Ther.*, 28(4), 2019, s. 245-256.
19. Wang X., Tong J., He Z., Yang X., Meng F., Liang H., Zhang X., Luo L., *Paclitaxel-Potentiated Photodynamic Theranostics for Synergistic Tumor Ablation and Precise Anticancer Efficacy Monitoring*, *ACS Appl Mater Interfaces.*, 12(5), 2020, s. 5476-5487.
20. Wang X., Ramamurthy G., Shirke A.A., Walker E., Mangadlao J., Wang Z., Wang Y., Shan L., Schluchter M.D., Dong Z., Brady-Kalnay S.M., Walker N.K., Gargsha M., MacLennan G., Luo D., Sun R., Scott B., Roy D., Li J., Basilion J.P., *Photodynamic Therapy Is an Effective Adjuvant Therapy for Image-Guided Surgery in Prostate Cancer*, *Cancer Res.*, 80(2), 2020, s. 156-162.
21. Pethő L., Murányi J., Péntzes K., Gurbi B., Brauswetter D., Halmos G., Csík G., Mező G., *Suitability of GnRH Receptors for Targeted Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancers*, *Int J Mol Sci.*, 20(20), 2019, s. 5027.
22. Bouffard E., Mauriello Jimenez C., El Cheikh K., Maynadier M., Basile I., Raehm L., Nguyen C., Gary-Bobo M., Garcia M., Durand J.O., Morère A., *Efficient Photodynamic Therapy of Prostate Cancer Cells through an Improved Targeting of the Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor*, *Int J Mol Sci.*, 20(11), 2019, s. 2809.

23. Ji C., Yuan A., Xu L., Zhang F., Zhang S., Zhao X., Liu G., Chen W., Guo H., *Activatable Photodynamic Therapy for Prostate Cancer by NIR Dye/Photosensitizer Loaded Albumin Nanoparticles*, J Biomed Nanotechnol., 15(2), 2019, s. 311-318.
24. Choi K.H., Nam K.C., Cho G., Jung J.S., Park B.J., *Enhanced Photodynamic Anticancer Activities of Multifunctional Magnetic Nanoparticles (Fe₃O₄) Conjugated with Chlorin e6 and Folic Acid in Prostate and Breast Cancer Cells*, Nanomaterials (Basel), 8(9), 2018, s. 722.
25. Wüstemann T., Haberkorn U., Babich J., Mier W., *Targeting prostate cancer: Prostate-specific membrane antigen based diagnosis and therapy*, Med Res Rev., 39(1), 2019, s. 40-69.
26. Girotti A.W., *Upregulation of nitric oxide in tumor cells as a negative adaptation to photodynamic therapy*, Lasers Surg Med., 50(5), 2018, s. 590-598.
27. Mangadla J.D., Wang X., McCleese C., Escamilla M., Ramamurthy G., Wang Z., Govande M., Basilion J.P., Burda C., *Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Gold Nanoparticles for Theranostics of Prostate Cancer*, ACS Nano., 12(4), 2018, s. 314-3725.
28. Sengar P., Juárez P., Verdugo-Meza A., Arellano D.L., Jain A., Chauhan K., Hirata G.A., Fournier P.G.J., *Development of a functionalized UV-emitting nanocomposite for the treatment of cancer using indirect photodynamic therapy*, J Nanobiotechnology, 16(1), 2018, s. 19.
29. Kim K., Watson P.A., Lebdaï S., Jebiwott S., Somma A.J., La Rosa S., Mehta D., Murray K.S., Lilja H., Ulmert D., Monette S., Scherz A., Coleman J.A., *Androgen Deprivation Therapy Potentiates the Efficacy of Vascular Targeted Photodynamic Therapy of Prostate Cancer Xenografts*, Clin Cancer Res., 24(10), 2018, s. 2408-2416.
30. Saleem H., Iqbal U., *The Fight Against Cancer: Nitrobenzaldehyde as the Potential Warrior*, Cureus, 10(2), 2018, s. 2163.
31. You Y., Liang X., Yin T., Chen M., Qiu C., Gao C., Wang X., Mao Y., Qu E., Dai S., Zheng R., *Porphyrin-grafted Lipid Microbubbles for the Enhanced Efficacy of Photodynamic Therapy in Prostate Cancer through Ultrasound-controlled *In Situ* Accumulation*, Theranostics, 8(6), 2018, s. 1665-1677.
32. Liu L.Y., Man X.X., Yao H.X., Tan Y.Y., *Effects of pheophorbide a-mediated photodynamic therapy on proliferation and metastasis of human prostate cancer cells*, Eur Rev Med Pharmacol Sci., 21(24), 2017, s. 5571-5579.
33. Inai M., Honda N., Hazama H., Akter S., Fuse S., Nakamura H., Nishikawa T., Kaneda Y., Awazu K., *Photodynamic therapy using a cytotoxic photosensitizer porphyrin envelope that targets the cell membrane*, Photodiagnosis Photodyn Ther., 20, 2017, s. 238-245.
34. Gheewala T., Skwor T., Munirathinam G., *Photodynamic therapy using pheophorbide and 670nm LEDs exhibits anti-cancer effects in-vitro in androgen dependent prostate cancer*, Photodiagnosis Photodyn Ther., 21, 2018, s. 130-137.
35. Kraus D., Palasuberniam P., Chen B., *Targeting Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway for Therapeutic Enhancement of Vascular-Targeted Photodynamic Therapy*, Mol Cancer Ther., 16(11), 2017, s. 2422-2431.

Terapia fotodynamiczna jako metoda przyszłości w leczeniu raka prostaty

Streszczenie

Rak prostaty jest drugim najczęstszym nowotworem złośliwym wśród mężczyzn w Polsce. Rozpoznanie choroby opiera się głównie na podwyższeniu poziomu swoistego antygenu sterczowego (PSA) we krwi oraz badaniach obrazowych: ultrasonografii przezodbytniczej (TRUS) i rezonansu magnetycznego (MRI). Wykrycie raka prostaty na wczesnym etapie rozwoju wiąże się ze znaczną poprawą rokowania. Gruczolakorak gruczolowy prostaty o niskim stopniu złośliwości jest stosunkowo trudny do uwidocznienia za pomocą rezonansu magnetycznego, co utrudnia jego wczesną identyfikację. Choroba może również

postępować bardzo wolno, dlatego leczenie chirurgiczne może nie być najlepszą dostępną metodą leczenia, zwłaszcza u starszych pacjentów. Konieczne jest opracowanie alternatywnych metod leczenia, aby uniknąć potencjalnych skutków ubocznych operacji. Terapia fotodynamiczna mogłaby stanowić alternatywę w leczeniu takich pacjentów. W naszych badaniach skorelujemy obraz uzyskany metodą rezonansu magnetycznego z badaniem histopatologicznym wykonywanym za pomocą mikroskopu optycznego oraz postaramy się poprawić czułość i swoistość MRI w wykrywaniu dobrze zróżnicowanego raka prostaty. W kolejnej fazie eksperymentu na badaną tkankę zostanie nałożony fotoczułacz. Późniejsza stymulacja wiązką światła wytworzy wolne rodniki tlenu, które zniszczą komórki rakowe. Efekt zostanie oceniony za pomocą rezonansu magnetycznego i badania histopatologicznego próbek. Celem eksperymentu jest udowodnienie toksycznego wpływu terapii fotodynamicznej na komórki raka prostaty. Może to potencjalnie prowadzić do nowych metod leczenia, które są alternatywą dla operacji.

Słowa kluczowe: PDT, terapia, rak prostaty

Photodynamic therapy as a method of the future in the treatment of prostate cancer

Abstract

Prostate cancer is the second most common malignancy among men in Poland. The diagnosis of the disease is mainly based on the increased level of prostate specific antigen (PSA) in the blood and imaging: transrectal ultrasonography (TRUS) and magnetic resonance imaging (MRI). Detection of prostate cancer at an early stage of development is associated with a significant improvement in prognosis. Low-grade acinar adenocarcinoma of the prostate is relatively hard to visualize with magnetic resonance imaging, which makes its early identification difficult. The disease can also progress very slowly and therefore surgical treatment may not be the best available curative method, especially in older patients. It is necessary to develop alternative treatment methods in order to avoid potential side effects of surgery. Photodynamic therapy could be an alternative in the treatment of such patients. In our research, we will correlate an image obtained by magnetic resonance with the histopathological examination performed with an optical microscope and try to improve the sensitivity and specificity of MRI in the detection of well-differentiated prostate cancer.

In the next phase of the experiment a photosensitizer will be applied into the examined tissue. Subsequent stimulation with a beam of light will produce free radicals of oxygen that will destroy cancer cells. The effect will be assessed with magnetic resonance imaging and histopathological examination of the specimens.

The aim of the experiment is to prove the toxic effect of the photodynamic therapy on prostate cancer cells. This could potentially lead to new treatment methods that are an alternative to surgery.

Keywords: PDT, therapy, prostate cancer

Obustronny guz Wilmsa – wczesne rozpoznanie gwarancją sukcesu

1. Wstęp

Guz Wilmsa jest najczęściej występującym nowotworem nerki wieku dziecięcego oraz drugim co do częstości występowania nowotworem jamy brzusznej (wewnątrz-brzusznym). U dzieci odpowiada on za około 6% wszystkich nowotworów [1, 2]. Według najnowszych badań, w ostatnich latach, długoterminowe przeżycie uległo satysfakcjonującej poprawie i obecnie stanowi około 90%. Niestety, do tej pory niektóre grupy pacjentów, w tym pacjenci z obustronnym guzem Wilmsa (stadium V), z częstymi nawrotami, z anaplastycznym podtypem zmiany lub jednostronnymi guzami wysokiego ryzyka nadal stanowią ogromne wyzwanie kliniczne dla specjalistów i stale ich szansa na uzyskanie przeżycia wolnego od zdarzeń jest niezadowalająca. Około 80% przypadków guza Wilmsa występuje u dzieci poniżej 5 roku życia, a szczyt zapadalności przypada na 2.-3. rok życia. Większość przypadków występuje u pacjentów bez powiązanych zespołów genetycznych, jednak stosunkowo często guz Wilmsa również towarzyszy wrodzonym anomalom [3, 4]. Stosunek zachorowalności mężczyzn do kobiet wynosi ok. 1.2:1.

Według badań częstość występowania guza Wilmsa w USA wynosi około 8 przypadków na milion u dzieci poniżej 15 lat, a rocznie diagnozuje się tam ok. 500 nowych przypadków, z czego 6% to przypadki obustronne [5]. Inne badania wskazują, że w populacji azjatyckiej występuje o połowę mniej przypadków guza Wilmsa niż w krajach Europy Zachodniej. Wśród rasy czarnej częstość występowania jest prawie 2,5 razy większa [6, 7]. Guz Wilmsa w krajach europejskich jest diagnozowany niemalże tak często jak w USA. Natomiast w Turcji guzy nerek stanowią 7,1% wszystkich guzów wieku dziecięcego [8].

Wady układu moczowo-płciowego, takie jak: nerka podkowiasta, wielotorbielowatość nerek, dysplazja nerek, spodiectwo, czy wnetrostwo zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia guza Wilmsa [9]. Wyróżnia się również genetycznie uwarunkowane zespoły wad wrodzonych, zwiększające ryzyko guza Wilmsa, obejmujące zespół Beckwitha-Wiedemanna, zespół Wilms-tumor-aniridia syndrome (WAGR), zespół Denys-Drash [9].

Początek choroby jest bardzo niespecyficzny, gdyż guz Wilmsa nie prezentuje charakterystycznych pierwszych objawów. Najczęściej pacjent, trafiając do poradni lub kliniki onkologicznej jest w dobrym stanie ogólnym, co pomaga różnicować nefroblastoma od np. neuroblastoma. Zdecydowana większość pacjentów jako pierwszy objaw zauważa powiększający się obwód brzucha. Co więcej, guz często wykrywany jest przypadkowo przez rodzica podczas kąpieli bądź zabawy. Niekiedy u pacjentów

¹ Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Hematologii, Onkologii i Transplantologii Dziecięcej w Lublinie

² Klinika Hematologii, Onkologii i Transplantologii Dziecięcej w Lublinie.
Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

z guzem Wilmsa może wystąpić krwiomocz (30%) lub nadciśnienie (25%) [10, 11]. Znacznie rzadziej u pacjentów może pojawić się pogorszenie samopoczucia, stany podgorączkowe, zaburzenia koncentracji lub nawet dochodzi do rozwoju anoreksji. Innym, mniej charakterystycznym objawem są żyłaki powrózka nasiennego, spowodowane uciskiem guza. W diagnostyce guza Wilmsa nie stwierdza się typowych odchyleń w badaniach krwi lub moczu. W badaniach laboratoryjnych niekiedy można zaobserwować podwyższony poziom erytropoetyny oraz hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), hiperkalcemię i stany krwotoczne wywołane zmniejszonym stężeniem czynnika von Willebranda [12]. Wynika z tego, że lekarze pierwszego kontaktu, jak i specjaliści, pamiętając o niecharakterystycznych objawach tego nowotworu, powinni zwracać szczególną uwagę na objawy towarzyszące, począwszy od zwykłego pogorszenia samopoczucia aż po przerost połowicy, aniridię oraz wady rozwojowe układu moczowo-płciowego.

Podstawą rozpoznania guza Wilmsa są nieprawidłowości stwierdzone w badaniach obrazowych. Proces diagnostyczny zwykle rozpoczynany jest przez ultrasonografią (USG) jamy brzusznej, ze względu na łatwy, generujący niskie koszty dostęp do tego badania. Obrazowanie USG, zwłaszcza przy użyciu mniej nowoczesnego sprzętu, nie zawsze pozwala w pełni zdiagnozować zmiany, ale jest bardzo przydatne we wstępnym oszacowaniu występowania i zasięgu guza oraz pozwala w ramach badań wykonywanych w ośrodkach Podstawowej Opieki Zdrowotnej (POZ) wyłonić grupę dzieci, które wymagają pilnej, poszerzonej diagnostyki.

Zaawansowana diagnostyka z reguły prowadzona jest w ośrodkach specjalistycznych. Decyzja dotycząca wyboru metody badania – tomografia komputerowa (TK) czy rezonans magnetyczny (MRI) jest podejmowana indywidualnie. Wykazano, że TK i MRI mają prawie jednoznaczne wyniki diagnostyczne w lokalnej ocenie stopnia złośliwości [13]. Zaleca się, że jeżeli oceniając narządy jamy brzusznej postanowiono wykonać badanie MRI, należy wcześniej wykonać TK w celu oceny płuc, aby uniknąć zasłonięcia podstawy płuc przez niedodmę, która może pojawić się u młodszych pacjentów, wymagających sedacji do przeprowadzenia MRI [14]. U dzieci z obecnym obustronnym guzem Wilmsa lub obustronną predyspozycją wystąpienia zmiany, badanie rezonansu magnetycznego jest preferowaną metodą obrazowania [15].

W diagnostyce różnicowej guza Wilmsa, jak i większości nowotworów występujących u dzieci, wiek ma istotne znaczenie. U niemowląt do 3 miesiąca życia mezoblastyczny nerczak wrodzony występuje znacznie częściej niż guz Wilmsa, jednakże nefroblastoma może wystąpić również w okresie prenatalnym [16]. Natomiast już po ukończeniu 6. miesiąca życia, wystąpienie guza Wilmsa jest znacznie bardziej prawdopodobne niż nerczaka mezoblastycznego [17]. W retrospektywnym przeglądzie literatury zbadano 750 dzieci w wieku poniżej 7 miesięcy, u których wykryto ogniskowe zmiany w nerkach [17]. Badania wykazały, że 34% wszystkich guzów miało histologię inną niż guz Wilmsa, z czego 18% stanowił mezoblastyczny nerczak wrodzony, 8% mięśniakomięsak prążkowanokomórkowy, 2% jasnokomórkowy rak nerki, a pozostałe 6% obejmowało inne jednostki chorobowe. Co więcej, zarówno guz Wilmsa, jak i rak nerkowokomórkowy można rozpoznać u dzieci w wieku powyżej 10 lat, przy czym wystąpienie raka nerkowokomórkowego jest bardziej prawdopodobne w okresie dojrzewania [17]. W diagnostyce różnicowej obustronnych guzów w nerkach uwzględnia się

także chłoniaka nerkowego [18]. W jego przebiegu rozwija się uogólniona limfadenopatia, która wyklucza podejrzenie guza Wilmsa. Chłoniaki nerkowe wykrywa się u starszych dzieci, niż w typowej grupie wiekowej dla nefroblastoma.

Częstość występowania przerzutów odległych w chwili rozpoznania u dzieci z guzem Wilmsa szacuje się na ok. 20% [13]. Najczęstszym miejscem przerzutów odległych są płuca. W badaniach obrazowych często można zaobserwować wysięk opłucnowy, który zwykle jest wtórny do pęknięcia guza [19]. Przerzuty do węzłów chłonnych śródpiersia i wnęk są dosyć rzadkie, najczęściej związane z występowaniem agresywnego podtypu nowotworu nerek np. raka rdzeniastego niż guza Wilmsa. Zajęcie wątroby w przebiegu nefroblastoma wiąże się ze złym rokowaniem. Całkowite przeżycie u tych pacjentów oceniane jest na poziomie 60%, a warunkiem wyleczenia jest bezwzględne usunięcie wszystkich ognisk przerzutowych [15].

Decyzje o zastosowaniu wybranego schematu leczenia są uzależnione od stopnia zaawansowania zmiany oraz od wyniku badania histopatologicznego. W przebiegu nefroblastoma wyróżnia się stadia rozwoju w zależności od zasięgu lokalnego zmiany, nacieku okolicznych tkanek oraz obecności przerzutów odległych [13]. W niniejszej pracy w opisywanym przypadku stwierdzono stadium V – postać obustronną guza.

Przypadki z zajęciem dwóch nerek stanowią 6% wszystkich diagnozowanych guzów [20]. Postać obustronna nefroblastoma często rozwija się w wyniku mutacji genetycznych oraz współistnieje z zespołami wad wrodzonych [21]. Ponadto, częściej niż guzy jednostronne związana jest ze zjawiskiem nefroblastomatozy. Pod tym pojęciem rozumie się stwierdzane w nerkach embrionalnych ogniskowych pozostałości tkanki nefrogennej. Są to skupiska embrionalnych komórek nerkowych pozostające w dojrzałej, rozwiniętej nerce. Przyczyną ich rozwoju jest proces niepełnego różnicowania blastemy śródnerczowej w dojrzałej tkance nerkowej [22]. Często pod pojęciem choroby obustronnej nerek definiuje się obecność guza w jednej nerce, a ognisk nefroblastomatozy w drugiej nerce lub obecność ognisk w obu nerkach ze względu na niejasność wyników obrazowania [22].

Dotychczas wyróżniono dwa podstawowe typy ognisk nefroblastomatozy [18]. Kłasyfikuje się je na podstawie cech morfologicznych komórek oraz ich anatomicznego umiejscowienia w nerce. Pierwszym rodzajem jest nefroblastomatoza wewnątrzpłatkowa, w której komórki są umiejscowione pojedynczo w układzie zrębu. Występuje w niej dużo dojrzałych komórek tłuszczowych z zatartymi, niewyraźnymi granicami. Komórki te są zlokalizowane się w pobliżu rdzenia nerki. Drugim typem nefroblastomatozy są ogniska płatka nerkowego. Liczne ogniska są rozsiane na obrzeżach zrazika nerkowego. W ich budowie dominują komórki blastemalne o wyraźnych, dobrze odgraniczonych granicach. Z wiekiem mogą przekształcać się w struktury nabłonkowe lub ulegać stwardnieniu [18].

Ogniska nefroblastomatozy rzadko rozpoznaje się w diagnostyce jednostronnego guza Wilmsa. Są najczęściej wykrywane w analizie histopatologicznej, ze względu na mikroskopowe wymiary. W przypadku obustronnej nefroblastoma, ogniska nefroblastomatozy mogą być uwidocznione w badaniach obrazowych [19].

Zjawisko nefroblastomatozy określa się jako proces łagodny, który jednak może ulegać przemianie w proces złośliwy. W niektórych przypadkach obserwuje się także zanik zmian, który może być samoistny, lub wywołany chemioterapią [21, 22].

Najlepszym badaniem obrazowym do uwidocznienia w nerce ognisk nefroblastomatozy jest MRI z kontrastem. Cechuje się ono znacznie wyższą czułością niż USG jamy brzusznej, które może dać wyniki fałszywie ujemne. Wynika to z faktu, iż ogniska nefroblastomatozy są najczęściej izogeniczne w stosunku do tkanki nerkowej [22].

Przed rozwojem nowoczesnych technik obrazowania, w przypadku jednostronnego guza Wilmsa istotna była śródoperacyjna ocena nerki przeciwstronnej w celu wykrycia możliwych zmian nowotworowych. Obecne badania charakteryzują się wysoką czułością w rozpoznawaniu guzów obustronnych. Z tego powodu chirurgiczna ocena nerki przeciwnej ma miejsce tylko w przypadku nieprawidłowości wykrytych przedoperacyjnie.

W procesie diagnostycznym nadal dyskusyjna jest rola przedoperacyjnej biopsji igłowej. Grupa UKCCSG (*United Kingdom Children Cancer Study Group*) zbadała dokładność przezskórnej biopsji igłowej w celu opracowania wstępnej diagnozy i stwierdziła, że jedynie 4% próbek było oznaczonych jako niediagnostyczne, podczas gdy 85% potwierdziło rozpoznanie guza Wilmsa [23]. Dlatego autorzy wielu badań zalecają wykonanie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej w momencie rozpoznania. Pacjenci z przedstawionej grupy badawczej doznali minimalnych powikłań i nie wykazywali zwiększonego ryzyka wznowy miejscowej lub progresji choroby do wyższego stopnia zaawansowania. Zgodnie z zaleceniami obowiązujących w Europie programów terapeutycznych, diagnostyczną biopsję igłową wykonuje się wyłącznie w wybranych, niejasnych przypadkach [24].

Leczenie guza Wilmsa jest jednym z większych sukcesów współczesnej medycyny. W historii leczenia zabieg chirurgiczny zawsze był nieodłącznym elementem podstawowego leczenia guza Wilmsa. Podczas operacji stosuje się dostęp przezotrzewnowy [25], ponieważ nacięcie boczne jest nieodpowiednie w przypadku nefroblastoma. Przed zabiegiem należy dokładnie zbadać wszystkie sąsiadujące narządy jamy brzusznej, w tym przeciwległą nerkę. Przed wykonaniem radykalnej nefrektomii, preferowaną początkową procedurą jest podwiązanie tętnicy i żyły nerkowej. Guz Wilmsa jest guzem dobrze otorebkowanym, więc należy go usunąć bez naruszenia ciągłości torebki. Chirurg również musi szczególnie uważać, aby nie doprowadzić do śródoperacyjnego wycieku guza, gdyż wiąże się to z pogorszeniem rokowania [26].

Nie tak dawne dodanie i udoskonalenie chemioterapii oraz radioterapii miało ogromny wpływ na osiągnięcie poprawy wskaźników przeżycia pacjentów [49]. Co więcej, leczenie nowotworu nie wiąże się z występowaniem poważnych przewlekłych niepożądanych efektów leczenia. Nowoczesne schematy terapeutyczne zminimalizowały ekspozycję na radioterapię oraz próbują ograniczyć podawanie antracyklin, które należą do głównych czynników związanych z późnymi efektami ubocznymi. Jednak nadal są one wykorzystywane jako schemat leczenia pierwszoliniowego w guzach o wysokim stopniu zaawansowania. Niezwykle istotne jest rozważenie postępów w leczeniu guza Wilmsa na całym świecie, gdyż przeżywalność w krajach nisko rozwiniętych jest znacznie mniejsza w stosunku do krajów wysoko rozwiniętych.

Terapia multimodalna, obejmująca chirurgię, radioterapię i chemioterapię, obecnie stanowi pion schematu leczenia guza Wilmsa [49].

W Europie schematy leczenia są opracowane przez Międzynarodowe Towarzystwo Onkologii Dziecięcej (SIOP). Zastosowanie chemioterapii oraz dalszego leczenia jest

zależne od zaklasyfikowania pacjenta do danej grupy ryzyka. Europejski schemat leczenia podkreśla istotę prowadzenia chemioterapii przedoperacyjnej, ze względu na niebezpieczeństwo komplikacji zabiegu operacyjnego [49]. Najistotniejszym z nich jest śródoperacyjne pęknięcie guza oraz związany z tym wyciek tkanki, co znacząco pogarsza rokowanie u pacjentów. W związku z tym faktem zaakceptowano czterotygodniowy schemat prowadzenia chemioterapii przedoperacyjnej, obejmujący podawanie aktynomycyny i winkrysytyny dla wszystkich pacjentów od 6 miesiąca życia, ze zlokalizowaną postacią. W przypadku obecności przerzutów odległych leczenie przedoperacyjne jest dłuższe, trwa sześć tygodni i dodatkowo obejmuje podawanie doksorubicyny [27]. Chemioterapia pooperacyjna oraz radioterapia uzależniona jest od wyniku badania histopatologicznego oraz miejscowego stadium zaawansowania klinicznego.

Krajowa Grupa Badawcza ds. Guza Wilmsa (*National Wilms Tumor Study Group*, NWTSG) w USA zaleca przedoperacyjną chemioterapię podczas leczenia guza Wilmsa tylko w szczególnych przypadkach [10]. Jednym z nich jest wystąpienie obustronnego guza Wilmsa. Drugim z nich jest rozrost guza wewnątrzjamowo. Zmiana ta występuje w ok. 5% przypadków guza i równocześnie wiąże się z wystąpieniem u 40% powikłań chirurgicznych. W przypadku zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej odsetek ten zmniejsza się o 15%. Trzecim wskazaniem są tzw. guzy nieoperacyjne – duże, rozlane guzy obejmujące ważne dla życia struktury, których resekcja wiąże się z poważnymi konsekwencjami, jak i również utratą życia [27]. Wstępna chemioterapia jest w stanie znacznie zmniejszyć pierwotne wymiary guza, co istotnie obniża ryzyko powikłań chirurgicznych – zwłaszcza pęknięcia guza, oraz spowalnia wzrost guza, co z kolei pozwala na mniej intensywną chemioterapię pooperacyjną i zmniejsza potrzebę użycia radioterapii [27]. W większości pozostałych przypadków guza Wilmsa protokoły opracowane przez NWTSG zalecają najpierw wykonanie nefrektomii, a dopiero następnie chemioterapii dostosowanej do stopnia zaawansowania guza.

Pomimo odmiennych schematów leczenia, całkowite przeżycie wolne od zdarzeń jest zbliżone w grupach pacjentów leczonych zgodnie z protokołami europejskimi, jak i amerykańskimi [28], i wynosi obecnie 85-90%, przy wykorzystaniu terapii multimodalnej [29].

Obustronne zajęcie nerek w przebiegu guza Wilmsa występuje u około 6% dzieci [10]. Głównym założeniem leczenia grupy osób z obustronną postacią choroby jest oszczędzający zabieg chirurgiczny wycięcia zmiany z jednoczesnym zachowaniem jak największej objętości miąższu nerki. Ma to na celu zapewnienie wystarczającej wydolności nerek, gdyż powikłanie w postaci niewydolności nerek prowadzi do pogorszenia stanu zdrowia pacjenta, a co za tym idzie jakości jego życia. Wpływ ten może być szczególnie zauważalny u dzieci z obustronnym guzem Wilmsa, które są często młodsze niż dzieci z jednostronnym guzem i mogą być jednocześnie obciążone dodatkowymi wadami wrodzonymi [49]. W Europie schematy leczenia onkologicznego opracowane przez SIOP wymagają rozpoczęcia leczenia pacjentów z obustronnym guzem Wilmsa od wydłużonej do 8-12 tygodni neoadiuwantowej chemioterapii, następnie przeprowadzenia, w zależności od zaawansowania miejscowego, zabiegu tumoronefektomii lub heminefektomii oraz kontynuowania chemioterapii pooperacyjnej w wybranych przypadkach jednocześnie z radioterapią.

Celem niniejszej pracy jest opis rzadkiej postaci guza Wilmsa – najczęstszego nowotworu nerek u dzieci oraz podkreślenie zależności sukcesu terapeutycznego od wczesnej diagnostyki zmiany.

2. Opis przypadku

U dwuletniej, dotychczas zdrowej, bezobjawowej dziewczynki, w trakcie badań przesiewowych wczesnego wykrywania nowotworów u dzieci, wykonanych we wrześniu 2018 roku, w USG jamy brzusznej wykryto podejrzaną zmianę tkankową w nerce prawej.

Pacjentka została skierowana do Kliniki Hemato-Onkologii Dziecięcej w Lublinie celem dalszej diagnostyki i leczenia. W chwili przyjęcia stan ogólny dziecka był bardzo dobry, dziewczynka nie zgłaszała żadnych dolegliwości, w badaniu fizykalnym nie stwierdzono istotnych odchyleń od normy, bez wyczuwalnych patologicznych zmian w obrębie jamy brzusznej. Poszerzono diagnostykę o szereg badań dodatkowych. Wyniki badań laboratoryjnych, w tym parametry nerkowe, zapalne oraz analiza moczu, pozostawały w granicach normy. Wykonane ponownie badanie USG jamy brzusznej potwierdziło obecność zmiany tkankowej mogącej odpowiadać nerczakowi zarodkowemu (nefroblastoma) w nerce prawej oraz mniejszą, ale o podobnym charakterze, zmianę w nerce lewej. Badanie TK jamy brzusznej potwierdziło podejrzenie obustronnego guza Wilmsa, bez widocznych zmian nowotworowych w obrębie pozostałych narządów, węzłów chłonnych i dużych naczyń krwionośnych jamy brzusznej. Badanie TK klatki piersiowej wykluczyło obecność zmian przerzutowych w obrębie płuc. Wykonano badanie genetyczne, w którym wykryto obecność mutacji genu WT1, całościowa analiza wskazywała na ojcowskie pochodzenie mutacji genów.

Na podstawie oceny całości obrazu klinicznego oraz wyników wykonanych badań diagnostycznych rozpoznano obustronny guz Wilmsa bez obecności zmian przerzutowych. Rozpoczęto chemioterapię przedoperacyjną wg Programu SIOPI 2001, w trakcie chemioterapii przedoperacyjnej dziewczynka otrzymała łącznie 8 bloków chemioterapii (naprzemiennie winkrystyna i winkrystyna z aktynomycyną). W wykonanych przed planowanym zabiegiem operacyjnym kontrolnych badaniach obrazowych (USG i TK) stwierdzono umiarkowaną regresję wymiarów zmian w obu nerkach. Następnie u pacjentki wykonano heminefrektomię prawostronną z biopsją regionalnych węzłów chłonnych, a po 3 tygodniach heminefrektomię lewostronną również z biopsją regionalnych węzłów. Badanie histopatologiczne pobranego materiału potwierdziło rozpoznanie nefroblastoma o pośrednim stopniu złośliwości ze współistniejącymi ogniskami nefroblastomatozy w obu nerkach, bez obecności zmian przerzutowych we wszystkich ocenianych węzłach chłonnych. Stopień zaawansowania klinicznego w obu nerkach ustalono jako II. Po zabiegach chirurgicznych kontynuowano na trwającą 27 tygodni chemioterapię pooperacyjną, obejmującą kontynuację podawania winkrystyny i aktynomycyny. Leczenie zakończono w czerwcu 2019 roku. Ze względu na obecne ogniska nefroblastomatozy jako leczenie uzupełniające przeprowadzono chemioterapię podtrzymującą z użyciem winkrystyny i aktynomycyny. Leczenie trwało 12 miesięcy, łącznie podano 12 cykli. Całość leczenia przeciwnowotworowego zakończono w czerwcu 2020 roku.

Obecnie pacjentka pozostaje w pełnej remisji klinicznej, jest około 9 miesięcy po zakończonym leczeniu. Regularnie wykonywane kontrolne badania obrazowe i laboratoryjne, poza zmianami pooperacyjnymi widocznymi w obu nerkach, nie wykazują istotnych odchyleń. Dziewczynka rozwija się prawidłowo, prawidłowa czynność nerek jest zachowana.

3. Dyskusja

Guz Wilmsa jest jednym z lepiej rokujących nowotworów wieku dziecięcego. Skojarzona terapia, rozpoczęta odpowiednio wcześniej, umożliwia uzyskanie nawet ponad 85% wieloletniego przeżycia wolnego od zdarzeń [30]. Najlepsze wyniki osiąga się u pacjentów z guzem diagnozowanym w I i II stadium zaawansowania. W tej grupie uzyskuje się ponad 95% wyleczeń. Nieco gorsze rokowanie mają guzy w III i IV stopniu zaawansowania – odpowiednio 75% oraz 65% [37, 38]. Guzy obustronne cechują się najgorszym rokowaniem – według NWTSG wieloletnie przeżycie udaje się uzyskać tylko od 12% do 56% pacjentów [39, 40].

Czynnikiem mającym kluczowe znaczenie rokownicze u pacjentów z guzem Wilmsa jest wczesne rozpoznanie i rozpoczęcie leczenia. Badanie przeprowadzone przez Pritcharda-Jonesa i wsp. [41] wykazało różnice między systemem zdrowotnym Niemiec i Wielkiej Brytanii w zakresie diagnostyki guzów nerek u dzieci, co bezpośrednio przełożyło się na odsetek wyleczeń u pacjentów. W brytyjskim systemie zdrowotnym podstawowym przedstawicielem medycznym był lekarz rodzinny, podczas gdy w Niemczech dzieci były konsultowane przez kwalifikowanych pediatrów. Badanie wykazało, że w Niemczech nowotwory były diagnozowane szybciej, na wczesnych etapach rozwoju, w porównaniu do Wielkiej Brytanii, gdzie u większego odsetka dzieci guzy rozpoznawane były później, przy wyższym stopniu zaawansowania. W Niemczech większa część guzów była wykrywana przypadkowo, zanim rozwinęły się objawy kliniczne. Natomiast w Wielkiej Brytanii guzy częściej wykrywano w związku z wystąpieniem dolegliwości. Pomędzy badanymi krajami stwierdzono 3% różnicę w częstości osiągnięcia wieloletniego przeżycia wolnego od zdarzeń [34].

Mając na uwadze zwiększone ryzyko występowania guza Wilmsa u dzieci z zespołami wad wrodzonych takimi jak: zespół Edwardsa, zespół Denysa-Drasha, czy zespół Perlmana, Mussa i wsp. przeanalizowali wpływ badań skринingowych wykonywanych u pacjentów z zespołem Beckwitha-Wiedemana na częstość wykrywania zmian typu nefroblastoma [9]. Analiza potwierdziła, że u bezobjawowych dzieci, u których regularnie wykonywano badania obrazowe, guz Wilmsa był wykrywany częściej na wcześniejszych stadiach rozwoju, w porównaniu do pacjentów, u których nie wykonywano takich badań. Badania przesiewowe umożliwiły rozpoznanie ponad 95% guzów u tych dzieci [42].

Rokowanie w guzie Wilmsa jest także zależne od wystąpienia nawrotów choroby – miejscowych, jak i zlokalizowanych poza tkanką nerkową. Czynnikiem bezpośrednio wpływającym na wieloletnie przeżycie jest nawrót choroby. Nawroty najczęściej obserwuje się w ciągu dwóch pierwszych lat od zakończenia leczenia [43]. Po dłuższym okresie obserwacji, ponowne zachorowania są sporadyczne. Wystąpienie nawrotu znacznie pogarsza rokowanie u pacjentów – według badań wieloletnie przeżycie udaje się uzyskać jedynie u połowy pacjentów. W przebiegu nefroblastoma najczęstszymi miejscami nawrotów są kolejno: płuca (58%), miejsce pierwotne guza (29%) oraz wątroba (15%) [44]. Badania wykazały, że gorsze przeżycie uzyskuje się u pacjentów z obecnością wznowy w wątrobie niż w płucach [45, 46].

Największym ryzykiem wznowy miejscowej są objęci pacjenci z zajętymi węzłami chłonnoymi, wyciekami śródoperacyjnym podczas heminefrektomii oraz z guzami o anaplastycznej histologii [47]. Z tego powodu podkreśla się istotę regularnych badań obrazowych jamy brzusznej, a mając na uwadze najczęstsze lokalizacje nawrotów – także obrazowanie klatki piersiowej przy użyciu TK z kontrastem lub wykonanie zdjęcia rentgenowskiego (RTG).

Z powodu ryzyka nawrotów, pacjenci po zakończeniu leczenia powinni pozostawać pod stałą kontrolą onkologiczną [10]. Regularne obrazowe badania kontrolne umożliwiają szybkie wykrycie nawrotu guza, przed wystąpieniem objawów klinicznych. Wczesne rozpoznanie wznowy wiąże się z lepszymi wskaźnikami prognostycznymi [10].

Pomimo udoskonalenia metod diagnostycznych i terapeutycznych, zwłaszcza technik operacyjnych i radioterapii, wyniki leczenia pacjentów z obustronnym guzem Wilmsa nadal są niezadowolające. Ponadto, istotnym problemem u tych pacjentów jest możliwość wystąpienia niewydolności nerek, która ma bezpośredni związek z zakresem resekcji nerek [30].

W retrospektywnym badaniu przeanalizowano wyniki leczenia dzieci z obustronnym guzem Wilmsa w ośrodku prowadzonym przez Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) Wilms Tumor Regimen [41]. Od 1990 roku do 2016 roku leczono 30 pacjentów według schematu obejmującego chemioterapię z użyciem winkrystyny i aktynomycyny (VCR i ACT-D). Chemioterapia miała na celu przekształcenie guzów nieresekcyjnych w te możliwe do resekcji. Następnie wykonywano zabieg usunięcia guza z oszczędzeniem tkanki nerkowej. U dwudziestu dwóch pacjentów wykonano radykalną nefrektomię na nerce z większym guzem, a operację oszczędzającą – na nerce przeciwległej z mniejszym guzem [41]. Sześciu pacjentów miało wykonany obustronny zabieg oszczędzający tkankę nerkową. Dziesięcioletnie przeżycie wolne od zdarzeń oraz przeżycie całkowite udało się uzyskać odpowiednio u 82% i 86% pacjentów z tych grup. Badanie wykazało, że zastosowanie chemioterapii przedoperacyjnej z użyciem VCR i ACT-D umożliwia następowe wykonanie bezpiecznych resekcji. Analiza podkreśliła znaczenie wykonywania zabiegów oszczędzających nefron u pacjentów z obustronnym guzem Wilmsa [41].

W badaniu opisywanym w pracy Millar i wsp. poddano analizie 190 pacjentów leczonych z powodu guza Wilmsa w latach 1981-2003 [49]. U 19 (10%) chorych stwierdzono nefroblastoma w stadium V. 95% obustronnych guzów współistniało z ogniskami nefroblastomatozy. U wszystkich chorych zastosowano leczenie zgodne z protokołami NWTSG [49]. Terapia składała się z chemioterapii neoadjuwantowej oraz wycięcia guza. W przypadkach, w których było to możliwe stosowano nefrektomię częściową. U 6 pacjentów stwierdzono nawroty w lokalizacji pozanerkowej. Obserwacja pacjentów trwała od 1 do 15 lat po zakończonym leczeniu. Wykazano, że 10 pacjentów osiągnęło wieloletnie przeżycie wolne od zdarzeń. Wszyscy w tej grupie zachowali bardzo dobrą czynność nerek – przesączanie kłębuszkowe było nie niższe niż 85 ml/min/1,73. Dziewięcioro pacjentów zmarło w trakcie obserwacji z powodów innych niż nefroblastoma [49]. Badanie wykazało, że stosowanie chemioterapii w skojarzeniu z operacją oszczędzającą może skutkować dobrymi rezultatami. Pacjenci po operacji oszczędzającej mogą zachować długoletnie przeżycie wolne od choroby z zachowaną maksymalną czynnością nerek [49].

W badaniach Hubertus i wsp. wykazano, że odsetek pacjentów, u których rozwinęło się nadciśnienie tętnicze podczas wieloletniej obserwacji po wyleczeniu guza Wilmsa, sięgał 30% [50]. Mając na uwadze powyższe parametry, oceniono funkcję nerek u obserwowanych pacjentów. Obliczenia na podstawie wzoru Schwartza wykazały, że ponad 35% pacjentów miało nieznacznie obniżoną czynność nerek (eGFR < 90 ml/min/1,73m), ale żaden z wyników nie był niższy niż 60 ml/min/1,73 [51].

Wyniki leczenia i odległe następstwa terapii przeprowadzanych u dzieci z obustronnym guzem nerek były również przedmiotem badań Tan i wsp. [52]. Przeprowadzono analizę 301 dzieci, u których w ciągu 15 lat zdiagnozowano guz Wilmsa [52]. Stwierdzono 18 przypadków (6%) wystąpienia obustronnego guza, z czego 10 pacjentów (56%) było płci męskiej, a średni wiek w momencie operacji wynosił 2 lata. Zastosowanie przedoperacyjnej chemioterapii nie dało jednoznacznych wyników [52]. Całkowitą odpowiedź na leczenie otrzymano jedynie u 8,3% pacjentów, z czego częściową odpowiedź u 44,4%, a stabilizację choroby uzyskano u 36,2%. U 11% nastąpiła progresja choroby do bardziej zaawansowanego stadium. Spośród wymienionych 18 pacjentów jedynie dwóch przeszło jednostronny zabieg oszczędzający tkankę nerkową z przeciwległą nefrektomią, a obustronna operacja oszczędzająca została skutecznie wykonana w pozostałych przypadkach [52]. Radykalną nefrektomię zastosowano jako podstawowy etap leczenia w przypadku wystąpienia rozlanego guza wraz z obecną skrzepliną po tej samej stronie, naciekającego żyłę główną dolną lub moczowód. U dwojga dzieci z niekorzystną histologią doszło do wczesnego nawrotu choroby, nawet po zintensyfikowaniu chemioterapii oraz wykorzystaniu radioterapii. Ostatecznie oboje pacjentów zmarło z powodu zaawansowania choroby [52]. Wskazuje to na fakt, że histologia guza jest także istotnym czynnikiem rokowniczym.

W grupie obserwowanych pacjentów wśród najczęstszych powikłań choroby i związanych z nią leczeniem było nadciśnienie zdiagnozowane u 16%, infekcje dróg moczowych u 11% oraz przemijająca niewydolność nerek u 5%. Po zakończonej obserwacji trwającej 41 miesięcy, wszyscy pacjenci mieli bardzo dobre parametry czynności nerek wskazujące na wartość EGFR nie mniejszą niż 75 ml/min/1,73 [52].

Z analizy powyższych danych wynika, że na wyniki leczenia dzieci z nefroblastoma wpływa wiele czynników. Jak już wspomniano, kluczowym elementem jest wczesna diagnostyka i rozpoczęcie leczenia w najniższym stadium zaawansowania klinicznego. U prezentowanej w niniejszym badaniu pacjentki było to możliwe dzięki zastosowaniu badań przesiewowych, pozwalających rozpoznać chorobę u pozornie zdrowego dziecka. Bezpieczne i powszechnie dostępne badanie, jakim jest USG jamy brzusznej, pozwala wychwycić nawet niewielkie, początkowe zmiany w nerkach. Dzieci, u których stwierdza się jakiegokolwiek nieprawidłowości w badaniach przesiewowych powinny niezwłocznie kontynuować diagnostykę oraz rozpocząć leczenie w ośrodkach specjalistycznych.

Kolejnym, istotnym prognostycznie czynnikiem u dzieci z obustronnym guzem Wilmsa jest indywidualnie ustalony plan leczenia. O ile wybór schematu chemioterapii podyktowany jest obowiązującym protokołem terapeutycznym, decyzja o leczeniu operacyjnym, jego zakresie i technice, powinna być podjęta bardzo rozważnie. U opisywanej w przedstawionym badaniu pacjentki, mimo przeprowadzenia zabiegów podwójnej nefrektomii, udało się uzyskać zadowalające efekty leczenia oraz zminimalizować ryzyko wystąpienia odległych, niekorzystnych następstw.

Mając na uwadze ryzyko wznowy, tak miejscowej, jak i odległej, na którą szczególnie narażone są dzieci z obustronnymi ogniskami nefroblastomatozy oraz nefroblastoma, jak to miało miejsce u przedstawianej pacjentki, niezmiernie ważna jest systematyczna kontrola obrazowa. Natomiast regularnie wykonywane badania laboratoryjne pozwalają wychwycić na wczesnym etapie rozwój zaburzeń prawidłowej funkcji nerek. Z tego względu istotne jest ściśle monitorowanie pacjentów i systematyczna kontrola onkologiczna. W przypadku pojawienia się jakichkolwiek odchyień wskazane jest pogłębienie diagnostyki i wdrożenie odpowiedniego postępowania.

4. Wnioski

Obustronny guz Wilmsa wiąże się z bardziej agresywną terapią niż choroba jednostronna. W chorobie jednej nerki postępowanie terapeutyczne jest ukierunkowane na radykalne usunięcie wszystkich ognisk nowotworu, natomiast w przypadku guza obustronnego celem każdego postępowania powinno być dodatkowo dążenie do zachowania jak najlepszej funkcji nerek.

Radykalna nefrektomia wiąże się z maksymalizacją szans na wieloletnie przeżycie wolne od choroby, jednak operacja oszczędzająca tkankę nerkową powinna być celem w leczeniu zmian obustronnych. Takie postępowanie pozwala ograniczyć rozwój przedwczesnej niewydolności nerek, związanej z koniecznością leczenia nerkozastępczego, co znacznie pogarsza jakość życia.

Wykrycie ognisk nefroblastomatozy przy współistniejącym guzie Wilmsa powinno wzbudzić czujność diagnostyczną. Obecność tych zmian wymaga intensyfikacji kontroli przy użyciu badań obrazowych po zakończonym leczeniu. Istotne jest monitorowanie klatki piersiowej oraz całej jamy brzusznej w celu wczesnej diagnozy możliwych nawrotów choroby, których wystąpienie znacząco pogarsza rokowanie pacjentów.

Sukces leczenia jest w dużym stopniu zależny od wykrywania zmian na wczesnym etapie rozwoju. Pozwala to uniknąć dodatkowych, agresywnych dla organizmu schematów leczenia oraz skutkuje lepszymi wynikami terapeutycznymi. Istotne w chorobach nowotworowych są badania przesiewowe u dzieci, dlatego podkreśla się konieczność częstego ich wykonywania przy niejasnych objawach. Lekarze rodzinni powinni kierować pacjentów na dodatkowe badania obrazowe przy jakichkolwiek wątpliwościach diagnostycznych, gdyż choroby nowotworowe cechują się długim, bezobjawowym rozwojem.

Literatura

1. Gratias E.J., Dome J.S., Jennings L.J., Chi Y.Y., Tian J., Anderson J., *Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group*, J. Clin. Oncol., 34(26), 2016, s. 3189-94.
2. Irtan S., Ehrlich P.F., Pritchard-Jones K., *Wilms tumor: "State-of-the-art" update*, Semin Pediatr Surg., 25(5), 2016, s. 250-6.
3. Termuhlen A.M., Tersak J.M., Liu Q., Yasui Y., Stovall M., Weathers R., *Twenty-five year follow-up of childhood Wilms tumor: a report from the Childhood Cancer Survivor Study*, Pediatr. Blood Cancer, 57(7), 2011, s. 1210-6.
4. Wong K.F., Reulen R.C., Winter D.L., Guha J., Fidler M.M., Kelly J., *Risk of Adverse Health and Social Outcomes Up to 50 Years After Wilms Tumor: The British Childhood Cancer Survivor Study*, J. Clin. Oncol., 34(15), 2016, s. 1772-9.

5. Bernstein L., Linet M., Smith M.A., Olshan A.F., *Guzy nerek*, [w:] Ries LAG, Smith MA, Gurney JG (red.), *Cancer incidence and survival among children and adolescents*, National Cancer Institute, SEER Program, Bethesda, NIH Publ., 99-4649, 1999, s. 79-90.
6. Kramer S., Meadows A.T., Jarrett P., *Racial variation in incidence of Wilms' tumor: relationship to congenital anomalies*, *Med. Pediatr. Oncol.*, 12, 1984, s. 401-405.
7. Aydın B., Akyüz C., Yalçın B., Ekinci S., Oğuz B., Akçören Z., Yıldız F., Varan A., Kurucu N., Büyükpamukçu M., Kutluk T., *Bilateral Wilms tumors: Treatment results from a single center*, *Turk. J. Pediatr.*, 61(1), 2019, s. 44-51.
8. Paya K., Horcher E., Lawrenz K., Rebhandl W., Zoubek A., *Bilateral Wilms' tumor-surgical aspects*, *Eur. J. Pediatr. Surg.*, 11(2), 2001, s. 99-104.
9. Pendergrass T.W., *Congenital anomalies in children with Wilms' tumor: a new survey*, *Cancer*, 37(1), 1976, s. 403-8.
10. Green D.M., *The diagnosis and management of Wilms' tumor*, *Pediatr. Clin. North. Am.*, 32(3), 1985, s.735-54.
11. Vujančić G.M., Sandstedt B., Harms D., Kelsey A., Leuschner I., de Kraker J., *SIOP Nephroblastoma Scientific Committee. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood*, *Med. Pediatr. Oncol.*, 38(2), 2002, s. 79-82.
12. Granger J., Gidvani V.K., *Acquired factor VII deficiency associated with Wilms tumor*, *Pediatr. Blood. Cancer*, 52(3), 2009, s. 394-5.
13. Friedman A.D., *Wilms tumor*, *Pediatr Rev.*, 34(7), 2013, s. 328-330.
14. Servaes S.E., Hoffer F.A., Smith E.A., Khanna G., *Imaging of Wilms tumor: an update*, *Pediatr. Radiol.*, 49(11), 2019, s.1441-1452.
15. Servaes S.E., Hoffer F.A., Smith E.A., Khanna G., *Imaging of Wilms tumor: an update*, *Pediatr Radiol.*, Oct;49(11), 2019, s. 1441-1452.
16. Applegate K., Ghei M., Perez-Atayde A., *Prenatal detection of Wilms tumor*, *Pediatric Radiology*, 29(1), 1999, s. 64-67.
17. Ehrlich P.F., Ferrer F.A., Ritchey M.L., Anderson J.R., Green D.M., Grundy P.E., Dome J.S., Kalapurakal J.A., Perlman E.J., Shamberger R.C., *Hepatic metastasis at diagnosis in patients with Wilms tumor is not an independent adverse prognostic factor for stage IV Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group/National Wilms Tumor Study Group*, *Ann. Surg.*, 250(4), 2009, s. 642-8.
18. Stanescu A.L., Acharya P.T., Lee E.Y., Phillips G.S., *Pediatric Renal Neoplasms MR Imaging-Based Practical Diagnostic Approach*, *Magn Reson Imaging Clin N Am.*, 27(2), 2019, s. 279-290.
19. Dome J.S., Perlman E.J., Graf .N., *Risk stratification for wilms tumor: current approach and future directions*, *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 201;4(1), s. 215-23.
20. Coppes M.J., de Kraker J., van Dijken P.J., Perry H.J., Delemarre J.F., Tournade M.F., Lemerle J., Voûte P.A., *Bilateral Wilms' tumor: long-term survival and some epidemiological features*, *J. Clin. Oncol.*, 7(3), 1989, s. 310-5.
21. Gadd S., Huff V., Huang C.C., Ruteshouser E.C., Dome J.S., Grundy P.E., Breslow N., Jennings L., Green D.M., Beckwith J.B., Perlman E.J., *Clinically relevant subsets identified by gene expression patterns support a revised ontogenic model of Wilms tumor: a Children's Oncology Group Study*, *Neoplasia*, 14(8), 2012, s. 742-56.
22. Jesus L.E., Fulgencio C., Leve T.C., Dekermacher S., *Nephroblastomatosis and wilms tumor: dangerous liaisons*, *Int Braz J Urol.*, 20(1), 2020, s. 47.
23. Green D.M., *The evolution of treatment for Wilms tumor*, *J Pediatr Surg.*, 48(1), 2013, s. 14-9.
24. Beckwith J.B., Kiviat N.B., Bonadio J.F., *Nephrogenic rests, Nephroblastomatosis, and the Pathogenesis of Wilms' Tumor*, *Fetal & Pediatric Pathology*, 10(1-2), 1990, s. 1-36.

25. Hennigar R.A., O'Shea P.A., Grattan-Smith J.D., *Clinicopathologic features of nephrogenic rests and nephroblastomatosis*, *Advances in Anatomic Pathology*, 8(5), 2001, s. 276-289.
26. Perlman E.J., *Hyperplastic perilobar nephroblastomatosis: long-term survival of 52 patients*, *Pediatric Blood & Cancer*, 46(2), 2006, s. 203-221.
27. Charlton J., Irtan S., Bergeron C., Pritchard-Jones K., *Bilateral Wilms tumour: a review of clinical and molecular features*, *Expert. Rev. Mol. Med.*, 2017, s. 18;19.
28. Gyls-Morin V., Hoffer F.A., Kozakewich H., *Wilms tumor and nephroblastomatosis: obrazowanie charakterystyki w obrazowaniu MR wzmoconym gadolinem*, *Radiology*, 188, 1993, s. 517-521.
29. Brisse H.J., de la Monneraye Y., Cardoen L., Schleiermacher G., *From Wilms to kidney tumors: which ones require a biopsy?*, *Pediatr. Radiol.*, 50(8), 2020, s. 1049-1051.
30. Aldrink J.H., Heaton T.E., Dasgupta R.E., *American Pediatric Surgical Association Cancer Committee. Update on Wilms tumor*, *J Pediatr Surg.*, 54(3), 2019, s. 390-397.
31. Kim S., Chung D.H., *Pediatric solid malignancies: neuroblastoma and Wilms' tumor*, *Surg. Clin. North. Am.*, 86(2), 2006, s. 469-87.
32. *National Wilms Tumor Study Committee, Wilms' tumor: status report*, *J. Clin. Oncol.*, 9, 1991, s. 877-887.
33. Godzinski J., *The current status of treatment of Wilms' tumor as per the SIOP trials*, *J. Indian Assoc. Pediatr. Surg.*, 20(1), 2015, s. 16-20.
34. Israels T., *Wilms tumor in Africa: challenges to cure*, *Pediatr Blood Cancer*, 58(1), 2012, s. 3-4.
35. Sonn G., Shortliffe L.M., *Management of Wilms tumor: current standard of care*, *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 5(10), 2008, s. 551-60.
36. Israels T., *Wilms tumor in Africa: challenges to cure*, *Pediatr. Blood Cancer*, 58(1), 2012, s. 3-4.
37. Szavay P., Luithle T., Garf N., Furtwangler R., Fuchs J., *Primary hepatic metastases in nephroblastoma – a report of the SIOP / GPOH study*, *J. Pediatr. Surg.*, 41, 2006, s. 168-172.
38. Varan A., *Wilms' tumor in children: an overview*, *Nephron. Clin. Pract.*, 108(2), 2008, s. 83-90.
39. Breslow N.E., Collins A.J., Ritchey M.L., Grigoriev Y.A., Peterson S.M., Green D.M., *End stage renal disease in patients with Wilms tumor: results from the National Wilms Tumor Study Group and the United States Renal Data System*, *J. Urol.*, 174(5), 2005, s. 1972-5.
40. Rudin C., Pritchard J., Fernando O.N., Duffy P.G., Trompeter R.S., *Renal transplantation in the management of bilateral Wilms tumor (BWT) and of Denys – Drash syndrome (DDS)*, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 13(6), 1998, s. 1506-1510.
41. Ertan S., Ehrlich P.F., Pritchard-Jones K., *Wilms tumor: "State-of-the-art" update*, *Semin. Pediatr. Surg.*, 25(5), 2016, s. 250-256.
42. Mussa A., Duffy K.A., Carli D., Griff J.R., Fagiano R., Kupa J., Brodeur G.M., Ferrero G.B., Kalish J.M., *The effectiveness of Wilms tumor screening in Beckwith-Wiedemann spectrum*, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 145(12), 2019, s. 3115-3123.
43. Brok J., Lopez-Yurda M., Tinteren H.V., *Relapse of Wilms tumor and detection methods: a retrospective analysis of the 2001 Renal Tumor Study Group - International Society of Pediatric Oncology Wilms' Tumor Protocol Database*, *Lancet Oncol.*, 19, 2018, s. 1072-1081.
44. Grundy P., Breslow N., Green D.M., Sharples K., Evans A., D'Angio G.J., *Prognostic factors for children with recurrent Wilms' tumor: results from the Second and Third National Wilms' Tumor Study*, *J. Clin. Oncol.*, 7(5), 1989, s. 638-47.

45. Szavay P., Luithle T., Garf N., Furtwangler R., Fuchs J., *Primary hepatic metastases in nephroblastoma – a report of the SIOP / GPOH study*, J. Pediatr. Surg., 41, 2006, s. 168-172.
46. Varan A., *Wilms' tumor in children: an overview*, Nephron. Clin. Pract., 108(2), 2008, s. 83-90.
47. Shamberger R.C., Guthrie K.A., Ritchey M.L., Haase G.M., Takashima J., Beckwith J.B., D'Angio G.J., Green D.M., Breslow N.E., *Surgery-related factors and local recurrence of Wilms tumor in National Wilms Tumor Study 4*, Ann. Surg., 229(2), 1999, s. 292-7.
48. Aydın B., Akyüz C., Yalçın B., Ekinci S., Oğuz B., Akçören Z., Yıldız F., Varan A., Kurucu N., Büyükpamukçu M., Kutluk T., *Bilateral Wilms tumors: Treatment results from a single center*, Turk. J. Pediatr., 61(1), 2019, s. 44-51.
49. Millar A.J., Davidson A., Rode H., Numanoglu A., Hartley P.S., Daubenton J.D., Desai F., *Bilateral Wilms' tumors: a single-center experience with 19 cases*, J. Pediatr. Surg., 40(8), 2005, s. 1289-94.
50. Hubertus J., *Development of hypertension is less frequent after bilateral nephron sparing surgery for bilateral Wilms tumor in a long-term survey*, The Journal of Urology, 193(1), 2015, s. 262-266.
51. Davidoff A.M., *Overall survival and renal function of patients with synchronous bilateral Wilms Tumor undergoing surgery at a single institution*, Annals of Surgery, 262(4), 2015, s. 570-576.
52. Tan X.H., Zhang D.Y., Liu X., Lin T., He D.W., Li X.L., Wei G.H., *Retrospective analysis to determine outcomes of patients with bilateral Wilms tumor undergoing nephron sparing surgery: 15-year tertiary single-institution experience*, Pediatr. Surg. Int., 34(4), 2018, s. 427-433.

Obustronny guz Wilmsa – wczesne rozpoznanie gwarancją sukcesu

Streszczenie

Wstęp: Guz Wilmsa zazwyczaj rozwija się od 2. do 5. r.ż. W 10% pojawia się obustronnie. Związany jest z mutacją genu WT1. Wykrywany jest przypadkowo przy powiększeniu obwodu brzucha. Wczesne objawy kliniczne są rzadkie. Guz bywa związany ze stanem przednowotworowym – nefroblastomatozą.

Celem niniejszej pracy jest opis rzadkiej postaci guza Wilmsa – najczęstszego nowotworu nerek u dzieci oraz podkreślenie zależności sukcesu terapeutycznego od wczesnej diagnostyki zmiany.

Opis przypadku: U dwuletniej zdrowej dziewczynki w badaniach przesiewowych wykryto w USG podejrzaną zmianę w nerce prawej. Dziecko skierowano do Kliniki Onkologii celem dalszej diagnostyki. W TK jamy brzusznej stwierdzono obecność zmian typowych dla guza Wilmsa w obu nerkach. Wykryto mutację genu WT1. Na podstawie oceny całości obrazu klinicznego rozpoczęto chemioterapię przedoperacyjną. Wykonano obustronne heminefrectomie z biopsją regionalnych węzłów chłonnych. Histopatologicznie rozpoznano nefroblastoma z ogniskami nefroblastomatozy, bez zmian nowotworowych w węzłach. W oparciu o wyniki badań patomorfologicznych przeprowadzono trwającą 27 tygodni chemioterapię pooperacyjną, a następnie roczną terapię podtrzymującą. Obecnie dziecko pozostaje 6 miesięcy po zakończonym leczeniu, w pełnej remisji klinicznej.

Wnioski: Mimo wysokiego stopnia zaawansowania obustronny guz Wilmsa rozpoznany odpowiednio wcześniej nie przekreśla szans na pełne wyleczenie i osiągnięcie trwałej remisji.

Guz nie daje typowych wczesnych objawów, dlatego podkreśla się znaczenie badań obrazowych przy każdym problemach klinicznych.

Podwójna heminefrectomia nie pogarsza istotnie jakości życia i prawidłowego funkcjonowania nerek.

Słowa kluczowe: heminefrectomia, nefroblastomatoza, guz Wilmsa

Bilateral Wilms tumor – early diagnosis ensures success

Abstract

Background: Wilms tumor usually develops between 2 and 5 years of age. In 10%, it occurs bilaterally. It is associated with WT1 gene mutation. It is detected incidentally with abdominal girth enlargement. Early clinical symptoms are rare. The tumor is sometimes associated with a precancerous condition – nephroblastomatosis.

The aim of this paper is to describe a rare form of Wilms tumor, the most common renal neoplasm in children, and to emphasize the dependence of therapeutic success on early diagnosis of the lesion.

Case report: In a 2-year-old healthy girl, a suspicious lesion in the right kidney was detected on ultrasound during screening. The child was referred to the Department of Oncology for further diagnostics. Abdominal CT showed typical Wilms tumor lesions in both kidneys. WT1 gene mutation was detected. Based on the evaluation of the whole clinical picture, preoperative chemotherapy was started. Bilateral heminephrectomies with biopsy of regional lymph nodes were performed. Histopathologically, the diagnosis was nephroblastoma with foci of nephroblastomatosis, without neoplastic changes in the nodes. Based on the pathomorphological findings, 27 weeks of postoperative chemotherapy, followed by one year of maintenance therapy, was administered. Currently, the child remains 6 months post-treatment, in full clinical remission.

Conclusions: Despite its high grade, bilateral Wilms' tumor diagnosed early enough does not negate the chances of complete cure and achieving durable remission.

The tumor does not produce typical early symptoms, therefore the importance of imaging studies in every clinical problem is emphasized.

Double heminephrectomy does not significantly impair the quality of life and normal renal function.

Keywords: heminephrectomy, nephroblastomatosis, Wilms tumor

Interdyscyplinarne diagnozowanie raka piersi

1. Wstęp

Celem pracy był przegląd nowych doniesień naukowych tj. prac kazuistycznych i eksperymentalnych dotyczących diagnostyki i terapii raka piersi. Do przygotowania pracy posłużyły dane pochodzące z baz danych Scopus, Science Direct i Pubmed. Zakres poruszanych zagadnień dotyczących raka piersi jest szeroki od biologii molekularnej do aspektów psychologicznych.

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet. Leczenie interdyscyplinarne rozpoczyna się na potwierdzeniu histologicznym typu guza. Po resekcji guza i strategiach leczenia (neo-) adiuwantowego, rekonstrukcja piersi stanowi ostatni krok w indywidualnym interdyscyplinarnym planie leczenia. W ostatnich latach badania wykazały, że szlak sygnałowy transformującego czynnika wzrostu β (TGF β) odgrywa ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego, różnicowaniu, syntezie macierzy zewnątrzkomórkowej i odpowiedzi immunologicznej. Opracowano kilka inhibitorów z nadzieją na dostarczenie skuteczniejszej identyfikacji nowych markerów nowotworowych do powstrzymywania i leczenia guzów [1]. Przerzuty są główną przyczyną wielu zgonów związanych z rakiem. Przedstawienie środowiska procesu przerzutów *in vitro*, system mikroprzepływowy dostarcza użytecznych informacji na temat mechanizmów leżących u podstaw migracji komórek rakowych, inwazji, kolonizacji i pozyskiwania dodatkowych składników odżywczych. Jednak obecne modele badania przerzutów *in vitro* są nieobiektywne w badaniu szlaków w naczyniach krwionośnych, a zatem wiedza na temat przerzutów limfatycznych jest ograniczona, co jest również ściśle związane z układem zapalnym [2]. Ze względu na powiązanie z wieloma dalszymi celami potrzebne są nowe cząsteczki leków ukierunkowane na sygnalizację raka. [3]. Tysiąc spokrewnionych genów wyodrębniono za pomocą analizy transkryptomu, a główne szlaki sygnałowe związane z rakiem piersi zidentyfikowano za pomocą analizy nadreprezentacji [4]. Obecne modele zatorów nowotworowych wykorzystują nieograniczone wielokomórkowe sferoidy nowotworowe, które zaniedbują tę mechaniczną wzajemną zależność [5]. Pandemia COVID-19 wpłynęła na systemy opieki zdrowotnej na całym świecie, prowadząc do reorganizacji działalności medycznej. Ostatnio znacząco wzrosło wykorzystanie telemedycyny [6]. Rozwijają się różne drogi poszukiwania leku działającego hamująco na komórki nowotworowe raka piersi. Przykładowo, bioaktywne związki z wodorostów wykazały działanie przeciwnowotworowe w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Efekty cytotoksyczne i antyproliferacyjne w monowarstwie nie zostały zaobserwowane w 3D, co potwierdza, że komórki w hodowli 3D są bardziej odporne

¹ Kliniczny Szpital Wojewódzki im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie, Rzeszów.

² Zakład Fotomedycyny i Chemii Fizycznej, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski, Uniwersytet Rzeszowski.

³ Zakład Biochemii i Chemii Ogólnej, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Uniwersytet Rzeszowski.

na leczenie, dlatego wzmacnia się stosowanie bardziej złożonych modeli do badań przesiewowych leków i podejścia wielopoziomowego, które powinno obejmować analizę histologiczną i analizę immunohistochemiczną [7]. Dalsze badania ujawniają mechanizm ich działania, polegający na blokowaniu depolimeryzacji mikrotubul oraz zatrzymywaniu cyklu komórkowego [8, 9, 10]. Obecnie, opracowano wytyczne, które zostały zainspirowane, dostosowane i zmodyfikowane z uwzględnieniem potrzeb naszego systemu opieki zdrowotnej [11]. Zidentyfikowano szereg barier w rozmowie z pacjentami z zaawansowanym rakiem i ich rodzinami [12].

2. Wielokierunkowość diagnostyki raka piersi

Dla pacjentek z rakiem piersi we wczesnym stadium wybór metody operacyjnej po rozpoznaniu jest zawsze dylematem. Potrójnie ujemny rak piersi jest obecnie dobrze scharakteryzowany szczególnie ze strony agresywności w postaci przerzutów i złych rokowań dotyczących przeżycia. Potrójnie ujemny rak piersi stanowi jedną czwartą przypadków raka piersi. Przeprowadzono wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe profilowanie 40 aminokwasów i pochodnych na trzech liniach komórkowych i ich pożywkach hodowlanych, stosując HILIC-MS/MS [13]. W odpowiedzi na zapotrzebowanie na niezawodne modele komórkowe, które odzwierciedlają złożone właściwości mikro środowiska guza i umożliwiają bardziej precyzyjne badanie działania leków przeciwnowotworowych na ludzi, platforma wspólnej hodowli dla modelu *in vitro*, który poprawia fizjologię raka piersi [14-16]. Nowotworowe komórki macierzyste to niezróżnicowane komórki powodujące powstawanie nowotworów i oporność na chemioterapię [17]. Metody badań przesiewowych i diagnostyki pozwalają pracownikom służby zdrowia na zapewnienie spersonalizowanych metod leczenia, które poprawiają wyniki i przeżywalność. Naukowcy i lekarze współpracują ze sobą, aby opracować oparte na dowodach wytyczne i sprzęt do wcześniejszego wykrywania raka [18]. Rak piersi jest problemem zdrowotnym na całym świecie. Pomoce decyzyjne przeznaczone do użytku przez pacjentów to narzędzia, które mogą pomóc w podjęciu decyzji chirurgicznej u tych pacjentów [19]. Ponadto kwercecytyna indukuje apoptozę komórek raka piersi. Zarówno badania *in silico*, jak i *in vitro* podkreślają znaczenie kwercecytyny w rozwoju elektrod przeciwnowotworowych pod względem inhibitorów [20]. Ryzyko raka piersi wzrasta wraz z wiekiem [21-24]. Integracyjna interwencja onkologiczna okazała się skuteczna w zmniejszaniu bezsenności i poprawie jakości snu u kobiet leczonych z powodu siatkówki, ze średnimi i dużymi efektami, które utrzymują się po zakończeniu porodu interwencyjnego. Biorąc pod uwagę zmienność komponentów badanych, przyszłe badania powinny zbadać optymalną integrację w leczeniu bezsenności podczas raka piersi [25]. Przeprowadziliśmy retrospektywną analizę pacjentów z zaawansowanym rakiem piersi, które przeszły sekwencjonowanie panelowe w celu zasugerowania leków pokrewnych. Stosując metodę sekwencjonowania panelu o wysokiej przepustowości w celu identyfikacji wykonalnych mutacji u pacjentów z przerzutowym rakiem piersi, zidentyfikowaliśmy potencjalne opcje leczenia związane z celami u dużej części naszych pacjentów, z których niektóre nie byłyby brane pod uwagę bez tych danych. Potrzebne są prospektywne badania kliniczne związków ukierunkowanych na zidentyfikowane mutacje nadające się do działania, aby określić, które terapie mogą rzeczywiście poprawić przeżycie lub jakość życia poprzez ograniczenie ekspozycji na nieskuteczne leki w zaawansowanym raku piersi [26]. Potrójnie ujemny rak piersi jest podgrupą raka

piersi o wzmocnionej odporności, która niedawno wykazała kliniczną odpowiedź na skojarzoną immunoterapię. Jednak brak ukierunkowanych interwencji przeciwko receptorom hormonów lub HER2 nadal ogranicza możliwości leczenia tych pacjentów. Aby rozpocząć rozszerzanie dostępnych interwencji dla pacjentów z przerzutowym TNBC, wcześniej opisaliśmy schemat szczepionek terapeutycznych, który znacząco zmniejszył spontaniczne przerzuty do płuc w przedklinicznym modelu potrójnie ujemnego raka piersi [27]. Większość zgonów związanych z rakiem piersi u kobiet związane było z obecnością receptorów estrogenowych (ER +). Występują one z powodu przerzutów opornych na terapię. Istnieje krytyczna potrzeba nowatorskich podejść terapeutycznych, aby osiągnąć regresję guza i/lub utrzymać reakcję na terapię w przerzutowych guzach ER + [28]. Czułe na promieniowanie rentgenowskie nanonośniki do dostarczania leków przeciwnowotworowych okazały się bardzo obiecujące w zwiększaniu skuteczności chemioradioterapii [29-33]. Odkrycia te wskazują na duży potencjał hybrydyzacji artemizyniny i estrogenów w celu dalszej poprawy ich działania przeciwnowotworowego i wywoływania efektów synergicznych między połączonymi farmakoforami [34]. Przy takim ustawieniu sztuczna inteligencja może potencjalnie być interesującym narzędziem w ocenie perforatorów i perfuzji przed, około- i pooperacyjnej z DIRT [35]. Kinaza sfingozyny 1 (SphK1) jest onkogeną kinazą lipidową, która katalizuje tworzenie sfingozyny-1-fosforanu poprzez fosforylację sfingozyny i wiadomo, że odgrywa kluczową rolę w angiogenezie, transporcie limfocytów, szlakach transdukcji sygnału i odpowiedzi na bodźce apoptotyczne [36]. Wielodyscyplinarne podejście do leczenia raka piersi może skrócić czas od diagnozy do pierwszego leczenia [37]. Wczesne wykrycie raka piersi umożliwia zastosowanie mniej agresywnego leczenia i zwiększa szanse przeżycie pacjentki [38].

3. Mechanizmy

Komórki macierzyste raka piersi są odpowiedzialne za chemooporność i nawroty nowotworu. Celowanie w CSC przy użyciu naturalnych związków jest nowatorskim podejściem do leczenia raka. Wyniki pokazują, że tangeretyna hamuje szlak sygnałowy Stat3 i indukuje śmierć CSC, co wskazuje, że tangeretyna może być potencjalnym naturalnym związkiem, który celuje w komórki raka piersi i CSC [39]. Jedno z obecnych badań *in vitro* informuje o ocenie bakteriobójczej i cytotoksyczności bioenzymatycznie formułowanego nanozłota (AuNP) przy użyciu fizjologicznie istotnego enzymu β -galaktozydazy. AuNP wykazały doskonałą skuteczność przeciwko tym liniom komórkowym i przyszłe perspektywy wykorzystania jako potencjalne nanoleki i nośniki leków [40]. Aby sprawdzić, czy w kontekście pandemii COVID-19 należy spodziewać się zmiany wskazań do radioterapii, przeszukano bazę danych Pubmed pod kątem zaleceń multidyscyplinarnych lub chirurgów dotyczących roli radioterapii w zmodyfikowanych koncepcjach leczenia [41, 42]. Odkrycia podkreślają rolę wariacji pomiarów w ocenie zaburzeń zdrowia psychicznego u kobiet z rakiem piersi w ogóle, a w szczególności wśród mniejszości etnicznych i rasowych [43]. Analiza parametrów termodynamicznych tworzenia kompleksu CDK6-EA sugeruje proces napędzany oddziaływaniem hydrofobowym. Podsumowując, badanie to ustanawia EA jako silny inhibitor CDK6, który można dalej oceniać w ukierunkowanych terapiach przeciwnowotworowych CDK6 [44]. Niedostatecznie rozwinięte społeczności na wszystkich poziomach ekonomicznych wymagają skutecznych strategii wykorzystania ograniczo-

nych zasobów, aby zapewnić dostęp do terminowej, skutecznej i niedrogiej opieki zdrowotnej. Potrzebne są systematycznie strategiczne podejścia przekładające wytyczne na praktykę w celu zbudowania zdolności systemu opieki zdrowotnej do sprostania obecnemu i przewidywanemu globalnemu obciążeniu rakiem piersi [45]. Nowatorska sonda bliskiej podczerwieni (NIR) DATC zbudowana z barwnika NIR (Cy5) jako jednostki sygnałowej, kationowego trifenylofosfoniowego (TPP) do celowania w mitochondria oraz grupy reaktywnej z kwasem sulfenowym (1,3-cykloheksanodion) do wiązania mitochondriów racjonalnie zaprojektowane i zsyntetyzowane. Sonda ta wykazywała dobrą zdolność do namierzania mitochondriów i może działać jako obiecująca sonda fluorescencyjna do specyficznej wizualizacji endogennych białek kwasów sulfenowych ulegających ekspresji w mitochondriach. [46]. Interwencja wdraża trzy strategie oparte na dowodach: usługi nawigacji dla pacjentów, wspólny rejestr pacjentów do użytku w akademickich ośrodkach medycznych oraz społeczną platformę zdrowotną opartą na sieci Web w celu zidentyfikowania i wyeliminowania barier w opiece.

4. Wyniki kliniczne i multidyscyplinarność

Podstawowe wyniki kliniczne obejmują czas do pierwszego leczenia i otrzymanie leczenia zgodnego z wytycznymi, które są rejestrowane w postaci elektronicznej dokumentacji medycznej [47]. Leczenie pacjentek z rakiem piersi jest wielodyscyplinarne; nie jest jednak jasne, czy programy rezydencji chirurgicznych zapewniają wystarczające szkolenie w zakresie opieki multidyscyplinarnej. Poczucie własnej skuteczności jest jednym ze sposobów pomiaru adekwatności treningu [48]. Paklitaksel jest cytotoksyczną chemioterapią powszechnie stosowaną u pacjentów z potrójnie ujemnym rakiem piersi; jednakże oporność na paklitaksel jest przyczyną słabej odpowiedzi u pacjentów [49]. W większości przypadków autologiczną rekonstrukcję piersi wykonywano jako wtórny zabieg rekonstrukcyjny po mastektomii i radioterapii [50]. Wielodyscyplinarne podejście zespołowe jest stosowane na arenie międzynarodowej od dziesięcioleci jako próba systematycznego podejmowania wspólnych decyzji i koncentrowania doświadczeń klinicznych z wielu specjalizacji na przypadkach jednego pacjenta. Nasz przegląd podsumowuje niektóre z najbardziej istotnych badań na temat stosowania i skuteczności MDT w leczeniu raka piersi, próbując połączyć jego zalety i wyzwania. Oczekuje się, że niniejszy przegląd wniesie wkład do aktualnej międzynarodowej literatury dotyczącej multidyscyplinarnych podejść w leczeniu raka piersi [51]. Skupiamy się w naszej analizie na zmianach wywołanych przez autorów metylacji DNA, globalnej metylacji DNA i specyficznej metylacji DNA. Aby zapewnić kontekst, poprzedzamy tę dyskusję przeglądem dostępnych dowodów na związek między zapadalnością na BC a spożyciem tłuszczu w diecie i otyłością. Zamieszczamy również przegląd dobrze zweryfikowanych biomarkerów raka piersi związanych z metylacją dinukleotydów cytozyny i guaniny oraz ich wpływu na ryzyko raka piersi, rokowanie, charakterystykę guza i odpowiedź na leczenie [52]. W leczeniu raka piersi we wczesnym stadium za pomocą radioterapii wykorzystuje się symulację tomografii komputerowej w celu zidentyfikowania po operacji oszczędzającej piersi jako wskaźnika zastępczego dla łożyska guza. Badania te dostarczyły dalszych dowodów wspierających RT w przyjmowaniu dodatkowych obowiązków związanych z kształtowaniem ciała w planowaniu radioterapii u chorych na raka piersi we wczesnym stadium [53, 54]. Komórki macierzyste raka piersi są komórkami inicjującymi nowotwór, które mają zdolność do

samoodnawiania [55-57]. Zainteresowanie ksantonami znacznie rośnie ze względu na ich szerokie spektrum biologicznych aktywności. 1,3-dihydroksy-2-metyloksanton (DHMXAN), który wykazał znaczący wpływ hamujący na wzrost komórek nowotworowych MCF-7. Formułacje nanosfery i nanokapsulek obciążonych DHMXAN przygotowano techniką wypierania rozpuszczalnika w celu poprawy dostarczania tego słabo rozpuszczalnego w wodzie związku [58]. Ten przegląd zakresowy bada, w jaki sposób naukowcy z różnych dziedzin rozumieją i omawiają środowisko zbudowane w pierwotnej i wtórnej profilaktyce raka. Ekspansja interdyscyplinarnych prac w tej dziedzinie posłużyłaby do wywarcia znaczącego wpływu na zdrowie populacji [59]. Wytyczne praktyki klinicznej zalecają multidyscyplinarne podejście do leczenia raka, które łączy wszystkie odpowiednie dyscypliny w celu omówienia optymalnego leczenia choroby. Jednak literatura charakteryzuje się niejednorodnymi definicjami i kilkoma przeglądami na temat procesów i wyników opieki multidyscyplinarnej. Niejednorodność literatury przedmiotu, w tym badanych populacji pacjentów, uzasadnia dalsze uszczegółowienie praktyki opieki multidyscyplinarnej oraz systematyczne przeglądy procesów lub kontekstów, które sprawiają, że wdrażanie i prowadzenie opieki multidyscyplinarnej jest skuteczne [60-62]. Kobiety z przerzutowym rakiem piersi doświadczają unikalnego leczenia objawów i potrzeb psychospołecznych z powodu agresywnego, ale paliatywnego leczenia postępującej, przewlekłej choroby. Celowa, prowadzona przez pielęgniarkę ocena potrzeb w zakresie opieki społecznej i opieki paliatywnej zwiększa liczbę skierowań wraz z poprawą wyników zgłaszanych przez pacjentów [63].

5. Podsumowanie

Analiza prac prowadzi do wniosku, że konieczne jest podejście multidyscyplinarne, z omówieniem potencjalnych zagrożeń i korzyści terapii raka piersi. Rak piersi ze względu na krótki czas rozwoju staje się coraz częstszą przyczyną śmierci u kobiet w różnym wieku. Wczesna diagnostyka wymaga zaawansowanego sprzętu i doświadczenia klinicznego. Skomplikowany mechanizm raka piersi wymaga nowoczesnych interdyscyplinarnych terapii. Pojawienie się i wzrost nowotworów złośliwych jest skomplikowanym procesem regulowanym przez wiele genów. Rak piersi jest najczęstszą chorobą złośliwą u kobiet na całym świecie, a wynik chemioterapii jest ograniczony przez oporność wielolekową.

Literatura

1. Wang J., Xiang H., Lu Y., Wu T., *Role and clinical significance of TGF- β 1 and TGF- β R1 in malignant tumors (Review)*, Int J Mol Med.,47(4), 2021, s. 1.
2. Cho H.Y., Choi J.H., Kim K.J., Shin M., Choi J.W., *Microfluidic System to Analyze the Effects of Interleukin 6 on Lymphatic Breast Cancer Metastasis*, Front Bioeng Biotechnol., 15(8), 2021, s. 611802.
3. Roy S., Khan S., Jairajpuri D.S., Hussain A., Alajmi M.F., Islam A., Luqman S., Parvez S., Hassan M.I., *Investigation of sphingosine kinase 1 inhibitory potential of cinchonine and colcemid targeting anticancer therapy*, J Biomol Struct Dyn., 10(2), 2021, s. 1-13.
4. Jeong J.H., Yun J.W., Kim H.Y., Heo C.Y., Lee S., *Elucidation of Novel Therapeutic Targets for Breast Cancer with *ESR1-CCDC170* Fusion*, J Clin Med., 4(2), 2021, s. 582.

5. Kulwatno J., Gearhart J., Gong X., Herzog N., Getzin M., Skobe M., Mills K.L., *Growth of tumor emboli within a vessel model reveals dependence on the magnitude of mechanical constraint*. Integr Biol (Camb), 3(2), 2021, 13(1), s. 1-16.
6. Onesti C.E., Tagliamento M., Curigliano G., Harbeck N., Bartsch R., Wildiers H., Tjan-Heijnen V., Martin M., Rottey S., Generali D., Campone M., Cristofanilli M., Pusztai L., Peeters M., Berchem G., Cortes J., Ruhstaller T., Ciruelos E., Rugo H.S., Jerusalem G., *Expected Medium- and Long-Term Impact of the COVID-19 Outbreak in Oncology*, JCO Glob Oncol., 7(2). 2021, s. 162-172.
7. Malhão F., Ramos A.A., Macedo A.C., Rocha E., *Cytotoxicity of Seaweed Compounds, Alone or Combined to Reference Drugs, against Breast Cell Lines Cultured in 2D and 3D*, Toxics, 31(1), 2021, 9(2), s. 24.
8. Li X., Li J., Xu J., Chen K., Zhang Z., Duan J., Luo Q., Du Y., Chen S., Xie Y, Lu W., *Nanostructure of Functional Larotaxel Liposomes Decorated with Guanine-Rich Quadruplex Nucleotide-Lipid Derivative for Treatment of Resistant Breast Cancer*. Small., 31(1), 2021, s. 2007391.
9. Virgilio E., Vecchio D., Vercellino M., Naldi P., Tesser F., Cantello R., Cavalla P., Comi C., *Paraneoplastic neuromyelitis optica spectrum disorders: a case series*, Neurol Sci., 28(1), 2021, s. 1-4.
10. Gasparri M.L., Poortmans P., Banys-Paluchowski M., Bonci E.A., Di Micco R., Condorelli R., Matrai Z., Dubsy P., Gentilini O.D., Kuehn T., *What we learned in axillary management of breast cancer patients at the American society of clinical oncology (ASCO) 2020 virtual meeting? The EUBREAST point of view*, EClinicalMedicine, 14(1), 2021, 31:100708.
11. Sattar A.K., Shahzad H., Jabbar A.A., ValiMohammed A.T., Khan S., Vellani Y., Idrees R., Ali N., Masroor I., Saeed H., Lakhani G., Ayoub N., Waqar A., Zia-U.I., Islam M., Kirmani S., Latif A., Enam S.A., *A multidisciplinary approach to triage patients with breast disease during the COVID-19 pandemic: Experience from a tertiary care center in the developing world*, Cancer Rep (Hoboken), 4(1), 2021, s. e1309.
12. Kimura Y., Hosoya M., Toju K., Shimizu C., Morita T., *Barriers to end-of-life discussion with advanced cancer patient as perceived by oncologists, certified/specialized nurses in cancer nursing and medical social workers*, Jpn J Clin Oncol., 50(12), 2020, s. 1426-1433.
13. Kou F., Zhu B., Zhou W., Lv C., Cheng Y., Wei H., *Targeted metabolomics reveals dynamic portrayal of amino acids and derivatives in triple-negative breast cancer cells and culture media*, Mol Omics., 17(1), 2021, s. 142-152.
14. Shafran Y., Deutsch M., Afrimzon E., Ravid-Hermesh O., Sobolev M., Bar-On-Eizig Z., Shainberg A., Zurgil N., *Co-culture hydrogel micro-chamber array-based plate for anti-tumor drug development at single-element resolution*, Toxicol In Vitro, 71, 2021, s. 105067.
15. Tometich D.B., Hyland K.A., Soliman H., Jim H.S.L., Oswald L., *Living with Metastatic Cancer: A Roadmap for Future Research*, Cancers (Basel), 12(12), 2020, s. 3684.
16. Cserni G., Francz M., Járay B., Kálmán E., Kovács I., Krenács T., Tóth E., Udvarhelyi N., Vass L., Vörös A., Kulka J., *Az emlőrák patológiai diagnosztikája, feldolgozása és kórszövettani leletezése. Szakmai útmutatás a IV. Emlőrák Konszenzus Konferencia alapján [Pathological diagnosis, work-up and reporting of breast cancer. Recommendations from the 4th Breast Cancer Consensus Conference]*, Magyar Onkol., 64(4), 2020, s. 301-328.
17. Choi H.S., Kim S.L., Kim J.H., Ko Y.C., Lee D.S., *Plant Volatile, Phenylacetaldehyde Targets Breast Cancer Stem Cell by Induction of ROS and Regulation of Stat3 Signal*, Antioxidants (Basel), 9(11), 2020, s. 1119.
18. Barba D., León-Sosa A., Lugo P., Suquillo D., Torres F., Surre F., Trojman L., Caicedo A., *Breast cancer, screening and diagnostic tools: All you need to know*, Crit Rev Oncol Hematol., 157, 2021, s. 103174.

19. Si J., Guo R., Lu X., Han C., Xue L., Xing D., Chen C., *Decision aids on breast conserving surgery for early stage breast cancer patients: a systematic review*, BMC Med Inform Decis Mak., 20(1), 2020, s. 275.
20. Yousuf M., Khan P., Shamsi A., Shahbaaz M., Hasan G.M., Haque Q.M.R., Christoffels A., Islam A., Hassan M.I., *Inhibiting CDK6 Activity by Quercetin Is an Attractive Strategy for Cancer Therapy*, ACS Omega, 5(42), 2020, s. 27480-27491.
21. Di Lascio S., Tognazzo E., Bigiotti S., Bonollo M., Costa A., Pagani O., Meani F., *Breast cancer in the oldest old (≥ 89 years): Tumor characteristics, treatment choices, clinical outcomes and literature review*, Eur J Surg Oncol., S0748-7983(20), 2020, s. 30840-4.
22. Zetzl T., Renner A., Pittig A., Jentschke E., Roch C., van Oorschot B., *Yoga effectively reduces fatigue and symptoms of depression in patients with different types of cancer*, Support Care Cancer, 2020, s. 1-10.
23. Rojko L., Megyesfalvi Z., Czibula E., Reiniger L., Teglassi V., Szegedi Z., Szallasi Z., Dome B., Moldvay J., *Longitudinal analysis of complete blood count parameters in advanced-stage lung cancer patients*, Thorac Cancer, 11(11), 2020, s. 3193-3204.
24. Pacholczak-Madej R., Bazan-Socha S., Zaręba L., Undas A., Dropiński J., *Direct oral anticoagulants in the prevention of stroke in breast cancer patients with atrial fibrillation during adjuvant endocrine therapy: A cohort study*, Int J Cardiol., 324, 2021, s. 78-83.
25. Ma Y., Hall D.L., Ngo L.H., Liu Q., Bain P.A., Yeh G.Y., *Efficacy of cognitive behavioral therapy for insomnia in breast cancer: A meta-analysis*, Sleep Med Rev., 55, 2021, s. 101376.
26. Walter C., Hartkopf A., Koch A., Klaumünzer M., Schulze M., Grischke E.M., Taran F.A., Brucker S., Battke F., Biskup S., *Sequencing for an interdisciplinary molecular tumor board in patients with advanced breast cancer: experiences from a case series*, Oncotarget., 11(35), 2020, s. 3279-3285.
27. Gross B.P., Chitphet K., Wongrakpanich A., Wafa E.I., Norian L.A., Salem A.K., *Biotinylated Streptavidin Surface Coating Improves the Efficacy of a PLGA Microparticle-Based Cancer Vaccine*, Bioconjug Chem., 31(9), 2020, s. 2147-2157.
28. Cotul E.K., Zuo Q., Santaliz-Casiano A., Imir O.B., Mogol A.N., Tunc E., Duong K., Lee J.K., Ramesh R., Odukoya E., Kesavadas M.P., Ziogaite M., Smith B.P., Mao C., Shapiro D.J., Park B.H., Katzenellenbogen B.S., Daly D., Aranda E., O'Neill J.D., Walker C., Landesman Y., Madak-Erdogan Z., *Combined Targeting of Estrogen Receptor Alpha and Exportin 1 in Metastatic Breast Cancers*, Cancers (Basel), 12(9), 2020, s. 2397.
29. Zhang L., Zhang S., Xu J., Li Y., He J., Yang Y., Huynh T., Ni P., Duan G., Yang Z., Zhou R., *Low-Dose X-ray-Responsive Diselenide Nanocarriers for Effective Delivery of Anticancer Agents*. ACS Appl Mater Interfaces, 12(39), 2020, s. 43398-43407.
30. Zhao X., Zhang Y., Ma X., Chen Y., Xi J., Yin X., Kang H., Guan H., Dai Z., Liu D., Zhao F., Sun C., Li Z., Zhang S., *Concordance between treatment recommendations provided by IBM Watson for Oncology and a multidisciplinary tumor board for breast cancer in China*, Jpn J Clin Oncol., 50(8), 2020, s. 852-858.
31. Weber W.P., Morrow M., Boniface J., Pusic A., Montagna G., Kappos E.A., Ritter M., Haug M., Kurzeder C., Saccilotto R., Schulz A., Benson J., Fitzal F., Matrai Z., Shaw J., Peeters M.V., Potter S., Heil J., *Oncoplastic Breast Consortium. Knowledge gaps in oncoplastic breast surgery*, Lancet Oncol., 21(8), 2020, s. e375-e385.
32. Kaidar-Person O., Kühn T., Poortmans P., *Should we worry about residual disease after mastectomy?*, Lancet Oncol., 21(8), 2020, s. 1011-1013.
33. Oei S.L., Thronicke A., Matthes H., Schad F., *Evaluation of the effects of integrative non-pharmacological interventions on the internal coherence and resilience of breast cancer patients*, Support Care Cancer, 29(3), 2021, s. 1413-1421.
34. Hendriks M.P., Verbeek X.A.A.M., van Manen J.G., van der Heijden S.E., Go S.H.L., Gooiker G.A., van Vegchel T., Siesling S., Jager A., *Clinical decision trees support*

- systematic evaluation of multidisciplinary team recommendations*, Breast Cancer Res Treat., 183(2), 2020, s. 355-363.
35. Fröhlich T., Mai C., Bogautdinov R.P., Morozkina S.N., Shavva A.G., Friedrich O., Gilbert D.F., Tsogoeva S.B., *Synthesis of Tamoxifen-Artemisinin and Estrogen-Artemisinin Hybrids Highly Potent Against Breast and Prostate Cancer*, ChemMedChem., 15(15), 2020, s. 1473-1479.
 36. Thiessen F.E.F., Tondou T., Verhoeven V., Hubens G., Steenackers G., Tjalma W.A.A., *Automatic detection of perforators for microsurgical reconstruction*, Breast, 53, 2020, s. 43.
 37. Jairajpuri D.S., Mohammad T., Adhikari K., Gupta P., Hasan G.M., Alajmi M.F., Rehman M.T., Hussain A., Hassan M.I., *Identification of Sphingosine Kinase-1 Inhibitors from Bioactive Natural Products Targeting Cancer Therapy*, ACS Omega, 5(24), 2020, s. 14720-14729.
 38. Akhtar Z., Stearns V., Cartwright P., Blackford A.L., Prasath V., Klein C., Jelovac D., Asrari F., Habibi M., *The effect of 1-day multidisciplinary clinic on breast cancer treatment*, Breast Cancer Res Treat., 182(3), 2020, s. 623-629.
 39. Assad D.X., Mascarenhas E.C.P., Normando A.G.C., Chardin H., Barra G.B., Pratesi R., Nóbrega Y.K.M., Acevedo A.C., Guerra E.N.S., *Correlation between salivary and serum CA15-3 concentrations in patients with breast cancer*, Mol Clin Oncol., 13(2), 2020, s. 155-161.
 40. Ko Y.C., Choi H.S., Liu R., Kim J.H., Kim S.L., Yun B.S., Lee D.S., *Inhibitory Effects of Tangeretin, A Citrus Peel-Derived Flavonoid, on Breast Cancer Stem Cell Formation through Suppression of Stat3 Signaling*, Molecules, 25(11), 2020, s. 2599.
 41. Ahmed F., Faisal S.M., Ahmed A., Husain Q., *Beta galactosidase mediated bio-enzymatically synthesized nano-gold with aggrandized cytotoxic potential against pathogenic bacteria and cancer cells*, J Photochem Photobiol B., 209, 2020, s. 111923.
 42. Vordermark D., *Shift in indications for radiotherapy during the COVID-19 pandemic? A review of organ-specific cancer management recommendations from multidisciplinary and surgical expert groups*, Radiat Oncol., 15(1), 2020, s. 140.
 43. Gasparri M.L., Gentilini O.D., Lueftner D., Kuehn T., Kaidar-Person O., Poortmans P., *Changes in breast cancer management during the Corona Virus Disease 19 pandemic: An international survey of the European Breast Cancer Research Association of Surgical Trialists (EUBREAST)*, Breast, 52, 2020, s. 110-115.
 44. Nakash O., Granek L., Cohen M., Bar-Sela G., Geffen D., Ben David M., *Does Assessment Method Matter in Detecting Mental Health Distress among Ashkenazi and Mizrahi Israeli Women with Breast Cancer?*, Health Soc Work., 45(2), 2020, s. 101-109.
 45. Yousuf M., Shamsi A., Khan P., Shahbaaz M., Alajmi M.F., Hussain A., Hassan G.M., Islam A., Rizwanul Haque Q.M., Hassan M.I., *Ellagic Acid Controls Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells via Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 6*, Int J Mol Sci., 21(10), 2020, s. 3526.
 46. Duggan C., Dvaladze A., Rositch A.F., Ginsburg O., Yip C.H., Horton S., Camacho-Rodriguez R., Eniu A., Mutebi M., Bourque J.M., Masood S., Unger-Saldaña K., Cabanes A., Carlson R.W., Gralow J.R., Anderson B.O., *The Breast Health Global Initiative 2018 Global Summit on Improving Breast Healthcare Through Resource-Stratified Phased Implementation: Methods and overview*, Cancer, 126(10), 2020, s. 2339-2352.
 47. Gao Y., Sun R., Zhao M., Ding J., Wang A., Ye S., Zhang Y., Mao Q., Xie W., Ma G., Shi H., *Sulfenic Acid-Mediated on-Site-Specific Immobilization of Mitochondrial-Targeted NIR Fluorescent Probe for Prolonged Tumor Imaging*, Anal Chem., 92(10), 2020, s. 6977-6983.
 48. Battaglia T.A., Freund K.M., Haas J.S., Casanova N., Bak S., Cabral H., Freedman R.A., White K.B., Lemon S.C., *TRIP Consortium. Translating research into practice: Protocol for a community-engaged, stepped wedge randomized trial to reduce disparities in breast*

- cancer treatment through a regional patient navigation collaborative*, Contemp Clin Trials, 93, 2020, s. 106007.
49. Kaidar-Person O., Poortmans P., Offersen B.V., Boersma L.J., de Ruyscher D., Noy V., Hermann N., Kühn T., *What are the guidelines for immediate breast reconstruction?*, Eur J Surg Oncol., S0748-7983(20), 2020, s. 30393-0.
 50. Park K.U., Selby L., Chen X.P., Cochran A., Harzman A., Shen C., Gregory M.E., *Development of Residents' Self-Efficacy in Multidisciplinary Management of Breast Cancer Survey*, J Surg Res., 251, 2020, s. 275-280.
 51. Hur S., Kim J.H., Yun J., Ju Y.W., Han J.M., Heo W., Kim K., Jeong K., Lee H.B., Han W., Noh D.Y., Kim J.I., Moon H.G., *Protein Phosphatase 1H, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27, and Cyclin-Dependent Kinase 2 in Paclitaxel Resistance for Triple Negative Breast Cancers*, J Breast Cancer, 23(2), 2020, s. 162-170.
 52. Steiner D., Horch R.E., Ludolph I., Schmitz M., Beier J.P., Arkudas A., *Interdisciplinary Treatment of Breast Cancer After Mastectomy With Autologous Breast Reconstruction Using Abdominal Free Flaps in a University Teaching Hospital-A Standardized and Safe Procedure*, Front Oncol., 23, 2020, s. 177.
 53. Blackwood O., Deb R., *Multidisciplinary team approach in breast cancer care: Benefits and challenges*, Indian J Pathol Microbiol., 63, 2020, s. 105-S112.
 54. Donovan M.G., Wren S.N., Cenker M., Selmin O.I., Romagnolo D.F., *Dietary fat and obesity as modulators of breast cancer risk: Focus on DNA methylation*, Br J Pharmacol., 177(6), 2020, s. 1331-1350.
 55. Oultram S., Dempsey S., Greer P., Clapham M., *Comparing Breast Conservation Surgery Seromas Contoured by Radiation Therapists versus those Contoured by a Radiation Oncologist in Radiation Therapy Planning for Early-Stage Breast Cancer*, J Med Imaging Radiat Sci., 51(1), 2020, s. 108-116.
 56. Lüftner D., Bauerfeind I., Braun M., Brucker S.Y., Fasching P.A., Felberbaum R., Hagemann F., Haidinger R., Harbeck N., Höning A., Huober J., Jackisch C., Kolberg H.C., Kolberg-Liedtke C., Kühn T., Maass N., Reimer T., Schneeweiss A., Schumacher-Wulf E., Schütz F., Thomssen C., Untch M., Wuerstlein R., Thill M., *Treatment of Early Breast Cancer Patients: Evidence, Controversies, Consensus: Focusing on Systemic Therapy - German Experts' Opinions for the 16th International St. Gallen Consensus Conference (Vienna 2019)*, Breast Care (Basel), 14(5), 2019, s. 315-324.
 57. Choi H.S., Kim J.H., Kim S.L., Lee D.S., *Disruption of the NF- κ B/IL-8 Signaling Axis by Sulconazole Inhibits Human Breast Cancer Stem Cell Formation*, Cells, 8(9), 2019, s. 1007.
 58. Jin J., Qiu S., Wang P., Liang X., Huang F., Wu H., Zhang B., Zhang W., Tian X., Xu R., Shi H., Wu X., *Cardamonin inhibits breast cancer growth by repressing HIF-1 α -dependent metabolic reprogramming*, J Exp Clin Cancer Res., 38(1), 2019, s. 377.
 59. Thiessen F.E.F., Tondou T., Cloostermans B., Dirx Y.A.L., Auman D., Cox S., Verhoeven V., Hubens G., Steenackers G., Tjalma W.A.A., *Dynamic InfraRed Thermography (DIRT) in DIEP-flap breast reconstruction: A review of the literature*, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol., 242, 2019, s. 47-55.
 60. Teixeira M., Pedro M., Nascimento M.S.J., Pinto M.M.M., Barbosa CM., *Development and characterization of PLGA nanoparticles containing 1,3-dihydroxy-2-methylxanthone with improved antitumor activity on a human breast cancer cell line*, Pharm Dev Technol., 24(9), 2019, s. 1104-1114.
 61. Wray A.J.D., Minaker L.M., *Is cancer prevention influenced by the built environment? A multidisciplinary scoping review*, Cancer, 125(19), 2019, s. 3299-3311.
 62. Shao J., Rodrigues M., Corter A.L., Baxter N.N., *Multidisciplinary care of breast cancer patients: a scoping review of multidisciplinary styles, processes, and outcomes*, Curr Oncol., 26(3), 2019, s. e385-e397.

63. Christian N., Gemignani M.L., *Issues with Fertility in Young Women with Breast Cancer*, Curr Oncol Rep., 21(7), 2019, s. 58.
64. Schmidt M.E., Scherer S., Wiskemann J., Steindorf K., *Return to work after breast cancer: The role of treatment-related side effects and potential impact on quality of life*, Eur J Cancer Care (Engl), 28(4), 2019, s. e13051.
65. Reiser V., Rosenzweig M., Welsh A., Ren D., Usher B., *The Support, Education, and Advocacy (SEA) Program of Care for Women With Metastatic Breast Cancer: A Nurse-Led Palliative Care Demonstration Program*. Am J Hosp Palliat Care., 36(10), 2019, s. 864-870.

Interdyscyplinarne diagnozowanie raka piersi

Streszczenie

Pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w diagnostyce i terapii raka piersi, nadal choroba ta stanowi wyzwanie zarówno dla lekarzy, jak i naukowców. Objawy chorobowe raka piersi zależą od stopnia jego zaawansowania. Od stopnia zaawansowania zależy również rokowanie. Obecnie dysponujemy różnorodnymi metodami obrazowania zmian chorobowych piersi, takimi jak USG, mammografia, rezonans magnetyczny. Metody te wykrywają nowotwór. Rozpoznanie raka możliwe jest dzięki badaniu patomorfologicznemu fragmentów guza. Aby uzyskać tkanki guza, konieczne jest przerwanie ciągłości tkanek, często należy wykonać rozległy zabieg operacyjny. Trudność sprawia obecnie diagnostyka niewielkich zmian oraz zmian wieloogniskowych, które mało odróżniają się od tkanek prawidłowych. Istotne jest wdrożenie metod diagnostycznych jak najmniej inwazyjnych i cechujących się wysoką czułością i swoistością. Jedną z takich metod może być ocena parametrów fizykochemicznych tkanki zdrowej i nowotworowej w oparciu o ocenę czasów relaksacji wody za pomocą rezonansu magnetycznego (MRI). Inną alternatywną metodą może być zastosowanie fotodynamiki dla oszacowania różnic pomiędzy tkanką nowotworową i zdrową, a także różnic pomiędzy tkanką nowotworową przed chemioterapią i po chemioterapii. Różnice będą spowodowane inną zdolnością produkcji tlenu singletowego w tkankach. Metoda fotodynamiczna oraz ocena parametrów fizykochemicznych w MRI mogą być doskonałymi metodami alternatywnymi lub uzupełniającymi w leczeniu i diagnostyce raka piersi w stosunku do diagnostyki obrazowej i patomorfologicznej.

Słowa kluczowe: rak piersi, diagnostyka, terapia

Interdisciplinary diagnosis of breast cancer

Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women. It is also the leading cause of cancer death in women. It is characterized by a high relapse rate. This is mainly due to the incomplete effectiveness of the primary treatment leaving behind a residual disease. Despite the enormous progress made in the diagnosis and treatment of breast cancer, this disease continues to be a call for both doctors and scientists. Breast cancer symptoms depend on its stage. The prognosis depends on the stage of the disease. Currently, we have various methods of imaging breast lesions, such as ultrasound, mammography, and magnetic resonance imaging. These methods detect neoplasm. Cancer diagnosis is possible thanks to the pathomorphological examination of tumor fragments. Tissue disruption is required to obtain tumor tissue, and extensive surgery is often required. Currently, it is difficult to diagnose small lesions and multifocal lesions, which do not differ much from normal tissues. It is important to implement diagnostic methods that are as least invasive as possible and are characterized by high sensitivity and specificity. One of such methods may be the assessment of physicochemical parameters of healthy and cancerous tissue based on the assessment of water relaxation times using magnetic resonance imaging (MRI). Another alternative method could be the use of photodynamic to estimate the differences between cancerous and healthy tissue, as well as differences between cancerous tissue before and after chemotherapy. The differences will be due to the different ability to produce singlet oxygen in the tissues. The photodynamic method and the assessment of physicochemical parameters in MRI may be an excellent alternative or complementary methods in the treatment and diagnosis of breast cancer in relation to imaging and pathomorphological diagnostics.

Keywords: breast cancer, diagnostics, therapy

Profilaktyka zdrowia przeciwdziałająca rozwojowi nowotworów w Polsce

1. Wstęp

Zdrowie dla każdego jest wartością bezcenną. Uwarunkowania genetyczne, czynniki środowiskowe, styl życia, ogólnoswiatowy konsumpcjonizm i związane z nim także chemiczne modyfikacje żywności mogą być powodem szeregu chorób człowieka, także nowotworów. Aby temu przeciwdziałać i wydłużyć życie ludzi potrzebny jest rzetelny ogólnonarodowy program profilaktyki zdrowia finansowany ze składek odkładanych przez podatników. Profilaktyka zdrowia powinna być ukierunkowana na zmiany związane z dietą, promowaniem zdrowego stylu życia poprzez wysiłek fizyczny, a także wykonywaniem przygotowanego dla społeczeństwa programu badań profilaktycznych, które umożliwią monitoring stanu zdrowia obywateli. Należy wprowadzić zmiany, które polepszą stan zdrowia społeczeństwa i wydłużą długość życia człowieka. Potrzeba także zmian, które przywrócą modę na spożycie niemodyfikowanej, naturalnej żywności oraz uświadomią ludziom rolę badań profilaktycznych, diety, a także wysiłku fizycznego w wydłużaniu życia człowieka.

2. Po co nam profilaktyka zdrowia?

Każdy wie, że zdrowie jest ważne dla życia człowieka, ale czy każdy tak samo dba o zdrowie? Czy każdy ma równorzędną wiedzę i świadomość, że trzeba samemu zakupić sobie testy diagnostyczne? Osoba lepiej wykształcona, zwłaszcza w kierunku medycznym lub life science, będzie inwestować w swoje zdrowie, natomiast osoba gorzej wykształcona może wybrać wydanie swojej pensji na co innego i zwykle pójdzie do lekarza wtedy, gdy będzie odczuwać ból. Czasami jednak wtedy pomoc choremu np. w zaawansowanej postaci nowotworu, zwykle mimo wysiłków jest nieefektywna. Ponadto koszt leczenia pacjenta chorego na nowotwór może wzrastać do tysięcy, dziesiątek, czasami nawet setek tysięcy złotych. Najgorsze z tego jest to, że często leczy się wtedy pacjentów, choć ich szanse na wyleczenie są nieznane.

3. Dieta

Jedząc pokarmy dostarczamy składników, z których nasz organizm produkuje energię oraz elementy budulcowe niezbędne do życia człowieka. Ważne jest więc, by nie jeść za dużo bo to prowadzi zwykle do nadwagi, otyłości i może w konsekwencji długoterminowej otyłości prowadzić np. do miażdżycy naczyń oraz innych chorób związanych z zaburzeniami metabolizmu, jak np. cukrzyca typu II.

3.1. Jedz mniejsze porcje

Ważne jest zatem byśmy nie spożywali podczas posiłku więcej kalorii niż potrzebujemy do celów przeżycia, ponieważ ten nadmiar odłoży się jako materiał zapasowy w postaci tkanki tłuszczowej, lub jako glikogen w wątrobie. Jeśli natomiast zjemy

¹malgorzata.rogalinska@biol.uni.lodz.pl, Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki.

mniejszą porcją to organizm nie będzie musiał się napracować by przetworzyć spożyty pokarm. Ponadto, nadmiar zjedzonego pokarmu nie będzie powodem nadwagi, a także unikniemy szeregu chorób związanych z zaburzeniami metabolizmu, czy chorób związanych z układem krążenia.

3.2. Lepiej zjeść mniej niż się odchudzać

Dużo lepiej być świadomym i zjeść mniej niż odchudzać się będąc otyłym. Dlaczego? Zjedzenie mniejszej porcji to wybór i jeśli mamy świadomość że za duża ilość może zaszkodzić, to wybierzemy zjedzenie mniejszej porcji, albo będziemy musieli coś zrobić by nadmiar kalorii przyswojonych spalić.

Przy jedzeniu nadmiernym w szybkim tempie można przytyć, a potem będąc otyłym jest trudno się zmobilizować by zrzucić nadmierną wagę. Dlatego z wielu powodów najlepszym rozwiązaniem jest i tu zapobiegać, czyli jeść mniej. Przy czym trzeba podkreślić, że zwykle każdy wie, że nadmiar pożywienia może prowadzić do otyłości i tylko nie wiadomo dokładnie ile czego jeść by było nie za dużo? Tu z pomocą powinni przyjsc dietetycy, którzy powinni opracować zestawy potraw, które dobrane w coś na podobieństwo książki kucharskiej wskazałyby jakie produkty, ilości produktów i w jakiej kompozycji należy przygotować na śniadania, obiady i kolacje [1]. Takie propozycje powinny powstać np. na cały tydzień i być dodatkowo przygotowane dla ludzi o różnych zapotrzebowaniach energetycznych na energię, czyli dla dzieci w określonym wieku, młodzieży, osób dorosłych pracujących fizycznie, umysłowo, a także osób w wieku podeszłym. Chodzi o to, byśmy nauczyli się jakie proporcje i czego możemy jeść, by zorientować się jak powinien wyglądać posiłek, po to by się nie przejadać. Taka publikacja zawierająca dane jak przygotować posiłek z wykazem składników oraz ilościami produktów potrzebnych na 1 osobę powinna być wskazówką ile powinniśmy jeść oraz jak jeść by zapewnić właściwą podaż potrzebnych składników odżywczych.

Dlaczego lepszym pomysłem jest mniej zjeść, niż się odchudzać?

Jest dużo prościej zjeść, a potem bardzo duży wysiłek i spore samozaparcie i konsekwencję trzeba wykazać, by zrzucić zapasy energii zmagazynowane w tkance tłuszczowej. W ciele człowieka mamy zasady związane z wykorzystaniem energii, a także związane z magazynowaniem nadmiaru ważnej cząsteczki przekaźnikowej łączącej szereg szlaków metabolicznych, czyli acetylo-CoA. Zanim pokłady energii zmagazynowane w tkance tłuszczowej mogą zostać uruchomione do produkcji energii, wykorzystywana jest najpierw energia, gdy np. potrzeba dobiec do tramwaju, związane w mięśniach w fosfagenie. Trzeba natomiast przebiec lub przejechać na rowerze ponad półtora kilometra, by zacząć się odchudzać, czyli zmniejszać ilość pokładów trójglicerydów w tkance tłuszczowej. Jest zatem dużo łatwiej zjeść nadmiar pokarmu, który ulegnie przemianie np. do trójglicerydów, niż trójglicerydy z tkanki tłuszczowej najpierw wydobyć, a potem użyć do produkcji ATP. Zatem zawsze lepiej mniej zjeść, by nie dopuścić do odkładania się tkanki tłuszczowej, niż jeść za dużo i mieć problem ze zdrowiem.

4. Wysiłek fizyczny

Wysiłek fizyczny jest jednym ze sposobów profilaktyki zdrowia, podobnie jak badania profilaktyczne. Dla osób otyłych zrzucenie wagi jest bardzo ważne, co oprócz redukcji wagi, reguluje także szybkość przemian metabolizmu. Wysiłek fizyczny

zwiększa dotlenienie organizmu i polepsza krążenie, dodatkowo stymuluje wydzielanie hormonu szczęścia serotoniny. W celu redukcji wagi dla osób szczególnie otyłych polecić można np. zajęcia na basenie. Waga ciała w wodzie, dzięki sile wyporu jest mniejsza (2 zasada termodynamiki), zatem osoby otyłe mają w wodzie ułatwione poruszanie i dlatego jest większa szansa, że w ten sposób łatwiej będzie im także zredukować masę ciała.

Wszyscy wiedzą, że wysiłek fizyczny jest niezbędny by zachować zdrowie, należy jednak ustalić jak często i jak intensywnie ten wysiłek należy prowadzić by odchudzać się efektywnie. Patrząc na to z perspektywy osoby, która już raz się odchudzała należy stwierdzić, że lepiej zapobiegać niż leczyć, czyli po prostu trzeba ustalić jaką porcję powinno się spożyć i jak często jeść by nie magazynować dużej ilości kalorii. Ponadto, jak się człowiek odchudzi to jeszcze dalej trzeba być konsekwentnym w swoich zmianach (także związanych z wysiłkiem fizycznym), bo można w dość szybkim czasie wpaść w tzw. efekt jojo. Ponieważ wydaje się prostsze ustalenie ilości kalorii potrzebnych do spożycia podczas posiłku, by się nie przejadać, w porównaniu z wielogodzinnym wysiłkiem fizycznym, każdy dojdzie szybko do wniosku, że z wielu powodów zawsze lepiej zapobiegać i mniej zjeść, niż poświęcać czas, wkładać duży wysiłek fizyczny, a czasami także koszty, by się efektywnie odchudzić. Na dodatek, przy niewielkim niedopatrzaniu, waga może znów się powiększać, ponieważ nawet jeśli, zwykle dużym wysiłkiem, obniżymy wagę ciała, to odchudzając się zmniejszamy ilość trójglicerydów w adipocytach, a nie samą ilość komórek w tkance tłuszczowej. Aby usunąć nadmiar adipocytów można wykonać liposukcję, choć po prostu zamiast mieć problem związany z nadwagą najlepiej jest mniej jeść i to zapobiegnie otyłości i konieczności odchudzania się.

4.1. Trzeba jeść rzeczy wartościowe; ważna jest także ilość składników w pokarmie

Wszyscy wiemy, że zdrowe są produkty z pełnego przemiału; czyli lepiej jeść chleb ciemny niż jasny. Natomiast ważne jest także by w pożywieniu dostarczać wszystkie składniki potrzebne do funkcjonowania ciała ludzkiego. Dietetycy mogą podać co proponują by jeść, ale czy człowiek na co dzień bierze pod uwagę wskazówki dietetyków? Jak ma problem i musi, to pewnie tak, ale większość ludzi myśli, że problem związany z żywieniem go nie dotyczy i po jakimś czasie okazuje się u wielu, że może coś trzeba suplementować, szczególnie np. w przypadku dużego wysiłku fizycznego lub bardzo wyczerpanej pracy umysłowej.

Możemy też na co dzień, zupełnie nieświadomie, nie dostarczać w diecie wszystkich niezbędnych składników i to zwykle po jakimś czasie może być powodem zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu człowieka. Dotyczy to przede wszystkim niedoborów w diecie np. egzogennych aminokwasów, które muszą być dostarczone z dietą, ponieważ człowiek nie umie ich sam zsyntetyzować. Generalnie, organizm człowieka może magazynować nadmiar węglowodanów oraz lipidów, natomiast nie może magazynować aminokwasów. Natomiast niektóre aminokwasy ważne dla funkcji organizmu powstają na drodze metabolizmu z innych aminokwasów.

Dlatego też nie tylko trzeba zwracać uwagę na to ile jemy, ale także czy w naszej diecie zawarte są wszystkie potrzebne do prawidłowego funkcjonowania człowieka składniki. W książce na temat diety roślinnej dla wegan zamieszczono ważne dane wskazujące, że w diecie człowieka wymiana jakiegoś składnika np. zamiana kiwi i mleka

ryżowego, na nasiona chia i mleko sojowe bez cukru, spowoduje wzrost ilości lizyny, zapewniając pokrycie dziennego zapotrzebowania na ten aminokwas [1].

Zalecane jest więc przygotowanie wytycznych, które nauczyłyby ludzi, że nie tylko ilość pokarmu, ale właściwa suplementacja w pożywieniu składników odżywczych jest też ważna. Taka przydatna na co dzień wiedza powinna być przygotowana i wydana w postaci poradnika (rodzaju książki kucharskiej) zawierającego wskazówki co należy jeść, by dostarczać odpowiednią ilość potrzebnych dla prawidłowego rozwoju organizmu składników odżywczych, albo najlepiej aby przygotować np. tygodniowe zestawy gotowych propozycji potraw na cały dzień, z wariantami dla dzieci oraz ludzi wykonujących pracę umysłową lub fizyczną, czy kobiet w ciąży.

5. Badania profilaktyczne

Każdy chciałby w zdrowiu dożyć późnej starości zatem obok diety i wysiłku fizycznego ważne jest także przeprowadzenie badań profilaktycznych.

Jeśli nie zostanie wprowadzony program badań dla wszystkich, to z powodu nie wyselekcjonowania w odpowiednim czasie osób, u których choroba się rozwija, ale nie ma na razie widocznych symptomów, konieczne będzie wydanie dużych nakładów pieniężnych na leczenie nowotworów, których często nie da się już wtedy wyleczyć.

W przypadku realizacji programu badań profilaktycznych dla wszystkich, zmniejszy się znacząco ilość chorujących na nowotwory, bo będą zwykle wyłapano we wczesnej fazie rozwoju, kiedy nowotwór można całkowicie wyleczyć.

Powinno się ustalić program kompleksowych badań profilaktycznych od urodzenia, aż do śmierci człowieka, uwzględniając w nim: wiek, płeć, rodzaj wykonywanej pracy, uwarunkowania genetyczne, środowisko i styl życia.

Zaraz po narodzinach dziecka powinno się ustalić jakie np. badania wykrywające choroby wrodzone u noworodków wykonać (np. fenyloketonuria, celiakia itp.). Oprócz cyklu terminowych szczepień według kalendarzyka szczepień, dzieci powinny mieć podczas nauki w szkole podstawowej kontrolę zdrowia prowadzoną przez pielęgniarkę i lekarza, a także możliwość wyleczenia zębów. Wszystkie dzieci w wieku 10-12 lat powinny mieć przeprowadzoną kontrolę zgryzu i jeśli jest taka potrzeba być odgórnie wysłane na założenie aparatu korygującego zgryz. Powinno to być wykonane z urzędu, a nie zlecane do decyzji rodzicom, bo jedni rodzice dziecku z powodów finansowych takiej korekcji nie zrobią, a u innych dzieci może to być wykonane późno. Rodzice czasami nie mają doświadczenia, że założenie aparatu w celu korekcji zgryzu może mieć wpływ na zdrowie ich dzieci. Wychodząc z założenia, że zwykle ludzie nie znają się na wszystkim i niektórzy by poprawnie się zachować potrzebują być pokierowani, albo czasami nawet wyręczeni by uzyskać najlepszy efekt terapeutyczny.

Reasumując, obecnie wykonywane badania dla dzieci w ramach przygotowanych programów profilaktycznych, związanych ze szczepieniami, czy wykonywanych biogramów, opisujących parametry związane ze wzrostem oraz prawidłowym rozwojem ciała powinny być uzupełnione o badania zgryzu i leczenia ubytków w zębach.

Należy ponadto od 20. roku życia zaprojektować co ok. 5 lat serie badań okresowych dla każdego człowieka, by określić jego stan zdrowia.

5.1. Ile kosztuje profilaktyka, a ile leczenie chorób?

Podstawowy panel badań, w skład którego wchodzi: OB, morfologia, glukoza, profil lipidowy, badanie ogólne moczu kosztuje mniej niż 100 zł [2].

Zawsze profilaktyka będzie tańsza i mądrze zorganizowana wydłuży życie społeczeństwa. Jeśli przyjmujemy, że co 5 lat będą robione takie badania profilaktyczne dla każdego obywatela, to z pewnością przedłuży życie wielu ludzi.

Koszt leczenia pacjenta z nowotworem wzrasta do tysięcy, dziesiątek, a czasami nawet setek tysięcy złotych. Co jest jeszcze z tego najgorsze, że często leczy się wtedy pacjentów, choć ich szanse na wyleczenie są nieznane. Ponadto w zaawansowanym stadium nowotworu, gdy komórki nowotworowe przerzucają, wyleczenie choroby bywa często niemożliwe, tym bardziej, że leczenie pacjentowi dobiera się często na podstawie narzuconych odgórnie przepisów, m.in. obecności lub braku mutacji lub innych markerów, które czasami nie mają wiele wspólnego z potencjalnym efektem terapeutycznym, bo w grupie pacjentów z mutacją są też tacy co nie reagują na terapię. Nie sprawdza się natomiast przed podaniem leczenia (*in vitro*) czy pacjent ma szanse na takie leczenie odpowiedzieć.

Jeśli w ramach składki zdrowotnej na NFZ będziemy odkładać po 10/15 złotych miesięcznie na badania okresowe, to w ciągu 5 lat złożymy 300/450 zł

10/15 zł (przez 12 miesięcy) = 120/180 złotych (w ciągu 5 lat na badania uzbiera się 300/450 złotych).

Dzieciom w wieku 14-16 lat powinno się wykonać podstawowy panel badań, w skład którego wchodzi: OB, morfologia, glukoza, profil lipidowy, badanie ogólne moczu (koszt badań niższy niż 100 zł), w celu sprawdzenia stanu zdrowia i wyselekcjonowania osób, które mają uwarunkowania genetyczne związane ze zbyt wysoką syntezą cholesterolu. Te osoby powinny dostać zalecenia dotyczące diety i wysiłku fizycznego oraz być monitorowane pod kątem zapobiegania miażdżycy i chorób związanych z układem krążenia. Właśnie w tym wieku można uświadomić i pokierować życiem człowieka, by pomóc mu przestrzegając pewnych reguł wydłużyć swoje życie.

Zestaw badań „podstawowy rozszerzony” powinien obowiązywać od 20 roku życia i badania powinny być przeprowadzane co najmniej raz na 5 lat. W przypadku osób, u których zostaną podczas badań profilaktycznych wykryte problemy zdrowotne, powinny być przeprowadzone konsultacje z lekarzem, w celu poszukiwania powodu nieprawidłowych wyników i wyleczenia. Wczesne wykrycie wielu chorób daje możliwość ich efektywnego leczenia. Powyżej 50. roku życia powinny być także do badań włączone markery nowotworowe. Należy przygotować grafik badań dla konkretnego wieku, biorąc pod uwagę płeć, stanowisko pracy i uwarunkowania genetyczne, czy czynniki środowiskowe.

Należy przy tym podkreślić, że z powodu, iż na świecie są dobrzy i źli ludzie, także w gronie pracodawców mogą znaleźć się osoby, które nie będą przykładały wystarczającej wagi do badań profilaktycznych swoich pracowników, dlatego ważne jest by zarządzano na poziomie legislacyjnym i rządowym odkładanie przez osobę ubezpieczoną (płacącą składkę na ubezpieczenie zdrowotne) składkę, przeznaczoną na badania związane z profilaktyką zdrowia. Możliwe, że będzie trzeba odkładać składkę dla siebie i osób zarejestrowanych do ochrony zdrowia (rodzina). Zależy to od możliwości finansowych budżetu państwa. Finansowanie składki wpłacanej na cele zdrowotne powinno być zweryfikowane, urealnione i jeśli obecna składka jest za niska, to należy założyć pod saldo z nową składką na badania profilaktyczne, albo w ramach składki istniejącej wydzielić kwotę 10-15 złotych/os. Jest bardzo ważne, by każdy obywatel miał przeświadczenie, że płaci za badania ze swoich zaoszczędzonych pieniędzy i te

badania profilaktyczne po prostu mu się należą. Powinno się urealnić wydatki, przeliczyć oraz wybrać najbardziej optymalną wersję dla obywateli.

Najważniejszą jednak rzeczą, którą trzeba dopilnować jest pokierowanie obywatelami tak, by w możliwie naturalny sposób podwyższyć odporność człowieka, prowadząc do podniesienia poziomu leukocytozy do 7 tysięcy/ μ l. Człowiek słaby, który ma leukocytozę np. 5 tysięcy/ μ l, i np. średnio 6 litrów krwi ma 30 mld leukocytów, natomiast jeśli leukocytoza wzrośnie do 7 tysięcy/ μ l, to w takiej samej objętości krwi człowiek będzie miał 42 mld leukocytów, czyli o 12 mld więcej, wtedy człowiek będzie sam mógł się bronić przed każdą chorobą. Oczywiście są to ogólne dane przytaczane po to, by wytłumaczyć potrzebę przeprowadzenia działań w tym kierunku. W praktyce jednak, w zależności od uwarunkowań osobniczych oraz chorób współistniejących, ważne oprócz samego poziomu leukocytozy mogą być także inne parametry związane z układem immunologicznym (alergie, choroby autoimmunologiczne) [4].

Jeśli poważnie podejdziesz się do tematu profilaktyki zdrowia i wdroży rzetelną profilaktykę, to wielu ludzi będzie mogło dożyć późnej starości w zdrowiu.

Literatura

1. Kibil I., Gajewska D., *Wege, dieta roślinna w praktyce*, PZWL, Warszawa 2020, s. 29-33.
2. Caquet R., *250 badań laboratoryjnych. Kiedy zlecać., jak interpretować*, PZWL, 2009.
3. Schuhmayer R., *Wyniki badań laboratoryjnych. Znaczenie i interpretacja*, Bauer-Weltbild Media, Warszawa 2003.
4. Demblińska-Kieć A., Naskalski J.W., Solnica B., *Diagnostyka Laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Edra Urban & Partner, Wrocław 2017.

Profilaktyka zdrowia przeciwdziałająca rozwojowi nowotworów w Polsce

Streszczenie

Zdrowie dla każdego jest wartością bezcenną. Uwarunkowania genetyczne, czynniki środowiskowe, styl życia, ogólnoswiatowy konsumpcjonizm i związane z nim także chemiczne modyfikacje żywności mogą być powodem szeregu chorób człowieka, także nowotworów. Aby temu przeciwdziałać i wydłużyć życie ludzi potrzebny jest rzetelny ogólnonarodowy program profilaktyki zdrowia finansowany ze składek odkładanych przez podatników. Profilaktyka zdrowia powinna być ukierunkowana na zmiany związane z dietą, promowaniem zdrowego stylu życia poprzez wysiłek fizyczny, a także wykonywaniem przygotowanego dla społeczeństwa programu badań profilaktycznych, które umożliwią monitoring stanu zdrowia obywateli. Należy wprowadzić zmiany, które polepszą stan zdrowia społeczeństwa i wydłużą długość życia człowieka. Potrzeba także zmian, które przywrócą modę na spożycie niemodyfikowanej, naturalnej żywności, oraz uświadomią ludziom rolę badań profilaktycznych, diety, a także wysiłku fizycznego w wydłużaniu życia człowieka.

Słowa kluczowe: profilaktyka zdrowia, zdrowy styl życia, dieta, wysiłek fizyczny, badania profilaktyczne

Prophylactic of health prevent cancers development in Poland

Abstract

Health display the highest value for everybody. Genetically-related alterations, environmental factors, life style, and the worldwide consumption, combined with chemical food modifications could lead to several diseases, including cancers. Therefore, for enlarge human life there is a need to design a national prophylactic health program financed from our taxes paid by health system. Health prophylactic should be directed toward healthy life style promotion by the diet and physical exercises. Several changes should be introduced to increase life expectancy. We need to design prophylactic program that will be able to monitor human health condition. Moreover, the fashion to consume of healthy, not modified food should return. It is important to explain to citizens the role of prophylactic tests, diet, as well as physical exercises to enlarge the human life.

Keywords: health prophylactic, healthy life style, diet, physical excesses, prophylactic screening

Tabela. 1. Wykaz sposobów do samodzielnego zastosowania w celach profilaktyki zdrowia związanej z żywieniem

Profilaktyka którą możemy samodzielnie stosować
Jeść mniejsze porcje a częściej (co ok. 3 godz.)
Jeść dużą ilość owoców i warzyw; potrzeba ustalić ile dziennie trzeba zjeść i jakie kombinacje owoców i warzyw najlepiej stosować by mieć ochronę antynowotworową; ważna jest dzienna dawka przyjmowana z pożywieniem)
Zamiast zjeść 2 kg jabłek dziennie, by mieć ochronę przeciwnowotworową, można zjeść np. 2 jabłka, ale także inne owoce i warzywa, np. winogrono i brokuły, a także inne produkty zdrowe dla organizmu człowieka, np. rokitnik, kurkuminę, wino, sok pomidorowy i inne. Potrzeba zaangażowania dietetyków, by ustalić ilość oraz kombinacje owoców i warzyw niezbędne w celu zapewnienia dziennego zapotrzebowania chroniącego przed stresem antyoksydacyjnym.

Tabela 2. Przykład pokazujący zamianę składników śniadania w celu zwiększenia ilości lizyny w diecie [1]

Menu przykład przed korektą	Menu przykład po korekcie
Śniadanie	Śniadanie
Płatki owsiane 8 łyżek (80 g)	Płatki owsiane 8 łyżek (80 g)
Gruszka 1 mała (porcja 150 g)	Gruszka 1 mała (porcja 150 g)
Rodzynki suszone 1 łyżka (15 g)	Rodzynki suszone 1 łyżka (15 g)
Kiwi 1 szt (50 g), mleko ryżowe (240 g)	Chia nasiona (10 g), mleko sojowe bez cukru (240 g)

Tabela.3. Porównanie wartości kalorycznej, ilości białka i samej lizyny (parametrów diety) i zapotrzebowania energetycznego w menu przed i po korekcie [1]

Menu przed korektą (A)	Parametry diety	Zapotrzebowanie
Wartość kaloryczna	2108,8 kcal	2100 kcal
Białko ogółem	50,4 g	54 g
Lizyna	1376,6 mg	2280 mg
Menu po korekcie (B)	Parametry diety	Zapotrzebowanie
Wartość kaloryczna	2091,7 kcal	2100 kcal
Białko ogółem	79,9 g	54 g
Lizyna	2311 mg	2280 mg

Tabela. 4. Przykładowe wersje 2 profili badań profilaktycznych [2, 3, 4]

Przykłady 2 wersji podstawowych badań
Podstawowy: OB, morfologia, glukoza, profil lipidowy, badanie ogólne moczu
Podstawowy rozszerzony: OB, morfologia krwi, badanie ogólne moczu, elektrolity, glukoza, ALT, AST, cholesterol całkowity, kreatynina, CRP, witamina D; dodatkowo kobiety badanie ginekologiczne (włączając stopień czystości pochwy), dodatkowo mężczyźni badanie urologiczne prostaty + dodatkowe zalecenie lekarza związane z wykonywanym zawodem, wiekiem, uwarunkowaniami genetycznymi czy rodzinnymi (badania specjalistyczne).
Cel wykonania badań:
OB podwyższa się w przypadku zwiększenia ilości składników wpływających na szybkość migracji erytrocytów (stany zapalne, nowotwory)
Morfologia krwi jest wskazaniem do poszukiwania np. anemii i obniżenie odporności czy zaburzenia krzepnięcia
Badanie ogólne moczu: w celu wykrycia infekcji układu moczowego i chorób nerek (kreatynina). CRP jest wskazaniem do poszukiwania stanu zapalnego.
Elektrolity: oznaczenie poziomu elektrolitów (Na, K) oznaczane w celu poszukiwania zaburzenia równowagi wodno-elektrolitowej organizmu, nadciśnienia czy zaburzeń rytmu serca.
Glukoza: poszukiwanie zaburzeń przemiany cukrów, mogące prowadzić do cukrzycy.
ALT, AST: poszukiwanie zaburzeń funkcjonowania wątroby lub serca
Cholesterol: wskaźnik korelowany z miażdżycą naczyń, możliwym wystąpieniem chorób układu krążenia
Witamina D: poszukiwanie zaburzeń w budowie kości, ważne dla odporności

Indeks Autorów

Aebisher D.	64, 153, 177, 187, 210	Mielnik M.	140
Badowska-Kozakiewicz A.M.	113	Miśkiewicz J.	162
Bartusik- Aebisher D.	210	Motyka J.	7, 16, 43
Bartusik-Aebisher D.	26, 64, 140, 153, 177, 187	Nieciecka D.	120
Celej J.	120	Nurzyńska-Flak J.	196
Chlabicz M.	7, 16	Odjas A.	71
Chmielewska S.	98	Osial M.	120
Cholewa M.	26, 140	Ostańska E.	177, 210
Czyżewska U.	98	Osuchowski M.	187
Fudalej M.M.	113	Przyczyna P.	153
Gola J.	162	Rogalińska M.	220
Grabowska E.	98	Sibicka S.	43
Grzywok K.	86	Smycz-Kubańska M.	86
Gustalik-Nowicka J.	64	Sowa P.	7, 16
Kicman A.	43	Stanjek-Cichoracka A.	130
Kister K.	196	Stańczyk W.	71
Laskowski J.	196	Strzelec A.	86
Ławicki P.	7, 16, 43	Susło O.	71
Ławicki S.	7, 16, 43	Szpunar M.	26
		Tylicki A.	98