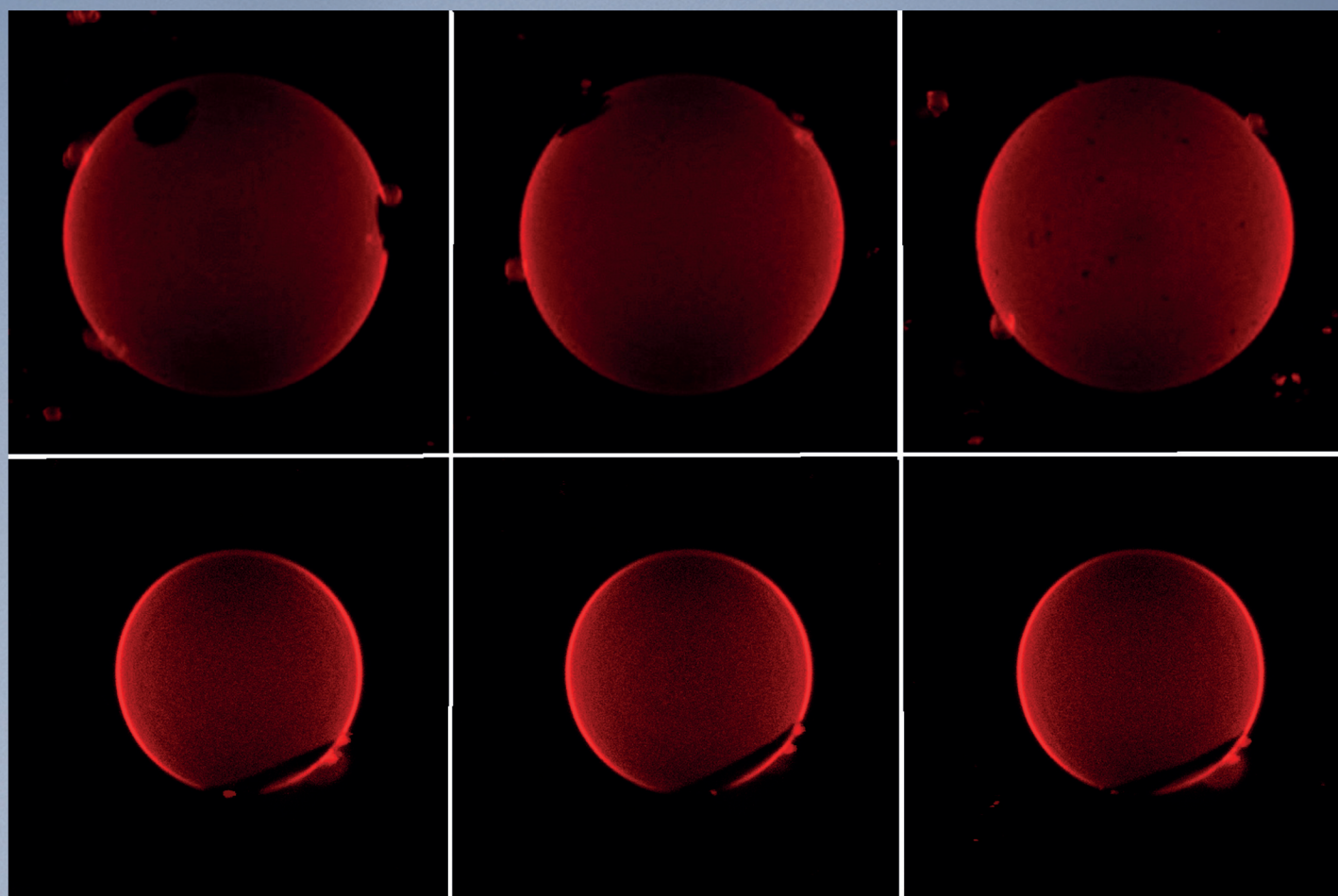


POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

Zeszyty Naukowe Fundacji Polpharmy





**Naukowa
Fundacja
Polpharmy**

POMAGAMY LUDZIOM NAUKI JEDYNA TAKA FUNDACJA

Naukowa Fundacja Polpharmy, założona w 2001 roku przez Zakłady Farmaceutyczne Polpharma SA w Starogardzie Gdańskim, jest jedną z największych w kraju organizacji finansujących projekty badawcze realizowane przez polskich naukowców.

Głównym celem Fundacji jest wspieranie rozwoju nauk farmaceutycznych i medycznych poprzez finansowanie badań naukowych w tych dziedzinach. Środki na działalność statutową Fundacji pochodzą w całości z budżetu Polpharmy. Dotychczas firma przekazała na ten cel ponad 21 mln zł.

Najważniejszym programem realizowanym przez Fundację jest przeprowadzany corocznie **Konkurs na finansowanie projektów badawczych** w dziedzinie nauk farmaceutycznych i medycznych. W latach 2002-2016 odbyło się piętnaście edycji konkursu, 68 zespołów badawczych otrzymało granty naukowe o łącznej wartości 19 054 782 zł.

Naukowa Fundacja Polpharmy wspomaga również młodych badaczy zaczynających dopiero karierę naukową. W 2006 roku uruchomiła **Program stypendialny** promujący najzdolniejszych doktorantów uczelni medycznych. Raz na dwa lata przyznaje w drodze konkursu dziesięć stypendiów naukowych w wysokości 10 tys. zł. Dotychczas Fundacja przyznała 47 stypendiów. Od 12 lat jest także **fundatorem trzech pierwszych nagród** w Ogólnopolskim Konkursie Prac Magisterskich Wydziałów Farmaceutycznych, organizowanym przez Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne.

Fundacja przy współpracy i zaangażowaniu członków Rady Naukowej i Polpharmy od wielu lat realizuje **projekt compliance**, w ramach którego podejmuje szereg działań adresowanych do profesjonalistów medycznych i społeczeństwa, zmierzających do poprawy stopnia przestrzegania zaleceń terapeutycznych. W 2015 r. dzięki wsparciu finansowemu firmy Polpharma, z inicjatywy Fundacji został wydany podręcznik dla lekarzy i studentów kierunków medycznych „Nieprzestrzeganie zaleceń terapeutycznych. Od przyczyn do praktycznych rozwiązań” oraz ulotka wspierająca pacjenta w przestrzeganiu zaleceń terapii.

Więcej o Naukowej Fundacji Polpharmy na stronie
www.polpharma.pl/fundacja

00-728 Warszawa, ul. Bobrowiecka 6, tel. 022 3646113



POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

ADVANCES IN POLISH MEDICINE
AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Tom 5 • Zeszyt 1



WARSZAWA 2017

POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI
ADVANCES IN POLISH MEDICINE AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Editor-in-Chief, Chairman of the Editorial Board • Redaktor Naczelny, Przewodniczący Rady Naukowej PPMiF
prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Associate Editor • Kolegium redakcyjne
Bożenna Płatos, Naukowa Fundacja Polpharmy, Warszawa

Chairman of the Scientific Council • Przewodniczący Rady Naukowej Naukowej Fundacji Polpharmy
prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Editorial Board • Rada Naukowa

prof. dr hab. Edward Franek
prof. dr hab. Zbigniew Gaciong
prof. dr hab. Piotr Kuna
prof. dr hab. Grzegorz Opolski
prof. dr hab. Adam Płaźnik
prof. dr hab. Jarosław Reguła
prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż
prof. dr hab. Janina Stępińska
prof. dr hab. Jerzy Szaflik
prof. dr hab. Mirosław Wielgoś

Honourable Editorial Board • Honorowa Rada Naukowa

prof. dr hab. Waldemar Banasiak
prof. dr hab. Stefan Chłopicki
prof. dr hab. Grzegorz Gryniewicz
prof. dr hab. Marek Jarema
prof. dr hab. Roman Kaliszan
prof. dr hab. Roman Lorenc
prof. dr hab. Edmund Przeglasiński
prof. dr hab. Jacek Rożniecki
prof. dr hab. Jacek Spławiński
prof. dr hab. Cezary Szczylik
prof. dr hab. Marian Zembala

Editorial office • Redakcja
Assistant Editor • Redaktor prowadzący
Paweł Stypulkowski
pawel.stypulkowski@indexcopernicus.com

Associate Editor • Kolegium redakcyjne
Bożenna Płatos
bozenna.platos@polpharma.com

Publisher • Wydawca

INDEX  COPERNICUS
I N T E R N A T I O N A L

Index Copernicus sp. z o.o.
ul. Żurawia 6/12 • 00-503 Warszawa
e-mail: office@indexcopernicus.com
www.indexcopernicus.com

Published for • Wydawane dla



President • Prezes Zarządu
dr Wojciech Kuźmierkiewicz
Vice-president • Wiceprezes Zarządu
Agata Łapińska
Board Member • Członek Zarządu
dr Beata Kamosińska

Naukowa Fundacja Polpharmy
ul. Bobrowiecka 6 • 00-728 Warszawa
tel.: 22 364 63 13 • e-mail: fundacja@polpharma.com
www.polpharma.pl/fundacja

ISSN 1234-5678

rocznik

Indeksowane w: Index Copernicus Journals Master List

1300 egz.

Zdjęcie na okładce pochodzi z pracy Anny Szymaniec i Remigiusza Worchy pt.: „Związek struktura-funkcja peptydu fuzyjnego wirusa grypy”.

© Naukowa Fundacja Polpharmy. Wszystkie prawa zastrzeżone.
Żadna część tej publikacji nie może być przedrukowywana, kopiowana, powielana ani udostępniana zarówno w formie papierowej, jak i elektronicznej bez uprzedniej pisemnej zgody Fundacji.

Spis treści • Table of contents

- ?? **Słowo wstępne**
Editorial
Zbigniew Gaciong
- ?? **(R,R')-4'-metoksy-1-naftyłfenoterol jako potencjalny wielocelowy lek przeciwnowotworowy**
(R,R')-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol as a new multi-target compound of antitumorigenic properties
Justyna Such, Krzysztof Józwiak, Artur Wnorowski
- ?? **Mechaniczna trombektomia jako metoda leczenia przyczynowego udaru mózgu – doświadczenia własne**
Mechanical thrombectomy as a method of causative stroke treatment – own experience
Agnieszka Słowik, Paweł Brzegowy, Dorota Włoch-Kopeć, Joanna Chrzanowska-Waśko, Aleksandra Golenia, Antoni Ferens, Bartłomiej Łasocha, Wojciech Serebnicki, Marcin Wnuk, Tadeusz Popiela
- ?? **Związek struktura-funkcja peptydu fuzyjnego wirusa grypy**
Structure-function relationship of the influenza fusion peptide
Anna Szymaniec, Remigiusz Worch
- ?? **Ocena metylacji wybranych genów w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki – weryfikacja doniesień literaturowych**
Evaluation of selected genes' methylation in nonfunctioning pituitary adenomas – verification of literature reports
Paulina Kober, Mateusz Bujko, Krzysztof Goryca, Maria Maksymowicz, Jacek Kunicki, Wiesław Bonicki, Janusz A. Siedlecki
- ?? **Rola mikroRNA w mechanizmach oporności niedrobnokomórkowego raka płuca na inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR oraz perspektywy klinicznego wykorzystania tego zjawiska**
The role of microRNA in the molecular mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment in NSCLC and the current perspective on its clinical applications
Adam Szpechciński, Mateusz Florczuk
- ?? **Ocena aktywności prokaryotycznych modułów addykcyjnych w kontekście poszukiwania nowych immunotoksyn**
The assessment of prokaryotic addictive modules' activity in the context of seeking novel immunotoxins
Katarzyna Osajca, Łukasz Wieteska, Magdalena Cybula, Janusz Szemraj



Słowo wstępne

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong

*Przewodniczący Rady Naukowej
Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji,
Redaktor Naczelny*

Szanowni Państwo!

Trafia do Państwa kolejny numer *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji*, który zawiera publikacje powstałe w wyniku realizacji projektów naukowych finansowanych przez Naukową Fundację Polpharmy.

Jednym z celów Fundacji jest wspieranie najzdolniejszych młodych badaczy poprzez stypendia dla słuchaczy studiów doktoranckich. W V edycji konkursu laureatem został dr Artur Wnorowski z Zakładu Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Badania, w których uczestniczył doktorant, obejmują poszukiwanie nowych cząsteczek o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. W publikacji, która znalazła się w bieżącym numerze, autor dowodzi, że jeden z uzyskanych związków, będący pochodną naftylofenoterolu, może hamować związany z białkami G receptor GPR55. Liczne badania wielu autorów dowodzą, że ten receptor, związany m.in. z endogennym układem kanabidoidowym, może uczestniczyć w proliferacji i wytwarzaniu przerzutów wielu typów nowotworów, w tym raka piersi, stercza, jajnika i płuca.

W roku 2013 jedynym laureatem konkursu na projekt badawczy była prof. Agnieszka Słowik z Kliniki Neurologii Collegium Medicum UJ. Jego celem było stworzenie i wdrożenie nowatorskiej struktury organizacyjnej w terapii ostrego udaru mózgu. Przedstawione wyniki 2,5-letniego działania CITO – Uniwersyteckiego Centrum Interwencyjnych Terapii Ostrego Udaru Mózgu – dowodzą, że strategia postępowania inwazyjnego pozwala na powrót do pełnej sprawności połowie pacjentów, którzy doznali ciężkiego udaru.

W 2012 roku w konkursie zwyciężył dr Remigiusz Worch z Instytutu Fizyki PAN, który bada procesy zachodzące w trakcie wnikania wirusa grypy do komórek gospodarza. Autor wykorzystał innowacyjną metodę pozwalającą na bezpośrednią wizualizację tego procesu (zob. okładka) oraz jego ilościową ocenę. Nowa metoda pozwoli na lepsze poznanie procesów związanych z zakażeniem tym wirusem, co może doprowadzić do syntezy oryginalnych leków przeciwwirypowych.

Epigenetyka bada zmiany ekspresji genów powstałe w wyniku ich modyfikacji lub zmian białek histonowych, na które jest nawinięta nić DNA. Zahamowanie ekspresji genu najczęściej jest wynikiem metylacji poprzez dodanie grupy metylowej do cząsteczki cytozyny. Istnieją liczne dowody na to, że wiele chorób człowieka wynika z zaburzeń epigenetycznych. Temat ten był treścią projektu dr Pauliny Kober z Instytutu Centrum Onkologii w Warszawie – laureatki konkursu w roku 2014. Autorka badała wzory metylacji regionów regulatorowych wybranych genów w komórkach gruczolaków przysadki nieczynnych hormonalnie. Wyniki potwierdzają znaczenie zaburzeń epigenetycznych w powstawaniu tych guzów, ale wskazują na znaczenie genów innych niż dotychczas opisywane w piśmiennictwie światowym.

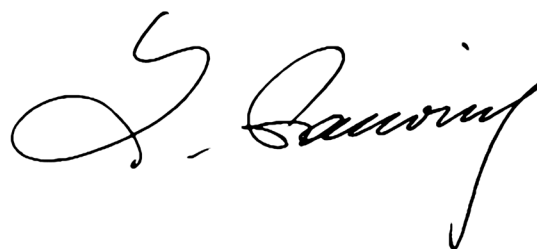
W tym samym roku Fundacja nagrodziła także projekt dr. Adama Szepehcińskiego z Zakładu Genetyki i Immunologii klinicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Autor bada obecność mikroRNA w komórkach nowotworowych oraz krwi pacjentów z rakiem płuca, poszukując markerów odpowiedzi na leczenie. W publikacji autorzy omawiają znaczenie

cząsteczek mikroRNA w przewidywaniu odpowiedzi na inhibitory kinaz stosowane w terapii niedrobnokomórkowego raka płuca z mutacją receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Wyniki badań mogą zbliżyć do opracowania spersonalizowanego leczenia skierowanego do chorych, u których możemy wcześniej przewidzieć wynik terapii.

Jednym ze zwycięzców konkursu w roku 2011 był zespół kierowany przez dr Katarzynę Oszajcy z Zakładu Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

pracujący nad poszukiwaniem toksyn, które mogłyby zostać dostarczone bezpośrednio do komórek nowotworowych za pomocą swoistych przeciwciał. Wytypowana przez naukowców toksyna VapC 2829, uzyskana z bakterii prątka gruźlicy, ma zdolność wywoływania zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy) oraz hamuje podziały komórkowe, co czyni ją kandydatem do dalszych badań.

Zapraszam do lektury



(R,R')-4'-metoksy-1-naftylnoterol jako potencjalny wielocelowy lek przeciwnowotworowy

(R,R')-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol as a new multi-target compound of antitumorigenic properties

Justyna Such
Krzysztof Józwiak
Artur Wnorowski

Zakład Biofarmacji Katedry Chemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Dr n. farm. Artur Wnorowski otrzymał w 2014 roku stypendium naukowe przyznawane przez Naukową Fundację Polpharmy wybitnie zdolnym studentom studiów doktoranckich uczelni medycznych.

Streszczenie

Terapie celowane wykorzystujące związki, które hamują specyficzne cząsteczki docelowe, stwarzają nowe perspektywy w leczeniu raka. Ciągłe pogłębianie wiedzy o etiologii molekularnej chorób w sposób znaczący przesunęło podejście terapeutyczne w kierunku leków działających jednocześnie na wiele celów molekularnych. W niniejszym artykule przedstawiony zostanie przegląd naszych najnowszych badań na temat (R,R')-4'-metoksy-1-naftylnoterolu (MNF). MNF jest dwufunkcyjnym związkiem o działaniu antynowotworowym, który jest jednocześnie agonistą receptora β_2 -adrenergicznego (β_2 AR) oraz antagonistą receptora GPR55. Obie te cechy są ważne w zależnym od MNF hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych w warunkach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, co wskazuje na możliwość zastosowania MNF jako nowego leku wielocelowego w terapii antynowotworowej.

Słowa kluczowe: agonista receptorów beta-2-adrenergicznych

• ligand biwalentny • antynowotworowa terapia celowana • receptory sprzężone z białkiem G • cykliczne AMP • receptory sieroce

Abstract

Targeted therapies are based on the use of compounds that inhibit a specific target molecule within the tissue of interest. The recent advances in the molecular etiology of cancer significantly shifted the therapeutic approach from non-specific cytotoxic agents towards molecules directed either at individual receptors or acting simultaneously on multiple molecular targets. This article is an overview of recent literature on (R,R')-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol (MNF), a novel bifunctional ligand that activates β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) and blocks GPR55 receptor. These two activities are important for MNF-dependent inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, highlighting the potential applicability of MNF in multi-target anti-cancer therapies.

Keywords: beta-2-adrenergic receptor agonist • bivalent ligand • targeted anticancer therapy • G protein-coupled receptor • cyclic AMP • orphan receptors

Wpłynęło: 15-02-2017
Zaakceptowano: 04-03-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji:

Artur Wnorowski
Collegium Pharmaceuticum
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4a/01a, 20-093 Lublin
tel.: +48 81 448 72 22
e-mail: artur.wnorowski@umlub.pl

Wykaz skrótów: AC – cyklaza adenylanowa (ang. *adenyl cyclase*); BCRP – białko oporności raka piersi (ang. *breast cancer resistance protein*); cAMP – cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan; CBR – receptor kannabinoidowy (ang. *cannabinoid receptor*); eEF2 – eukariotyczny czynnik elongacyjny typu 2 (ang. *eukaryotic elongation factor 2*); EGFR – receptor epidermalnego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*); GPCR – receptor sprzężony z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*); MAPK – kinaza aktywowana mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*); MDR – oporność wielolekowa (ang. *multi-drug resistance*), MDT – lek wielocelowy (ang. *multi-target drugs*); MNF – (R,R')-4'-metoksy-1-naftyłfenoterol; PDE4 – fosfodiesteraza typu 4 (ang. *phosphodiesterase 4*); Pgp – glikoproteina P; PKA – kinaza białkowa A (ang. *protein kinase A*); PKM2 – kinaza pirogronianowa typu M2 (ang. *pyruvate kinase M2*); β_2 AR – receptor β_2 adrenergiczny (ang. *β_2 adrenergic receptor*)

WSTĘP

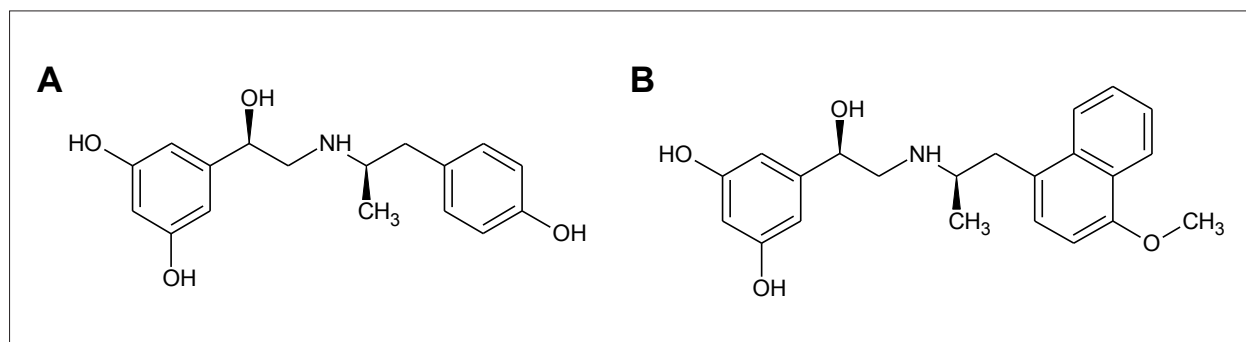
Dynamiczny postęp w dziedzinie biologii nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów odpowiadających za transformację nowotworową, przyczynił się do rozwoju nowych terapii stosowanych w onkologii, określanych jako terapie celowane molekularnie. Nowe podejście terapeutyczne doprowadziło do zaktualizowania pojęcia leku onkologicznego, który zamiast ogólnego działania cytotoksycznego ma selektywnie działać na cele molekularne charakterystyczne jedynie dla komórek nowotworowych, oszczędzając tym samym komórki zdrowe. Jako iż molekularna etiologia chorób nowotworowych jest bardzo złożona i przypomina skomplikowaną sieć oddziaływań pomiędzy licznymi białkami i cząsteczkami sygnałowymi, to substancje działające na pojedynczy cel molekularny bywają często mało skuteczne. Stąd też potrzeba wprowadzenia leków wielocelowych (ang. *multi-target drugs*, MDTs), które uwzględniając ową złożoność, zwiększają szanse na wstrzymanie procesu chorobowego i wyleczenie pacjenta. Strategia leków wielocelowych w onkologii związana jest z potencjalnym uniknięciem rozwoju oporności nowotworów dzięki blokadzie więcej niż jednego z elementów szlaku sygnałowego (receptora, enzymu itp.) zaangażowanego w proces nowotworzenia [1-4]. Obecna praktyka onkologiczna wykorzystuje już leki wielocelowe (MDT) w terapii niektórych nowotworów, inne MDT znajdują się na różnych etapach badań klinicznych.

Komórki nowotworowe wykazują zmiany, które prowadzą do ich niekontrolowanego namnażania się. Każda komórka ma na swojej powierzchni

receptory, za pomocą których komunikuje się z otoczeniem poprzez odbiór sygnałów zewnętrznych. W przypadku komórek zmienionych nowotworowo często dominują określone typy receptorów lub są one specyficzne dla tych komórek. Wykazano, iż komórki nowotworowe różnego pochodzenia wykorzystują podstawowe fizjologiczne funkcje receptorów powierzchniowych, w tym receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*, GPCRs), stając się przez to bardziej agresywne [5]. GPCR-y stanowią obiecującą grupę celów molekularnych dla leków przeciwnowotworowych. Jako receptory błonowe licznie występują na powierzchni komórek i właśnie taka lokalizacja sprzyja interakcji z farmaceutykami. Ponadto blisko 50 proc. obecnie dostępnych na rynku leków jest ligandami tych receptorów, chociaż ich działanie skupia się jedynie na około 4 proc. znanych przedstawicieli rodziny GPCR-ów [5, 6]. Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat przeprowadzono wiele eksperymentów, które dostarczyły istotnych informacji dotyczących antynowotworowego działania związków będących ligandami konkretnych receptorów sprzężonych z białkiem G. Do grupy tych związków można zaliczyć (R,R')-4'-metoksy-1-naftyłfenoterol (MNF).

(R,R')-4-METOKSY-1-NAFTYLFENOTEROL (MNF)

MNF jest pochodną (R,R')-fenoterolu, składnika preparatów leczniczych o aktywności bronchospazmolitycznej i tokolitycznej (rys. 1). MNF jest agonistą receptora β_2 adrenergicznego (β_2 AR), przez co indukuje w komórkach syntezę oraz akumulację cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu (cAMP). Otrzy-



Ryc. 1. Struktura chemiczna (R,R')-fenoterolu i jego pochodnej – (R,R')-4'-metoksy-1-naftyfenoterolu (MNF).

many został zgodnie z opracowanymi schematami syntezy jako efekt projektu optymalizacji struktury przestrzennej fenoterolu [7, 8]. MNF wykazuje selektywność wobec podtypu β_2 receptora adrenergicznego, do którego wiąże 573 razy silniej niż do podtypu β_1 [8]. Wykazano także, iż jest antagonistą receptora GPR55 [9] oraz oddziałuje z receptorami kannabinoidowymi (ang. *cannabinoid receptors*, CBR), zwłaszcza podtypu 1 [10]. Receptory β_2 AR, CB₁R oraz GPR55 należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA MNF

MNF wykazuje działanie antynowotworowe polegające na hamowaniu proliferacji oraz migracji komórek nowotworowych, co zostało potwierdzone w eksperymentach przeprowadzonych na przestrzeni kilku ostatnich lat z wykorzystaniem kilku modelowych linii komórkowych, tj. komórek nowotworów mózgu [11], raka wątroby [9, 10] i trzustki [9, 12], 3 linii komórkowych czerniaka [13], a także linii komórkowej szczurzego glejaka [14].

Historia badań nad właściwościami antynowotworowymi MNF rozpoczęła się w momencie, kiedy przeprowadzono pierwsze badania wskazujące, iż komórki gwiazdki linii 1321N1 i glejaka U118 są wrażliwe na wysokie stężenia cAMP. Nagromadzenie cAMP zmniejsza proliferację tych komórek oraz indukuje proces apoptozy [11]. Akumulacja dużych ilości cAMP jest głównym rezultatem aktywacji receptorów β_2 drogą pobudzenia białka G_{α_s} , a dalej cykazy adenylanowej. Wykorzystane w eksperymentach komórki linii 1321N1 oraz U118 miały na swojej powierzchni receptory β_2 AR, przy czym linia U118 była w nie uboższa. Wykazano, że fenoterol i jego pochodne (w tym MNF) mają zdolność hamowania proliferacji komórek linii gwiazdki i glejaka, co zademonstrowano, wykorzystując test inkorporacji znakowanej radioizotopowo tymidyny. Poziom

inhibicji proliferacji tych komórek pozytywnie korelował ze zdolnością agonistów receptora β_2 do pobudzania syntezy cAMP – im większa była akumulacja cAMP w komórce, tym silniejszy był efekt antyproliferacyjny [11].

Późniejsze badania z wykorzystaniem linii komórkowych czerniaka UACC-647, UACC-903 oraz M93-047 potwierdziły udział sygnalizacji zależnej od aktywacji β_2 AR w działaniu antynowotworowym MNF. Aktywność MNF rosła w sposób liniowy wraz ze zwiększeniem ilości receptorów β_2 na powierzchni komórek i była najsilniej obserwowana w linii UACC-647, bogatej w β_2 AR. Przeprowadzone badania dostarczyły informacji dotyczących kaskady przekazywania sygnałów wewnątrz komórek, która odpowiada za antynowotworowe działanie MNF. Związek ten, poprzez aktywację receptorów β_2 i białka G_{α_s} , pobudza cyklazę adenylanową (AC) i zwiększa poziom cAMP. Dalej cAMP aktywuje kinazę białkową A (PKA) fosforylującą odpowiednie białka efektorowe. W efekcie komórki nowotworowe tracą zdolność do migracji i inwazji. W celu potwierdzenia aktywności MNF wykorzystano związki będące swoistymi agonistami lub antagonistami poszczególnych komponentów tej sygnalizacji. Antymigracyjne właściwości MNF zostały zahamowane przez ICI 118,551, antagonistę β_2 AR, oraz H-89, inhibitora PKA. Z kolei forskolina będąca aktywatorem AC oraz związek Ro 201724 (inhibitor fosfodiesterazy typu 4, PDE4, enzymu odpowiedzialnego za rozkład cAMP) naśladowały działanie MNF. Udowodniono także, że MNF hamuje proliferację komórek czerniaka poprzez inhibicję szlaku kinaz aktywowanych mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) oraz ogranicza biosyntezę białek, gdyż ma zdolność hamowania eukariotycznego czynnika elongacyjnego typu 2 (ang. *eukaryotic elongation factor 2*, eEF2). Dodatkowo w komórkach czerniaka profil działania (R,R')fenoterolu i MNF był podobny, co wyraźnie wskazywało na sygnalizację zależną od aktywacji receptorów β_2 AR [13].

Badania z wykorzystaniem innej linii komórkowej, a mianowicie raka wątroby HepG2, przyniosły nieoczekiwane wyniki. Zaobserwowano zmianę profilu działania (R,R')fenoterolu i isoproterenolu, innego agonisty β_2 , w stosunku do ich aktywności w liniach gwiazdziaka i glejaka. Nie zaobserwowano spadku częstości podziałów komórek linii HepG2 pod wpływem tych związków, jak w przypadku komórek linii 1321N1 i U118. Wręcz przeciwnie – komórki HepG2 poddane działaniu (R,R')fenoterolu i isoproterenolu dzieliły się szybciej niż komórki kontrolne. Co ciekawe, MNF zachował swoją aktywność antyproliferacyjną i skutecznie zmniejszał podziały komórek nowotworowych linii HepG2. Próbowano to wyjaśnić, łącząc antynowotworowe działanie MNF z jego potencjalną zdolnością do wiązania się z receptorami innymi niż β_2 AR. Założenie to potwierdzono po zastosowaniu antagonisty β_2 AR (ICI 118,551), który hamował aktywność (R,R')fenoterolu, ale nie miał znaczącego wpływu na działanie MNF [10]. Uwagę zwrócono wówczas na receptory kannabinoidowe. Po pierwsze, dlatego że oba ich typy występowały na powierzchni komórek HepG2, a po drugie, dlatego że MNF strukturalnie przypominał ich niektóre ligandy. Zastosowano związki będące agonistami oraz antagonistami receptorów kannabinoidowych. Jak się okazało, MNF naśladował działanie WIN 55,212-2 (agonisty CBR) polegające na zmniejszaniu proliferacji komórek HepG2. Natomiast po wyblokowaniu tych receptorów za pomocą związku AM251 (selektywnego antagonisty receptora CB_1) lub AM630 (selektywnego antagonisty receptora CB_2) aktywność antyproliferacyjna MNF została w pierwszym przypadku prawie całkowicie zniesiona, a w drugim osłabiona. Świadczy to o tym, że MNF może oddziaływać na receptory kannabinoidowe, w szczególności na receptor CB_1 . Powyższy eksperyment pierwszy wskazał na podwójną naturę MNF jako liganda zarówno receptora β_2 , jak i receptorów kannabinoidowych [10].

WPŁYW MNF NA RECEPTOR GPR55

Opisany powyżej eksperyment na linii HepG2 stał się podstawą do przeprowadzenia kolejnych badań, które tym razem skupiły się wokół poznania wpływu MNF na receptor GPR55. GPR55 to nowy receptor, do niedawna zaliczany do grupy receptorów sierocych (ang. *orphan receptors*), który jest zaangażowany w powstawanie i rozwój nowotworów [15]. GPR55 pod względem struktury pierwszorzędowej praktycznie nie przypomina receptorów kannabinoidowych, ale pobudzany jest przez wiele związków o charakterze kannabinoidów [16-18].

Źródłem hipotezy, że MNF oddziałuje na ww. receptor, było to, iż AM251, związek blokujący aktywność MNF, jest agonistą receptora GPR55. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano linie komórkowe HepG2 oraz PANC-1. Badania rozpoczęto od określenia, czy MNF ma istotny wpływ na internalizację GPR55. W tym celu użyto związku Tocrifluor 1117 (T1117), fluorescencyjnej formy AM251 o małym powinowactwie do receptora CB_1 , lecz dużym do GPR55. Poziom fluorescencji określano za pomocą mikroskopu konfokalnego. Komórki HepG2 oraz PANC-1, wykazujące ekspresję GPR55, poddano działaniu rosnących stężeń MNF i dowiedziono, iż związek ten hamuje internalizację receptora GPR55, co zaobserwowano jako zmniejszenie inkorporacji T1117. Dodatkowo ujawniono, że MNF zmniejsza zależną od GPR55 aktywację kinaz MAP i ogranicza pobudzaną przez agonistów tego receptora zdolność komórek nowotworowych do migracji oraz powoduje zmiany w morfologii tych komórek. Badania te po raz pierwszy wskazywały na rolę MNF w sygnalizacji zależnej od GPR55, a zatem uwidoczniły jego potencjał terapeutyczny w leczeniu chorób nowotworowych zależnych od receptora GPR55. Szczególnie że ekspresja GPR55 na powierzchni komórek nowotworowych znacznie przekracza jego ekspresję na powierzchni zdrowych komórek [9].

Zainteresowanie działaniem MNF w kontekście receptora GPR55 zaowocowało przeprowadzeniem kolejnych grup eksperymentów. Najnowsze badania objęły linię komórkową ludzkiego raka trzustki PANC-1. Aktywność antynowotworową MNF określano, koncentrując się tym razem na ekspresji znanych markerów nowotworowych, takich jak receptor epidermalnego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), β katienina, kinaza pirogronianowa typu M2 (ang. *pyruvate kinase M2*, PKM2) i cyklina D1, oraz ekspresji i aktywności eksporterów odpowiedzialnych za oporność wielolekową (ang. *multi drug resistance*, MDR), tj. glikoproteiny P (Pgp) oraz BCRP (ang. *breast cancer resistance protein*) [12]. Bazowano na zależności pomiędzy zwiększoną aktywnością ścieżek MEK/ERK i PI3K/AKT a podwyższoną ekspresją białek MDR i procesem onkogenezy [19-23]. Aktywacja receptora GPR55 prowadzi do powstawania i rozwoju nowotworów właśnie poprzez nasilenie aktywności ścieżek MEK/ERK i PI3K/AKT [9, 10, 15, 24]. Komórki PANC-1 inkubowano z MNF (antagonistą GPR55) przez 24 godziny. Wykazano, że MNF znacząco obniża poziomy białek EGFR, PKM2 i β -katieniny, czemu towarzyszy również znaczna redukcja jądrowej akumulacji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α i aktyw-

nych, ufosforylowanych form PKM2 i β -kateniny. Hamowanie aktywności receptora GPR55 przez MNF oraz innego antagonistę GPR55 (związku CID 16020046) obniża liczbę białek MDR w całkowitych ekstraktach komórkowych oraz zmniejsza jądrową ekspresję Pgp i BCRP. Głównym mechanizmem warunkującym powstanie lekooporności jest działanie błonowych białek transportowych (Pgp, BCRP), które aktywnie usuwają leki z komórek nowotworowych [25]. MNF w sposób dawkozależny skutecznie obniżał poziomy tych białek, dlatego w celu potwierdzenia zdolności MNF do zwiększania cytotoksyczności leków onkologicznych komórki PANC-1, poddane wcześniej działaniu doksorubicyny, traktowano MNF. Zaobserwowano znaczący wzrost akumulacji cytostatyka w jądrach badanych komórek nowotworowych. Dodatkowo wstępna inkubacja komórek PANC-1 z gradientem MNF zwiększyła cytotoksyczność doksorubicyny oraz gemcytabiny, co przedstawiono w teście inkorporacji ^3H -tymidyny. Zwiększenie cytotoksyczności doksorubicyny zaobserwowano także, badając komórki nowotworu piersi MDA-MB-231 oraz glejaka U87MG, które cechowała wysoka ekspresja receptorów GPR55. Dostępne dane sugerują, iż hamowanie aktywności receptora GPR55 nasila działanie antynowotworowe poprzez tłumienie ścieżek MEK/ERK i PI3K/AKT, co z kolei prowadzi do zmniejszenia ekspresji i funkcji białek MDR odpowiedzialnych za oporność na chemioterapię i przeżywalność komórek nowotworowych [12].

Bogaty zasób informacji dotyczących antynowotworowego działania MNF w warunkach *in vitro* skłonił nas do przeprowadzenia badań na zwierzętach w celu potwierdzenia aktywności *in vivo*. Wykorzystano do tego celu komórki szczurzego glejaka linii C6, raka mózgu opornego na leczenie, które wszczepiono myszom laboratoryjnym. Trzy dni po podskórnej implantacji komórek C6 zwierzętom podawano dootrzewnowo przez kolejne 19 dni MNF w dawce 2 mg/kg lub roztwór soli fizjologicznej. Objętość guzów mierzono regularnie w czasie trwania eksperymentu. Wyniki potwierdziły, iż w grupie zwierząt przyjmujących MNF rozmiary guzów były znacznie mniejsze niż w przypadku grupy kontrolnej. Ujawniono, że skuteczność MNF przeciwko proliferacji komórek glejaka C6, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, jest związana ze znaczącym obniżaniem ekspresji białek będących regulatorami cyklu komórkowego, a mianowicie cykliny A oraz D1 [14]. Glejak C6 to linia komórkowa indukowanego chemicznie guza mózgu szczura, która na swojej powierzchni ma zarówno receptory β_1 i β_2 [26, 27], jak i CB [28]. Jak wcześniej wykazano, sygnalizacja β AR-zależna wpływa

na proliferację komórek linii C6 [29], a aktywacja receptorów CB wywołuje apoptozę komórek glejaka [28, 30]. Wykorzystując powyższe informacje, wykonano najpierw eksperymenty z użyciem MNF i innych agonistów receptora β_2 . Silne zahamowanie wzrostu komórek C6 zaobserwowano w odpowiedzi na MNF. Wpływ isoproterenolu i (R,R')fenoterolu na proliferację tych komórek, w porównaniu z MNF, badano pod nieobecność oraz w obecności selektywnego antagonisty β_2 AR, ICI 118,551. Wyniki uzyskano w teście inkorporacji ^3H tymidyny. Odnotowano, iż (R,R')fenoterol i isoproterenol cechują się słabszą inhibicją wzrostu komórek C6 niż MNF przy takim samym stężeniu tych związków. Dodatek ICI 118,551 nie wpływa istotnie na antyproliferacyjną aktywność MNF, natomiast zmniejsza działanie (R,R')fenoterolu i isoproterenolu [14]. Dodatkowo zwrócono uwagę na możliwość wiązania MNF z receptorem CB_1 . W grupie komórek szczurzego glejaka inkubowanych wcześniej z antagonistą CB_1 (AM251) zaobserwowano zniesienie antyproliferacyjnego działania MNF, natomiast w momencie zastosowania związku AM630 (antagonisty receptora CB_2) wpływ na aktywność MNF nie był istotny, co wskazuje, iż MNF oddziałuje silniej z receptorem CB_1 niż CB_2 zlokalizowanymi na powierzchni komórek C6. Wyniki tego eksperymentu potwierdziły zaobserwowaną wcześniej w linii HepG2 preferencję MNF do silniejszego wiązania się do receptora CB_1 [10].

PODSUMOWANIE

MNF jest związkiem spełniającym jednocześnie wiele funkcji, co zademonstrowano w przytoczonych powyżej eksperymentach prowadzonych na różnych liniach komórek nowotworowych. MNF pobudza receptory β_2 -adrenergiczne oraz kannabinoidowe, zwłaszcza CB_1 , a także negatywnie wpływa na proproliferacyjne wewnętrzne szlaki przekazywania sygnałów zależne od GPR55. Obie te cechy mają istotne znaczenie w kontekście terapii antynowotworowej, co utwierdza i podnosi znaczenie MNF jako potencjalnego leku wielocelowego, który może znaleźć zastosowanie w onkologii. Szczególnie w przypadku komórek nowotworowych z nadekspresją β_2 AR lub wrażliwych na wysokie stężenia cAMP, a także wykazujących zależność od receptora GPR55.

PODZIĘKOWANIA

Badania prowadzone przez autorów zostały wsparte finansowo przez Fundację na rzecz Nauki Pol-

skiej (program TEAM 2009-4/5), Intramural Research Program amerykańskiego Narodowego Instytutu Badań nad Starzeniem (National Institute on Aging, kontrakt N01-AG-3-1009) oraz Naukową Fundację Polpharmy (stypendium dla Ar-

tura Wnorowskiego). Niniejszy artykuł powstał w związku z pracą magisterską przygotowaną przez Justynę Such na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

PIŚMIENNICTWO

1. Bojanowski P., Lipiński P.F.J., Czekala P. et al., Leki wielocelowe – nowy paradygmat w projektowaniu leków, *Biul Wdż Farm WUM*, 2013; 1: 1-10.
2. Petrelli A., Valabrega G., Multitarget drugs: the present and the future of cancer therapy, *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2009; 10: 589-600.
3. Zimmermann G.R., Lehar J., Keith C.T., Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts, *Drug Discovery Today*, 2007; 12: 34-42.
4. Petrelli A., Giordano S., From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage, *Current Medicinal Chemistry*, 2008; 15: 422-32.
5. Dorsam R.T., Gutkind J.S., G-protein-coupled receptors and cancer, *Nature Reviews Cancer*, 2007; 7: 79-94.
6. Tyndall J.D., Sandilya R., GPCR agonists and antagonists in the clinic, *Medicinal Chemistry*, 2005; 1: 405-21.
7. Jozwiak K., Khalid C., Tanga M.J. et al., Comparative molecular field analysis of the binding of the stereoisomers of fenoterol and fenoterol derivatives to the beta2 adrenergic receptor, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007; 50: 2903-15.
8. Jozwiak K., Woo A.Y., Tanga M.J. et al., Comparative molecular field analysis of fenoterol derivatives: A platform towards highly selective and effective beta(2)-adrenergic receptor agonists, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010; 18: 728-36.
9. Paul R.K., Wnorowski A., Gonzalez-Mariscal I. et al., (R,R')-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol targets GPR55-mediated ligand internalization and impairs cancer cell motility, *Biochemical Pharmacology*, 2014; 87: 547-61.
10. Paul R.K., Ramamoorthy A., Scheers J. et al., Cannabinoid receptor activation correlates with the proapoptotic action of the beta2-adrenergic agonist (R,R')-4-methoxy-1-naphthylfenoterol in HepG2 hepatocarcinoma cells, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2012; 343: 157-66.
11. Toll L., Jimenez L., Waleh N. et al., b2-adrenergic receptor agonists inhibit the proliferation of 1321N1 astrocytoma cells, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011; 336: 524-32.
12. Singh N.S., Bernier M., Wainer I.W., Selective GPR55 antagonism reduces chemoresistance in cancer cells, *Pharmacological Research*, 2016; 111: 757-66.
13. Wnorowski A., Sadowska M., Paul R.K. et al., Activation of beta2-adrenergic receptor by (R,R')-4'-methoxy-1-naphthylfenoterol inhibits proliferation and motility of melanoma cells, *Cellular Signalling*, 2015; 27: 997-1007.
14. Bernier M., Paul R.K., Dossou K.S. et al., Antitumor activity of (R,R')-4-methoxy-1-naphthylfenoterol in a rat C6 glioma xenograft model in the mouse, *Pharmacology Research & Perspectives*, 2013; 1: e00010.
15. Andradas C., Caffarel M.M., Perez-Gomez E. et al., The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK, *Oncogene*, 2011; 30: 245-52.
16. Ryberg E., Larsson N., Sjogren S. et al., The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor, *British Journal of Pharmacology*, 2007; 152: 1092-101.
17. Baker D., Pryce G., Davies W.L. et al., In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2006; 27: 1-4.
18. Kotsikorou E., Madrigal K.E., Hurst D.P. et al., Identification of the GPR55 agonist binding site using a novel set of high-potency GPR55 selective ligands, *Biochemistry*, 2011; 50: 5633-47.
19. Xu J.W., Li Q.Q., Tao L.L. et al., Involvement of EGFR in the promotion of malignant properties in multi-drug resistant breast cancer cells, *International Journal of Oncology*, 2011; 39: 1501-9.
20. Correa S., Binato R., Du Rocher B. et al., Wnt/beta-catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia, *BMC Cancer*, 2012; 12: 303.
21. Harris I., McCracken S., Mak T.W.: PKM2: a gatekeeper between growth and survival, *Cell Research*, 2012; 22: 447-9.
22. Riganti C., Salaroglio I.C., Caldera V. et al.: Temozolomide downregulates P-glycoprotein expression in glioblastoma stem cells by interfering with the Wnt3a/glycogen synthase-3 kinase/beta-catenin pathway, *Neuro-oncology*, 2013; 15: 1502-17.
23. Karakashev S.V., Reginato M.J.: Progress toward overcoming hypoxia-induced resistance to solid tumor therapy, *Cancer Management and Research*, 2015; 7: 253-64.
24. Pineiro R., Maffucci T., Falasca M., The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation, *Oncogene*, 2011; 30: 142-52.
25. Lenart K., Szyda A., Kiełbasiński M. et al., Kliniczne skutki oporności wielolekowej w nowotworach, *Onkologia w Praktyce Klinicznej*, 2005; 1: 18-26.
26. Danner S., Lohse M.J.: Cell type-specific regulation of beta2-adrenoceptor mRNA by agonists, *European Journal of Pharmacology*, 1997; 331: 73-8.

27. Prenner L., Sieben A., Zeller K. et al., Reduction of high-affinity beta2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy, *Biochemistry*, 2007; 46: 5106-13.
28. Galve-Roperh I., Sanchez C., Cortes M.L. et al.: Antitumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation, *Nature Medicine*, 2000; 6: 313-9.
29. Lung H.L., Shan S.W., Tsang D. et al., Tumor necrosis factor-alpha mediates the proliferation of rat C6 glioma cells via beta-adrenergic receptors, *Journal of Neuroimmunology*, 2005; 166: 102-12.
30. Jacobsson S.O., Wallin T., Fowler C.J., Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001; 299: 951-9.

Mechaniczna trombektomia jako metoda leczenia przyczynowego udaru mózgu – doświadczenia własne

Mechanical thrombectomy as a method of causative stroke treatment – own experience

Agnieszka Słowik^{1, 2}
Paweł Brzegowy^{3, 4}
Dorota Włoch-Kopec^{1, 2}
Joanna Chrzanowska-Waśko¹
Aleksandra Golenia^{1, 2}
Antoni Ferens¹
Bartłomiej Łasocha³
Wojciech Serednicki⁵
Marcin Wnuk^{1, 2}
Tadeusz Popiela^{3, 4}

¹Oddział Kliniczny Neurologii, Szpital Uniwersytecki, Kraków

²Katedra i Klinika Neurologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

³Zakład Diagnostyki Obrazowej Centrum Urazowego Medycyny Ratunkowej i Katastrof, Szpital Uniwersytecki, Kraków

⁴Katedra Radiologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

⁵Klinika Intensywnej Terapii Interdyscyplinarnej, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2013 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem pani prof. dr hab. med. Agnieszki Słowik grant na realizację projektu badawczego pt. „Czy wdrożenie nowatorskiej struktury organizacyjnej dedykowanej terapii ostrego udaru mózgu (Centrum Interwencyjnych Terapii Ostrego Udaru Mózgu) poprawi skuteczność leczenia tej choroby”.

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki leczenia ostrego udaru niedokrwinnego mózgu za pomocą trombektomii mechanicznej w Centrum Interwencyjnych Terapii Ostrego Udaru Mózgu (CITO) – strukturze organizacyjnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie stworzonej do realizacji tego badania. CITO działa w systemie 24 godziny 7 dni w tygodniu i zgodnie z protokołem 6 osób, które uczestniczą w zabiegu trombektomii mechanicznej, rozpoczyna go do 45 minut po wezwaniu przez koordynatora CITO.

Od stycznia 2013 do 30 września 2016 roku wykonano 96 zabiegów. Trzymiesięczny okres obserwacji został zrealizowany u 74 kolejnych chorych (39 mężczyzn), średnia wieku: 65,8±13,1 roku. Prezentowane wyniki dotyczą tej grupy chorych. Średni wynik w skali NIHSS przy zachorowaniu wynosił 15,4±4,2 punktu. U 46 chorych (62,2%) leczenie za pomocą mechanicznej trombektomii było poprzedzone rt-PAIV. Czas od zachorowania do nakłucia tętnicy udowej wynosił średnio 265±88,5 minuty. Po zabiegu 3 punkty w skali TIC1 uzyskało 26 osób (35,1%), 2b – 12 osób (16,2%), 2a – 19 osób (25,7%), 1 – 8 osób (10,8%), a 0 – 9 osób (12,2%). W KT głowy 24 godziny po zabiegu brak ukrwotocznienia ogniska niedokrwinnego stwierdzono u 37 osób. H11 według klasyfikacji ECASS1 zidentyfikowano u 11 chorych (14,9%), H12 – u 16 chorych (21,6%), PH1 – u 4 chorych (5,4%), a PH2 – u 6 osób (8,1%). Do doby 90. zmarło 14 osób (18,9%), a 38 osób (51,4%) uzyskało 80-100 punktów w ocenie za pomocą indeksu Barthel.

Przedstawione wyniki wskazują na porównywalne do dotychczas opublikowanych prac bezpieczeństwo i skuteczność trombektomii mechanicznej w leczeniu ostrego udaru niedokrwinnego mózgu wykonywanej w warunkach stworzonego do tego celu systemu organizacyjnego CITO.

Słowa kluczowe: udar niedokrwienno mózgu • leczenie • trombektomia

Wpłynęło: 10-03-2017
Zaakceptowano: 08-04-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji

Prof. dr hab. med. Agnieszka Słowik
Oddział Kliniczny Neurologii
Szpital Uniwersytecki w Krakowie
ul. Botaniczna 3, 31-503 Kraków
tel.: 12 424 86 00
e-mail: slowik@cm-uj.krakow.pl

Abstract

We present own results of the treatment of acute ischemic stroke by mechanical thrombectomy. Procedures were conducted in the Center for Acute Ischemic Stroke Treatment (CITO) at the University Hospital in Krakow that was established for this study. The Center works in the 24/7 system, and according to the protocol 6 professionals who participate in the procedure starts it within 45 minutes after the call of the Center coordinator.

Since January the 1st 2013 till September the 30th 2016, 96 procedures were performed. Three months follow-up was performed in the consecutive 74 patients (39 men), mean age: $65,8 \pm 13,1$ and here we present their data. Mean NIHSS score on admission was $15,4 \pm 4,2$ points. In 46 patients (62.2%) mechanical thrombectomy was preceded by rt-PA-IV administration. Mean time from stroke onset to groin puncture was $265 \pm 88,5$ minutes.

After the procedure $\text{TICI}=3$ was obtained by 26 patients (35.1%), 2b – by 12 patients (16.2%), 2a – 19 patients (25.7%), 1 – 8 patients (10.8%) and 0 – by 9 patients (12.2%).

Head CT scan done 24 hours after thrombectomy did not show hemorrhagic transformation in 37 patients. According to ECASS1 classification H11 was found in 11 patients (14.9%), H12 – in 16 patients (21.6%), PH1 – in 4 patients (5.4%) and PH2 – in 6 patients (8.1%).

Fourteen patients (18.9%) died within 90 days after stroke onset, and 38 – scored 80-100 points in Barthel Index (51.4%).

Presented results indicate similar safety and efficacy profile of mechanical thrombectomy in the treatment of ischemic stroke performed in the system that was organized for this specific reason.

Key words: ischemic stroke • treatment • thrombectomy

WSTĘP

Udar mózgu jest drugą co do częstości przyczyną zgonu i pierwszą przyczyną niepełności osób dorosłych [1]. W Polsce na udar niedokrwienności mózgu choruje rocznie ok. 70 000 osób [2]. Około 15% umiera do 30. doby po zachorowaniu, a 30% – do roku po udarze [3]. Większość z tych, którzy przeżyją, wymaga całodobowej opieki w zakresie wszystkich codziennych czynności.

W ostatnich 20 latach dokonał się znaczący postęp w leczeniu udaru niedokrwienności mózgu. Za kroki milowe tego postępu uważa się: leczenie udaru w specjalistycznych oddziałach udarowych, stosowanie kwasu acetylosalicylowego już w czasie pierwszych 48 godzin od zachorowania na udar, hemikraniektomię w wybranych przypadkach oraz leczenie przyczynowe za pomocą jednorazowego dożylnego podania leku trombolitycznego (rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu

– rt-PA, alteplaza) lub za pomocą leczenia wewnątrznaczyniowego (mechaniczne usunięcie zakrzepu z tętnicy mózgowej lub jego rozpuszczenie chemiczne za pomocą rt-PA podawanego w miejscu powstania zakrzepu) [4].

Leczenie za pomocą rt-PA/IV jest stosowane już od 1995 roku [5]. W Polsce to leczenie wprowadzono w 2003 roku i zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Neurologicznego odbywa się w tzw. Oddziałach Udarowych [6]. Ze względu na dość wąskie okno terapeutyczne i liczne kryteria wykluczenia leczenie to w codziennej praktyce według danych NFZ jest stosowane u około 10% chorych na udar niedokrwienności mózgu.

Innym sposobem leczenia przyczynowego ostrego udaru niedokrwienności mózgu jest leczenie endowaskularne (wewnątrznaczyniowe). Leczenie to polega na mechanicznym udrożnieniu naczyń tętniczych (mechaniczna trombektomia)

lub na podaniu rt-PA dotętniczo (rt-PAIA) w miejscu zakrzepu [7].

Ocena skuteczności leków trombolitycznych podawanych bezpośrednio w miejscu zakrzepu odpowiedzialnego za powstanie udaru niedokrwiennego była analizowana zaledwie kilka razy. Metaanaliza tych badań [8] opublikowana w czasopiśmie *Stroke* (łącznie 395 uczestników) wykazała, że dotętnicze podanie leku trombolitycznego znacząco zwiększa odsetek rekanalizacji naczynia i odsetek osób, u których występuje powrót do zdrowia w dobie 90., mimo większego odsetka krwotoków objawowych i nieobjawowych w grupie leczonej aktywnie.

Zalecenia Europejskie dopuszczają zastosowanie trombolizy dotętniczej u chorych z ostrą niedrożnością tętnicy środkowej mózgu w oknie czasowym wynoszącym 6 godzin (klasa II, poziom B) oraz u wybranych chorych z ostrą niedrożnością tętnicy podstawnej (klasa III, poziom B) [9]. Zalecenia AHA/ASA (American Heart Association/American Stroke Association) dopuszczają stosowanie trombolizy dotętniczej do 6 godzin po udarze niedokrwinnym w zakresie unaczynienia tętnicy mózgu środkowej u chorych, którzy nie kwalifikują się do trombolizy dożylniej. Dawka leku nie jest ustalona. W wytycznych podkreślono, że FDA (ang. U.S. Food and Drug Administration) nie zaakceptowała stosowania rt-PAIA w tym wskazaniu (klasa zaleceń I, poziom B) [10].

Mechaniczna trombektomia jest drugim sposobem przyczynowego leczenia wewnątrz tętniczego ostrego udaru niedokrwiennego. Pierwszym urządzeniem zarejestrowanym do tego typu leczenia było urządzenie typu MERCI. Jego przydatność do usuwania zakrzepów z naczyń mózgowych u chorych na ostry udar mózgu udokumentowano po raz pierwszy w 2004 roku [11]. W kolejnych badaniach, MERCI i MULTI-MERCI, potwierdzono jego przydatność w tym zakresie [12, 13, 14]. Od 2004 roku na świecie urządzenie MERCI zastosowano u kilkunastu tysięcy chorych na udar niedokrwienno-mózgu.

Nowoczesne trombektomy to: samorozprężalne stenty, np. Solitaire (ang. Solitaire Flow Restoration Device) lub Trevo, albo urządzenia umożliwiające aspirację materiału zatorowego ze światła naczyń, np. system Penumbra (ang. Penumbra system) [15] 2012.

W 2012 roku pojawiły się pierwsze wyniki badań wskazujące na przewagę nowoczesnych trombektomów: Solitaire i Trevo, nad urządzeniem MERCI [16, 17].

W 2013 roku w czasopiśmie *New England Journal of Medicine* opublikowano wyniki 3 dużych badań klinicznych porównujących skuteczność mechanicznej trombektomii ze standardowymi metodami leczenia ostrego udaru niedokrwiennego mózgu: 1) the Inter-ventional Management of Stroke (IMS III) [18]; 2) Local versus Systemic Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke (SYNTHESIS EXPANSION) [19]; 3) Mechanical Retrieval and Recanalisation of Stroke Clots Using Embolectomy (MR RESCUE) [20]. Wyniki tych trzech badań nie udokumentowały przewagi mechanicznej trombektomii nad metodami standardowymi. Ich wyniki były przedmiotem burzliwej dyskusji i spotkały się dużą krytyką [21]. Badaniom tym zarzucano zbyt wolną rekrutację pacjentów, brak informacji na temat sposobu znieczulenia do zabiegu, stosowanie do trombektomii urządzeń starego typu (MERCI), brak powszechnego obrazowania naczyń mózgowych przed zabiegiem w celu zlokalizowania zakrzepu, a także brak obrazowania penumbry w protokole kwalifikacji do zabiegu.

W marcu 2015 roku opublikowano wyniki kolejnych nowych 5 badań klinicznych, które porównywały skuteczność mechanicznej trombektomii w leczeniu ostrego udaru niedokrwiennego mózgu z leczeniem standardowym. Te badania z kolei zgodnie potwierdziły, że leczenie za pomocą mechanicznej trombektomii istotnie zwiększa odsetek osób samodzielnych po udarze. Wszystkie badania, tj. MR CLEAN [22], REVASCAT [23], ESCAPE [24], SWIFT PRIME [25], EXTEND-IA [26], udokumentowały przewagę leczenia za pomocą mechanicznej trombektomii nad leczeniem standardowym.

W badaniach opublikowanych w 2015 roku chorzy byli kwalifikowani do leczenia interwencyjnego nie tylko na podstawie wyniku tomografii komputerowej klasycznej, ale także na podstawie wyniku obrazowania naczyń mózgowych i domózgowych, oraz w 3 przypadkach (SWIFT PRIME [25], EXTEND-IA [26] i ESCAPE [24]) na podstawie perfuzyjnej tomografii komputerowej. Ponadto we wszystkich badaniach opublikowanych w 2015 roku urządzeniem najczęściej stosowanym do udrożniania naczyń był Solitaire (Solitaire.ev3.Irvine, CA, USA). Urządzenie to zostało zarejestrowane w Stanach Zjednoczonych i Europie dopiero w 2012 roku. Daje ono znacznie większą szansę na rekanalizację naczyń niż stare urządzenie typu MERCI. Na przykład MERCI powoduje rekanalizację tylko w 65%, a Solitaire – w 90% przypadków [27].

Celem pracy było przedstawienie wyników leczenia za pomocą trombektomii mechanicznej kolejnych-

chorych na udar mózgu przyjętych do Centrum Interwencyjnych Terapii Ostrego Udaru Mózgu w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie.

MATERIAŁ I METODY

Badanie zostało przeprowadzone na materiale kolejnych chorych z rozpoznaniem udaru niedokrwiennego mózgu leczonych w Oddziale Udarowym Oddziału Klinicznego Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie od 1 stycznia 2013 do 30 czerwca 2016 roku.

Kryterium włączenia do badania był udar niedokrwienny mózgu rozpoznawany na podstawie definicji WHO z 1976 roku [28], który wystąpił w czasie 8 godzin poprzedzających rozpoczęcie zabiegu. Do zabiegu kwalifikowano tylko osoby, u których stan funkcji poznawczych pozwalał na wyrażenie zgody na leczenie za pomocą mechanicznej trombektomii.

Każda osoba, u której zastosowano mechaniczną trombektomię, musiała spełniać kryteria włączenia do procedury i wyłączenia z niej. Protokół leczenia był zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną UJ CM (KBET/178/B/2013 z dnia 27.06.2013 roku).

Kryteria włączenia do leczenia za pomocą mechanicznej trombektomii:

- rozpoznanie ostrego udaru niedokrwiennego mózgu, który jest konsekwencją zamknięcia dużego naczynia mózgowego (na podstawie angiogramu TK);
- czas od wystąpienia objawów neurologicznych do rozpoczęcia procedury leczenia za pomocą mechanicznej trombektomii ≤ 8 godzin u chorych na udar zlokalizowany w przednim kręgu unaczynienia, a u chorych na udar zlokalizowany w tylnym kręgu unaczynienia możliwość wykonania terapii wewnątrznaczyniowej ≤ 12 godzin od wystąpienia objawów;
- deficyt neurologiczny w skali NIHSS ≥ 5 punktów;
- brak możliwości rozpoczęcia dożylnego wlewu rtPA $\leq 4,5$ godziny od wystąpienia objawów (np. przekroczenie okna czasowego, lub chory w oknie czasowym, ale liczba płytek: 30 000-100 000, INR: 1,7-3, udokumentowana choroba wrzodowa przewodu pokarmowego w ciągu ostatnich 3 miesięcy, żylaki przełyku, tętniak, malformacja naczyniowa);
- brak poprawy lub zwiększenie deficytu neurologicznego po dożylnym trombolizie (brak poprawy w NIHSS w momencie zakończenia wlewu rt-PAIV);

- wiek ≥ 18 lat.

Kryteria wyłączenia z leczenia za pomocą mechanicznej trombektomii:

- nieznany początek zachorowania;
- deficyt neurologiczny < 5 punktów w skali NIHSS [29];
- rozległy udar niedokrwienny mózgu w czasie 3 miesięcy poprzedzających aktualne zachorowanie;
- podejrzenie rozwarstwienia aorty;
- stwierdzenie w tomografii komputerowej krwotoku śródmózgowego, krwotoku podpajęczynówkowego, krwiaka nad- lub podtwardówkowego;
- stwierdzenie w tomografii komputerowej obecności uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego o dużym ryzyku ukrwotoczenia (guz mózgu, ropień, malformacja naczyniowa, tętniak wewnątrzczaszkowy, stłuczenie); leczenie należy rozważyć, gdy w obrazowaniu jest mały, niepęknięty tętniak lub łagodny guz o niewielkim unaczynieniu;
- stwierdzenie przy zachorowaniu objawów sugerujących krwotok podpajęczynówkowy, nawet bez stwierdzanych charakterystycznych zmian w tomografii komputerowej;
- stwierdzenie w tomografii komputerowej obrzęku mózgu, który powoduje przesunięcie linii środkowej;
- RR powyżej 185/110 mmHg, które nie ulega obniżeniu po podaniu leków hipotensyjnych;
- udokumentowana skaza krwotoczna;
- glikemia < 50 mg/dl (2,8 mmol/L) lub powyżej 400 mg/dl (22 mmol/L);
- INR u leczonych doustnymi antykoagulantami $> 3,0$.

PROTOKÓŁ BADANIA

Badania przy przyjęciu:

- tomografia komputerowa, perfuzyjna tomografia komputerowa, angiotomografia naczyń wewnątrz- i zewnątrzczaszkowych;
- badania krwi: panel badań biochemicznych, w tym stężenie glukozy zgodnie z zaleceniami ESO [9];
- ocena deficytu neurologicznego według skali NIHSS przy przyjęciu [29].

Badania po zakończeniu zabiegu:

- angiografia naczyń mózgowych, ocena przepływu krwi w naczyniach mózgowych po zabiegu za pomocą skali TIC1 [30].

Badania 24 godziny po zabiegu:

- tomografia komputerowa bez kontrastu (ocena ukrwotocznienia ogniska niedokrwienego według skali używanej w badaniu ECASS 1 [31]).

Badania diagnostyczne w trakcie hospitalizacji w celu ustalenia etiologii udaru niedokrwienego na podstawie kryteriów TOAST (choroba dużych naczyń; choroba małych naczyń – udar sercowo-zatorowy, udar o nieustalonej etiologii, udar o rzadkiej etiologii) [32]; ultrasonografia tętnic szyjnych i ultrasonografia przezczaszkowa, echokardiografia przekłatkowa, 24-godzinne monitorowanie rytmu serca, a także jeśli były wskazania, echokardiografia przezprzełykowa oraz badania laboratoryjne krwi w kierunku zespołów nadkrzepliwości i obecności auto-przeciwciał.

Badania 3 miesiące po zachorowaniu:

- ocena neurologiczna według indeksu Barthel (ocena na podstawie rozmowy telefonicznej z pacjentem lub jego opiekunem) [33].

Uzyskane informacje były gromadzone w komputerowej bazie danych. Zgodność informacji w bazie danych z treścią dokumentów źródłowych (historia choroby, karty informacyjne z poprzednich hospitalizacji) była kilkakrotnie sprawdzana.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki badań przedstawiono w postaci wartości średnich i odchyłeń standardowych. Różnicę rozkładu płci między grupami sprawdzono testem χ^2 , a rozkładu wieku – za pomocą testu t-Studenta. Dla porównania rozkładu zmiennych kategorycznych w badanych grupach użyto testu χ^2 , a zmiennych ilościowych – testów: t-Studenta (rozkład normalny) oraz U Manna-Whitneya (brak rozkładu normalnego). Korelacje zbadano za pomocą testu Spearmana. Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $<0,05$.

Do wykonania powyższych analiz zastosowano pakiet statystyczny Statistica wersja 9.

WYNIKI**Charakterystyka analizowanej grupy chorych**

W czasie trwania badania, od 1 stycznia 2013 do 30 września 2016 roku, do Oddziału Udarowego

przyjęto 1307 chorych z rozpoznaniem udaru niedokrwienego mózgu. Leczenie przyczynowe zastosowano u 308 chorych, w tym leczenie za pomocą trombektomii mechanicznej u 96 chorych. Ocena stanu pacjentów po 3 miesiącach po zachorowaniu na udar została wykonana u 74 chorych i taka grupa została ostatecznie włączona do przedstawionej analizy.

Wśród uczestników badania z 3-miesięcznym okresem obserwacji było 39 mężczyzn i 35 kobiet. Średnia wieku w czasie zachorowania na udar wynosiła $65,8 \pm 13,1$ roku. Nadciśnienie tętnicze stwierdzono u 53 chorych (71,6%), cukrzycę u 21 chorych (28,4%), chorobę niedokrwinną serca u 21 chorych (28,4%), zawał serca w wywiadzie u 7 chorych (9,7%), migotanie przedsionków u 30 chorych (40,5%), a otyłość u 19 chorych (25,7%).

Nasilenie deficytu neurologicznego przed wykonaniem trombektomii oceniano za pomocą skali NIHSS. Wynik w tej skali wynosił średnio $15,4 \pm 4,2$ punktu (zakres: 5-25 punktów). Połowa chorych miała ciężki deficyt neurologiczny, tzn. uzyskała 16-25 punktów w tej skali.

U wszystkich uczestników badania etiologię udaru niedokrwienego oceniano za pomocą klasyfikacji TOAST [Adams i wsp., 1993]. Etiologii udaru niedokrwienego nie ustalono u 34 chorych (45,9%). Wśród osób o ustalonej etiologii najczęściej przypadków stanowiły osoby z rozpoznaniem udaru o etiologii sercowo-zatorowej (31 osób, 41,9%). Udar spowodowany chorobą dużych naczyń stwierdzono u 6 osób (8,1%). W 3 przypadkach udar był spowodowany rozwarstwieniem tętnic (4,1%).

Procedura terapeutyczna

U 46 chorych (62,2%) leczenie za pomocą mechanicznej trombektomii było poprzedzone podaniem rt-PAIV. W pozostałych przypadkach rt-PAIV nie było podane z następujących przyczyn: przekroczenie okna terapeutycznego (15 osób, 20,3%); podwyższenie wskaźnika INR powyżej 1,7 z powodu stosowania klasycznych doustnych antykoagulantów ($n=8$, 10,8%); krwawienie z przewodu pokarmowego w wywiadzie ($n=1$, 1,3%); zabieg operacyjny w czasie poprzedzających 2 tygodni ($n=1$, 1,3%); nakłucie tętnicy biodrowej dzień przed zachorowaniem ($n=1$, 1,3%); stan po krwotoku podpajeczynówkowym z tętniaka i stan po zakłipsowaniu tętniaka ($n=1$, 1,3%), stan po urazie wielonarządowym ($n=1$, 1,3%).

Rt-PA dotętniczo podano w czasie zabiegu mechanicznej trombektomii u 4 osób (5,5%) (dawka 5 mg

u 1 osoby, dawka 10 mg u 1 osoby i dawka 20 mg u 2 osób). Założenie stentu do tętnicy szyjnej z powodu jej krytycznego zwężenia wykonano w 4 przypadkach (5,5%). Zakrzep w tętnicy szyjnej wewnętrznej był zlokalizowany u 12 chorych (16,2%), w segmencie M1 tętnicy mózgu środkowej u 40 chorych (54,1%), w segmencie M2 tętnicy mózgu środkowej u 15 chorych (20,3%), w segmencie M3 – u 3 chorych (4,1%), a w zakresie unaczynienia tętnicy podstawnej – u 4 chorych (5,4%).

W badanej grupie chorych czas od zachorowania do nakłucia tętnicy udowej wynosił średnio $265 \pm 88,5$ minuty (zakres: 105–443 minuty).

W 69 przypadkach (93,2%) do przeprowadzenia zabiegu wystarczyło zastosowanie jednego trombektomu, ale w 3 przypadkach (4,1%) konieczne było zastosowanie 2 trombektomów, a w 2 przypadkach (2,7%) – 3 trombektomów. Łącznie zastosowano 81 trombektomów. Najczęściej stosowano trombektomu typu Solitaire ($n=67$, 82,7%), rzadziej Penumbra ($n=6$, 7,4%), Aperio ($n=6$, 7,4%), po jednym przypadku Trevo (1,4%) i Eric (1,4%).

Efekty leczenia

U wszystkich uczestników badania oceniono wczesne i późne efekty leczenia.

Wczesne efekty leczenia:

- stopień rekanalizacji naczyń mózgowych oceniany za pomocą skali TIC1;
- obecność krwotoków mózgowych w tomografii komputerowej 24 godziny po leczeniu (skala ECASS 1).

Późne efekty leczenia:

- śmiertelność w dobie 90.;
- samodzielność w skali Barthel w dobie 90.

Kontrolne badanie angiograficzne tuż po wykonaniu zabiegu trombektomii pozwoliło na ocenę stopnia rekanalizacji naczyń mózgowych. Trzy punkty w skali TIC1, co wskazuje na całkowitą rekanalizację, uzyskało 26 osób (35,1%), 2b w skali TIC1 uzyskało 12 osób (16,2%), 2a – 19 osób (25,7%), 1 – 8 osób (10,8%), a 0 – 9 osób (12,2%).

24 godziny po wykonaniu zabiegu trombektomii u pacjentów wykonywano kontrolne badanie TK głowy w celu sprawdzenia, czy przeprowadzona procedura była powikłana ukrwotoczeniem udaru niedokrwiennego mózgu. Oceny dokonywano za pomocą

skali ECASS 1. U 37 osób nie stwierdzono ukrwotoczenia. Drobne wybroczyny na obrzeżu zawału mózgu (H11) stwierdzono u 11 chorych (14,9%), zlewające się wybroczyny w obszarze zawału mózgu bez efektu masy (H12) stwierdzono u 16 chorych (21,6%), krwotok obejmujący poniżej 30% obszaru zawału mózgu z niewielkim efektem masy (PH1) u 4 (5,4%), natomiast rozległy krwotok obejmujący powyżej 30% ogniska zawałowego z wyraźnym efektem masy (PH2) u 6 osób (8,1%).

Do doby 90. zmarło łącznie 14 osób (18,9%). Przyczyny zgonu oraz dobę po zachorowaniu, w której wystąpił zgon, przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Przyczyny zgonu do doby 90. w analizowanej grupie chorych oraz liczba dni od zachorowania do zgonu.

Przyczyna zgonu	Liczba przypadków	Doba zgonu
Krwotok mózgowy	5	3, 6, 7, 7, 24
Obrzęk mózgu i wgłobienie	2	3, 4
Zapalenie płuc	3	8, 15, 27
Niewydolność krążenia i oddychania	4	15, 21, 31, 32

Wśród pozostałych 60 osób, które przeżyły, aż 38 (51,4%) uzyskało 80–100 punktów w ocenie za pomocą indeksu Barthel w dobie 90. Osiem osób (10,8%) uzyskało 0–19 punktów, 2 osoby (2,7%) oceniono na 20–39 punktów, 6 osób (8,1%) na 40–59 punktów i 6 osób na 60–79 punktów (8,1%).

DYSKUSJA

Prezentowana analiza przedstawia doświadczenie jednego ośrodka, Oddziału Udarowego Oddziału Klinicznego Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, w zakresie stosowania najnowocześniejszej terapii przyczynowej ostrego udaru niedokrwiennego mózgu – leczenia za pomocą mechanicznej trombektomii z wykorzystaniem nowoczesnych trombektomów.

Prezentowana praca pokazuje wyniki stosowania tej terapii w warunkach codziennej praktyki lekarskiej na oddziale neurologicznym, który specjalizuje się w terapii przyczynowej udaru mózgu. Dotychczas w Polsce opublikowano wyniki leczenia endowaskularnego ostrego udaru mózgu tylko u 18 chorych leczonych za pomocą trombolizy dotętniczej lub me-

chanicznej trombektomii w Śląskiej Akademii Medycznej. Po 3 miesiącach po zastosowanym leczeniu wyraźną poprawę (0-2 punkty w skali mRS) uzyskało 57,15% chorych [34].

W prezentowanym badaniu przedstawiono wyniki leczenia 74 pacjentów z rozpoznaniem ostrego udaru niedokrwinnego mózgu, którzy spełnili kryteria kwalifikacji do leczenia za pomocą trombektomii mechanicznej. Należy podkreślić, że wdrożone w Oddziale Udarowym Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie rozwiązanie organizacyjne umożliwiło włączenie leczenia u wszystkich, którzy zostali do niego zakwalifikowani. Leczenie interwencyjne udaru niedokrwinnego mózgu nie jest terapią powszechną. Do tej procedury kwalifikuje się jedynie kilka procent chorych na udar niedokrwiny mózgu [35]. Na przykład w Austrii liczącej 8,4 miliona mieszkańców w czasie rocznej obserwacji zidentyfikowano zaledwie 313 chorych na udar mózgu, u których wykonano zabieg trombektomii mechanicznej [36]. Proponowane w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie rozwiązanie organizacyjne zakłada udział w zabiegu 6 osób. Cztery osoby dyżurują pod telefonem (neurolog, radiolog interwencyjny, pielęgniarka radiologiczna, technik radiolog), a anestezjolog i pielęgniarka anestezjologiczna uczestniczą w zabiegu w ramach dyżuru stacjonarnego na Oddziale Intensywnej Terapii. Zgodnie z protokołem tych 6 osób ma 45 minut na zgłoszenie się do szpitala, jeśli zaplanowano zabieg. Prezentowany system organizacyjny zadziałał prawidłowo w każdym przypadku.

Protokół terapii interwencyjnej w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie zakładał wykonanie badań obrazowych mózgu i naczyń mózgowych umożliwiających dokładną lokalizację zakrzepu jeszcze przed zabiegiem oraz potwierdzenie drożności tętnicy szyjnej umożliwiającej dojście trombektomem do zamkniętego naczynia mózgowego. Od 20. przypadku zakwalifikowanego do leczenia do protokołu diagnostycznego dołączono obrazowanie mózgu za pomocą perfuzyjnej tomografii komputerowej. Ta technika umożliwia zidentyfikowanie obszaru odwracalnie uszkodzonego mózgu.

W przeciwieństwie do badań z 2013 roku [18, 19, 20] badania opublikowane w 2015 roku pozwalały na kwalifikację pacjentów do zabiegu trombektomii na podstawie wyników badań obrazujących naczynia, tzn. angiografię klasyczną [22, 23], angiografię rezonansu magnetycznego [22, 23, 25, 26] lub angiografię tomografii komputerowej [22, 23, 24, 25, 26], a także 2 z nich na podstawie wyniku perfuzyjnej tomografii komputerowej – SWIFT PRIME [25] i ESCAPE [24]. W opinii ekspertów możliwie rozbudowany protokół

zwiększa szanse na bezpieczną kwalifikację do zabiegów [37].

Uważa się, że obrazowanie naczyń mózgowych i domózgowych przed zabiegiem umożliwiające dokładną lokalizację zakrzepu przed trombektomią było jednym z głównych powodów sukcesu badań klinicznych opublikowanych w 2015 roku [38].

Protokół terapii interwencyjnej w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie zakładał wdrożenie terapii interwencyjnej do 8 godzin po zachorowaniu. Dotychczas opublikowane badania dopuszczały rozpoczęcie zabiegu przed upływem 6-12 godzin.

W prezentowanym badaniu leczenie do 6 godzin wdrożono u 64 chorych, a u pozostałych 10 w czasie 6-8 godzin. Szczegółowa analiza rokowania u tych 10 osób leczonych później wykazała dobrą skuteczność terapii. Sześć osób w dobie 90. uzyskało 80-100 punktów skali Barthel, 2 osoby 60-80 i 2 osoby 40-60. Żadna osoba z tej grupy nie zmarła do doby 90. Wskazuje to, że procedura była bezpieczna nawet do 8 godzin, które upłynęły od zachorowania do nakłucia tętnicy.

W prezentowanym badaniu uczestniczyły osoby z deficytem neurologicznym od 5 do 25 punktów w skali NIHSS. W badaniu MR CLEAN [22] kwalifikowano osoby z deficytem w skali NIHSS powyżej 1 punktu, w badaniu REVASCAT [23] – powyżej 5 punktów. Z kolei w badaniu SWIFT PRIME [25] osoby zakwalifikowane musiały mieć wyraźny deficyt neurologiczny (powyżej 8 punktów w skali NIHSS), a w badaniu EXTEND-IA [26] kwalifikowano osoby nawet bez objawów neurologicznych. Maksymalny deficyt neurologiczny, podobnie jak w prezentowanej pracy, był określony tylko w 2 badaniach. W SWIFT PRIME [25] wynosił 29 punktów, w EXTEND-IA [26] – 42 punkty.

Protokół prezentowanego badania dopuszczał wykonywanie zabiegów zarówno na tętnicach przedniego (n=70, 94,6%), jak i tylnego kręgu unaczynienia (n=4, 5,4%). W ostatniej grupie 1 osoba zmarła do 3 miesięcy po zachorowaniu z powodu masywnego krwotoku mózgowego. Wszystkie badania kliniczne opublikowane w 2015 roku pozwalały na kwalifikację jedynie pacjentów z zakrzepem zlokalizowanym w naczyniu przedniego kręgu unaczynienia. Np. w badaniu MR CLEAN [22] zakrzepy były zlokalizowane w tętnicy szyjnej wewnętrznej, segmentach M1, M2 i M3 tętnicy mózgu środkowej oraz A1 i A2 tętnicy mózgu przedniej, w badaniu ESCAPE [24] i w badaniu EXTEND-IA [26] w tętnicy szyjnej wewnętrznej i segmentach M1 i M2 tętnicy szyjnej wewnętrznej,

a w badaniu REVASCAT [23] i SWIFT PRIME [25] tylko w tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz segmencie M1 tętnicy mózgu środkowej.

Leczenie interwencyjne chorych na udar spowodowany zakrzepem w tylnym kręgu unaczynienia było przedmiotem nielicznych badań. Systematyczna analiza opublikowana w 2016 roku przez Maka i wsp. pozwoliła na zidentyfikowanie 41 badań opublikowanych w latach 1996-2015, które porównywały skuteczność trombolizy dotętnicznej i trombolizy dotętnicznej połączonej z mechanicznym usunięciem zakrzepu z tętnicy podstawnej. Analiza ta wykazała przewagę tej drugiej metody w odniesieniu do przeżycia, lepszego rokowania krótkoterminowego oraz wyższego odsetka rekanalizacji. Nie stwierdzono różnic między dwoma analizowanymi sposobami leczenia w odniesieniu do liczby osób, które przeżyły i były zależne od innych, ani odsetka krwotoków mózgowych [39].

Protokół prezentowanego badania zakładał konieczność wykonania trombolizy dożylną przed leczeniem interwencyjnym, chyba że były przeciwwskazania do stosowania rt-PAIV. Przeciwwskazanie w tym przypadku stanowiło: wartość INR powyżej 1,7, przekroczone okno terapeutyczne lub zabieg operacyjny wykonany w czasie 30 dni poprzedzających udar.

Dwudziestu ośmiu chorych nie kwalifikowało się do podania rt-PAIV: u 15 osób było przekroczone okno terapeutyczne, 8 osób miało podwyższony INR z powodu stosowania klasycznych antykoagulantów. U pozostałych nie podano rt-PAIV z powodu niedawno przeprowadzonych zabiegów operacyjnych, urazu wielonarządowego lub nakłucia dużej tętnicy.

W 3 z 5 opublikowanych w 2015 roku badań klinicznych podanie rt-PAIV nie zawsze poprzedzało trombektomię mechaniczną. W badaniu MR CLEAN [22] odnotowano 13% takich przypadków, w badaniu REVASCAT – 32% [23], a w badaniu ESCAPE IA – 27% [24].

Na uwagę zasługuje też grupa chorych, u których wskazaniem do trombektomii było przekroczenie wartości INR powyżej 1,7 z powodu stosowania klasycznych leków przeciwkrzepliwych. Takich chorych w prezentowanym badaniu było 8. W tej grupie 3 osoby zmarły (37,5%) do doby 90., a pozostałe osoby były samodzielne w dobie 90.; jedna uzyskała 75 punktów w skali Barthel, 1 osoba – 90 punktów i 3 po 100 punktów w skali Barthel. Analiza statystyczna wykazała, że odsetek zgonów u chorych leczonych trombektomią pod wpływem klasycznych antykoagulantów i u pozostałych osób jest podobny. Mała liczba chorych zakwalifikowanych do zabiegu

z powodu zbyt wysokich wartości INR nie pozwala na wyciąganie jednoznacznych wniosków co do skuteczności terapii za pomocą mechanicznej trombektomii w tej grupie. Przegląd literatury na ten temat pozwolił zidentyfikować tylko 2 badania, w których udokumentowano bezpieczeństwo i skuteczność mechanicznej trombektomii u chorych pod wpływem antykoagulantów [40,41].

W prezentowanej pracy najwięcej chorych miało zastosowane trombektomy Solitaire (80%). Podobny odsetek urządzeń Solitaire był stosowany w innych najnowszych badaniach. Przedstawiona praca dopuszczała także zakładanie stentu do tętnicy szyjnej, jeśli była konieczność jej udrożnienia w celu umożliwienia technicznego wykonania zabiegu mechanicznej trombektomii. W prezentowanym badaniu stent do tętnicy szyjnej założono u 4 osób. Wszystkie osoby przeżyły. W dobie 90. 3 osoby uzyskały 100 punktów w skali Barthel, a 1 osoba 50 punktów. Z dotychczasowych doświadczeń w badaniach klinicznych założenie stentu do tętnicy szyjnej było dopuszczane tylko w badaniu MR CLEAN [22]. W tym badaniu był on zastosowany w 13% przypadków.

Prezentowane badanie, podobnie jak badanie MR CLEAN, dopuszczało również trombolizę dotętniczną w maksymalnej jednorazowej dawce 20 mg [22]. Takie leczenie zastosowano u 4 osób. Wszystkie osoby przeżyły do doby 90. Trzy z nich uzyskały 100 punktów w skali Barthel, a 1 osoba – 0 punktów. W protokole badania MR CLEAN dopuszczano rt-PAIA w dawce maksymalnej 90 mg lub urokinazę w dawce 1 200 000 IU. Gdy podawano rt-PAIV przed zabiegiem, akceptowalna dawka dotętnicza leku trombolitycznego była obniżana do ¾ wyżej wymienionej dawki.

Stosowany w prezentowanej pracy protokół dopuszczał więcej modyfikacji leczenia niż poszczególne protokoły najważniejszych badań klinicznych na ten temat. Mimo to uzyskane dane były porównywalne z wynikami uzyskanymi u chorych leczonych interwencyjnie w najważniejszych badaniach klinicznych.

Jednym z najważniejszych punktów końcowych w badaniach klinicznych na temat skuteczności mechanicznej trombektomii jest stopień rekanalizacji w skali TICI w angiografii wykonanej po zabiegu [42]. W prezentowanej pracy odsetek chorych z TICI 2b/3 wynosił 51,5% i był nieco niższy niż w innych badaniach, np. w badaniu MR CLEAN wynosił 59% [22], w badaniu REVASCAT – 66% [23], w badaniu ESCAPE – 72% [24], w badaniu SWIFT PRIME – 88% [25], a w badaniu EXTEND-IA – 86% [26].

Należy podkreślić, że prezentowane badanie miało śmiertelność w dobie 90. równą 18,9% i porównywalną do śmiertelności w badaniu MR CLEAN [22] i REVASCAT [23]. W 3 pozostałych badaniach odnotowano śmiertelność w dobie 90. na poziomie 10%. Nie jest wykluczone, że odpowiada za to krótszy w tych 3 ostatnich badaniach czas od zachorowania do nakłucia tętnicy. W badaniu SWIFT PRIME wynosił on 224 minuty [25], a w badaniu EXTEND-IA 210 minut [26]. W badaniu ESCAPE podano tylko czas od randomizacji do nakłucia tętnicy [24]. W badaniu MR CLEAN [22] czas od zachorowania do nakłucia tętnicy wynosił 260 min, a w badaniu REVASCAT 269 minut [23]. W prezentowanym badaniu wynosił on 267 minut.

Wśród analizowanych pacjentów odległą skuteczność leczenia oceniano za pomocą skali Barthel [33]. Ocena była dokonywana telefonicznie przez pielęgniarkę naukową Oddziału Klinicznego Neurologii. Skala Barthel jest narzędziem powszechnie uznanym do oceny samodzielności chorych po udarze mózgu i jest postrzegana jako równorzędne narzędzie z mRS w odniesieniu do oceny odległego rokowania w badaniach klinicznych po udarze mózgu [43]. Skala Barthel pozwala bardzo szczegółowo i w sposób bardziej jednoznaczny niż mRS ocenić samodzielność chorych podczas rozmowy telefonicznej.

W prezentowanym badaniu aż 51,4% uczestników badania uzyskało 80-100 punktów w skali Barthel, tzn. były to osoby samodzielne i sprawne w aktywnościach codziennego życia.

We wszystkich innych cytowanych badaniach klinicznych samodzielność po udarze oceniano za pomocą skali mRS [42]. Od 0 do 2 punktów w tej skali (chory wymagający niewielkiej pomocy w aktywnościach dnia codziennego) w badaniu MR CLEAN uzyskało 32,6% chorych [22], w badaniu REVASCAT 43,7% chorych [23], w badaniu ESCAPE 53% [24], w badaniu SWIFT PRIME 60% [25] i w badaniu EXTEND-IA – 71% chorych [26].

Analizując liczbę chorych całkowicie sprawnych w dobie 90., tzn. tych, którzy uzyskali 100 punktów skali Barthel, ustalono, że w prezentowanym badaniu było ich aż 31 (47%). W innych cytowanych wyżej badaniach klinicznych od 0 do 1 punktu w mRS, czyli brak objawów lub objawy nieistotne klinicznie, miało 12% leczonych w badaniu MR CLEAN [22], 24% leczonych w badaniu REVASCAT [23], 36% leczonych w badaniu ESCAPE [24], 43% w badaniu SWIFT PRIME [25] i 52% w badaniu EXTEND-IA [26]. Prezentowane wyniki pokazują, że odsetek osób samodzielnych w dobie 90. po udarze jest porównywalny z odsetkiem chorych samodzielnych w innych badaniach na ten temat.

Podsumowując, leczenie przyczynowe ostrego udaru niedokrwinnego mózgu za pomocą trombektomii mechanicznej z użyciem nowoczesnych trombektomów zastosowane u 74 chorych leczonych w Centrum Interwencyjnych Terapii Ostrego Udaru Mózgu w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie spowodowało całkowity powrót do zdrowia oraz porównywalną śmiertelność do innych badań opublikowanych na ten temat.

PIŚMIENNICTWO

1. Feigin V.I., Forouzanfar M.H., Krishnamurthi R., For the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factor Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*, 2014; 383: 245-54.
2. Członkowska A., Ryglewicz D., Weissbein T., Baranska-Gieruszczyk M., Hier D.B., A prospective community-based study of stroke in Warsaw, Poland, *Stroke*, 1994; 25: 547-51.
3. Słowik A., Turaj W., Zwolińska G. et al., Stroke attack rates and case fatality in the Krakow Stroke Registry, *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2007; 41: 291-5.
4. Romano J.G., Sacco R., Decade in review – stroke: Progress in acute ischaemic stroke treatment and prevention, *Nature Reviews Neurology*, 2015; 11: 619-21.
5. Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, *N Engl J Med*, 1995; 333: 1581-87.
6. Wytyczne Grupy Ekspertów Sekcji Chorób Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Neurologicznego. Postępowanie w udarze mózgu, *Neurol Neurochir Pol.*, 2012; 46: supl. 1.
7. Fisher M., Albers G.W., Advanced imaging to extend the therapeutic time window of acute ischemic stroke, *Ann Neurol*, 2013; 73: 4-9.
8. Lee M., Hong K.S., Saver J.L., Efficacy of intra-arterial fibrinolysis for acute ischemic stroke. Meta-analysis of randomized controlled trials, *Stroke*, 2010; 41: 932-37.
9. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2009, *Cerebrovasc Dis*, 2008; 25: 457-507.
10. Jauch E.C., Saver J.L., Adams H.P. Jr et al., Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke. A Guideline for Healthcare Professionals From the American

- Heart Association/American Stroke Association, *Stroke*. 2013; 44: 870-947.
11. Gobin Y.P., Starkman S., Duckwiler G.R. et al., MERCI 1: a phase 1 study of Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia, *Stroke*. 2004; 2848-54.
12. Smith W.S., Sung G., Saver J. et al., Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial, *Stroke*, 2008; 39: 1205-12.
13. Smith W.S., Sung G., Starkman S. et al., Safety and Efficacy of Mechanical Embolectomy in Acute Ischemic Stroke. Results of the MERCI Trial, *Stroke*, 2005; 36: 1432-1438.
14. Nogueira R.G., Liebeskind D.S., Sung G. et al., Predictors of good clinical outcomes, mortality, and successful revascularization in patients with acute ischemic stroke undergoing thrombectomy: pooled analysis of the Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia (MERCI) and Multi MERCI Trials, *Stroke*, 2009; 40: 3777-83.
15. Raychev R., Saver J.L., Mechanical thrombectomy devices for treatment of stroke, *Neurol Clin Pract*, 2012; 2: 231-35.
16. Saver J., Jahan R., Levy E.I. et al., Solitaire flow restoration device versus the Merci Retriever in patients with acute ischemic stroke (SWIFT): a randomized, parallel-group, non-inferiority trial. *Lancet*, 2012; 380: 1241-9.
17. Nogueira R.G., Lutsep H.L., Gupta R. et al., Trevo versus Merci retrievers for thrombectomy revascularisation of large vessel occlusions in acute ischaemic stroke (TREVO 2): a randomised trial, *Lancet*, 2012; 380: 1231-40.
18. Broderick J.P., Palesch Y.Y., Demchuk A.M. et al., Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke, *N Engl J Med*, 2013; 368: 893-903.
19. Ciccone A., Valvassori L., Nichelatti M. et al., Endovascular treatment for acute ischemic stroke, *N Engl J Med*, 2013; 380: 904-13.
20. Kidwell C.S., Jahan R., Gornbein J. et al., A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke, *N Engl J Med*, 2013; 368: 914-23.
21. Broderick J.P., Tomsick T.A., Palesch Y.Y., Endovascular treatment for acute ischemic stroke, *N Engl J Med*, 2013; 368: 2432-3.
22. Berkhemer O.A., Fransen P.S., Beumer D. et al., A randomized trial of intrarterial treatment for acute ischemic stroke, *NEJM*, 2015; 372: 11-20.
23. Jovin T.G., Chamorro A., Cobo E. et al., Thrombectomy within 8 hours after Symptom onset in ischemic stroke, *N Engl J Med*, 2015; 372: 2296-306.
24. Goyal M., Demchuk A.M., Menon B.K. et al., Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke, *N Engl J Med*, 2015; 372: 1019-30.
25. Saver J.L., Goyal M., Bonafe A. et al., Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs t-PA alone in stroke, *N Engl J Med*, 2015; 372: 2285-95.
26. Campbell B.C.V., Mitchell P.J., Kleinig T.J. et al., Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection, *N Engl J Med*, 2015; 372; 11: 10 09-18.
27. Walcott B.P., Boehm K.M., Stapleton C.J. et al. Retrievable stent thrombectomy in the treatment of acute ischemic stroke: analysis of revolutionising treatment technique, *J Clin Neurosci*, 2013; 20: 1346-49.
28. WHO (World Health Organisation). Cerebrovascular Disorders: a Clinical and research Classification. World Health Organisation, Offset Publication, Geneva, 1978; 43.
29. Brott T., Adams H.P., Olinger C.P. et al., Measurements of acute cerebral infarction – a clinical examination scale, *Stroke*, 1989; 20: 864-70.
30. Higashida R.T., Furlan A.J., Roberts H. et al., Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke, 2003; 34: e109-137.
31. Trouillas P., von Kummer R., Classification and pathogenesis of cerebral hemorrhages after thrombolysis in ischemic stroke, *Stroke*, 2006; 37: 556-61.
32. Adams H.P. Jr, Bendixen B.H., Kappelle L.J. et al., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, *Stroke*, 1993; 24: 35-41.
33. Mahoney F.I., Barthel D.W., Functional evaluation: the Barthel Index, *Md St Med. J*, 1965; 14: 61-5.
34. Knap D., Honkowicz M., Kirmes T. et al., Endovascular treatment of acute ischemic stroke – own experience, *Neurol Neurochir Pol*, 2015; 49: 81-9.
35. Zahuranec D., Majersik J.J., Percentage of acute stroke patients eligible for endovascular treatment, *Neurology*, 2012; 79(13 suppl. 1): 22-5.
36. Serles W., Gattringer T., Mutzenbach S. et al., Endovascular stroke therapy in Austria: a nationwide 1-year experience, *Eur J Neurol*, 2016; 23: 906-11.
37. Wintermark M., Sanelli P.C., Albers G.W. et al., Imaging recommendations for acute stroke and transient ischemic attack patients: a joint statement by the American Society of Neuroradiology, the American College of Radiology and the Society of NeuroInterventional Surgery, *J Am Coll Radiol*, 2013; 10: 828-32.
38. Asadi H., Williams D., Thornton J., Changing Management of Acute Ischaemic Stroke: the New Treatments and Emerging Role of Endovascular Therapy, *Curr Treat Options Neurol*, 2016; 18: 20.
39. Mak C.H., Ho J.W., Chan K.Y. et al., Intra-arterial revascularization therapy for basilar artery occlusion-a systematic review and analysis, *Neurosurg Rev*, 2016; Jan 25.
40. Rebello L.C., Haussen D.C., Belagaje S. et al., Endovascular treatment for acute ischemic stroke in the setting of anticoagulation, *Stroke*, 2015; 46: 3536-9.
41. Purrucker J.C. et al., Safety of Endovascular Thrombectomy in Patients Receiving Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants, *Stroke*, 2016; Mar 1.
42. Bonita R., Beaglehole R., Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke, *Stroke*, 1988; 19: 1497-1500.
43. Quinn T.J., Langhorne P., Stott D.J., Barthel Index for stroke trials: development, properties, and application, *Stroke*, 2011; 42: 1146-51.

Związek struktura-funkcja peptydu fuzyjnego wirusa grypy

Structure-function relationship of the influenza fusion peptide

Anna Szymaniec^{1, 2}
Remigiusz Worch²

¹Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski

²Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2012 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem pana dr. n. med. Remigiusza Worchę grant na realizację projektu badawczego pt. „Mechanizm oddziaływania peptydu fuzyjnego wirusa grypy z błonami lipidowymi”. Część eksperymentów została przeprowadzona w Laboratoriach NanoFun współfinansowanych przez projekt EFRR POIG.02.02.00-00-025/09.

Streszczenie

Wirus grypy ma otoczkę lipidową i wchodzi do komórki gospodarza poprzez mechanizm endocytozy. W proces uwolnienia materiału genetycznego zaangażowane jest grypowe białko błonowe – hemaglutynina (HA). Fuzja pomiędzy błonami wirusa i komórki gospodarza odbywa się dzięki obecności N-końcowego fragmentu podjednostki HA2 hemaglutyniny, który bezpośrednio oddziałuje z błoną i jest nazywany peptydem fuzyjnym (fusion peptide, HAfp), ponieważ jest zdolny do samodzielnego łączenia błon w formie syntetycznego fragmentu. Jego C-końcowa część zawiera trzy aminokwasy (W21-Y22-G23), które są ściśle zachowane wśród serotypów grypy typu A. Pokazano, że długość peptydu ma wpływ na jego strukturę: HAfp1-20 tworzy „bumerang” w przeciwieństwie do „spinki do włosów” tworzonej przez HAfp1-23. W celu lepszego zrozumienia roli trzech zachowanych aminokwasów badaliśmy wpływ długości peptydu na zdolności fuzyjne, dynamikę strukturalną oraz oddziaływanie z dwuwarstwą lipidową. Dzięki symulacjom dynamiki molekularnej i pomiarom spektroskopowym pokazaliśmy, że obecność trzech C-końcowych aminokwasów promuje formowanie się „spinki do włosów”. W przeciwieństwie do mniej ustrukturyzowanego HAfp1-20 „spinka” jest zorientowana prostopadle do płaszczyzny błony i powoduje powstawanie większego nieporządku w otaczających ją lipidach. Stosując nowy sposób wizualizacji fuzji oparty na mikroskopii czasów życia (FLIM) i obrazowaniu liposomów GUV (giant unilamellar vesicles), zaobserwowaliśmy, że HAfp1-23 pośredniczy fuzji efektywniej niż HAfp1-20. Ponadto zaobserwowane przez nas formowanie się nowej fazy lipidowej w błonach bogatych w cholesterol indukowane jest jedynie przez dłuższy peptyd. Redystrybucja składników płynnych błon wydaje się odgrywać istotną rolę w procesie fuzji błonowej.

Słowa kluczowe: wirus grypy • sztuczne systemy błonowe • fuzja błonowa • mikroskopia konfokalna • oddziaływanie peptyd-błona

Wpłynęło: 03-01-2017
Zaakceptowano: 20-04-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji:

dr Remigiusz Worch
Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk
al. Lotników 32/46, 02-668 Warszawa
tel.: +48 22 843 70 01
e-mail: remiwo@ifpan.edu.pl

Abstract

Influenza is an enveloped virus which enters the host cell through endocytosis-mediated mechanism. To enable the release genetic material,

a process of fusion between viral and host cell membranes occurs, which is mediated by influenza hemagglutinin (HA) protein. The N-terminal fragment of hemagglutinin HA2 subunit, directly interacting with the membrane, is named a fusion peptide (HAfp), since it is able to promote fusion also as a synthetic fragment. Its C-terminal part contains three residues (W21-Y22-G23), which are highly conserved among various serotypes of Influenza A. It has been shown that the peptide length has an influence on its structure: HAfp1-20 forms a boomerang in contrast to a tight helical hairpin formed by HAfp1-23. To gain more insight into the role of the conserved residues, we studied the effect of peptide length on fusion properties, its structural dynamics, and partitioning to the phospholipid bilayer. By means of molecular dynamics simulations and spectroscopic measurements, we showed that the presence of three C-terminal residues in HAfp1-23 promotes the formation of hairpin structure. In contrast to less structured HAfp1-20, it orients perpendicularly to the membrane plane and induces more disorder in the surrounding lipids. Using a novel fusion visualization assay based on FLIM microscopy on giant unilamellar vesicles (GUV), we observed that HAfp1-23 promotes fusion to a higher extent than HAfp1-20. Moreover, we report cholesterol-enriched domain formation exclusively by the longer fusion peptide. This redistribution of membrane components in fluid phases is likely to play a role during membrane fusion.

Keywords: influenza virus • artificial membrane systems • membrane fusion • confocal microscopy • peptide-lipid interactions

WPROWADZENIE

Wejście wirusa do komórki gospodarza

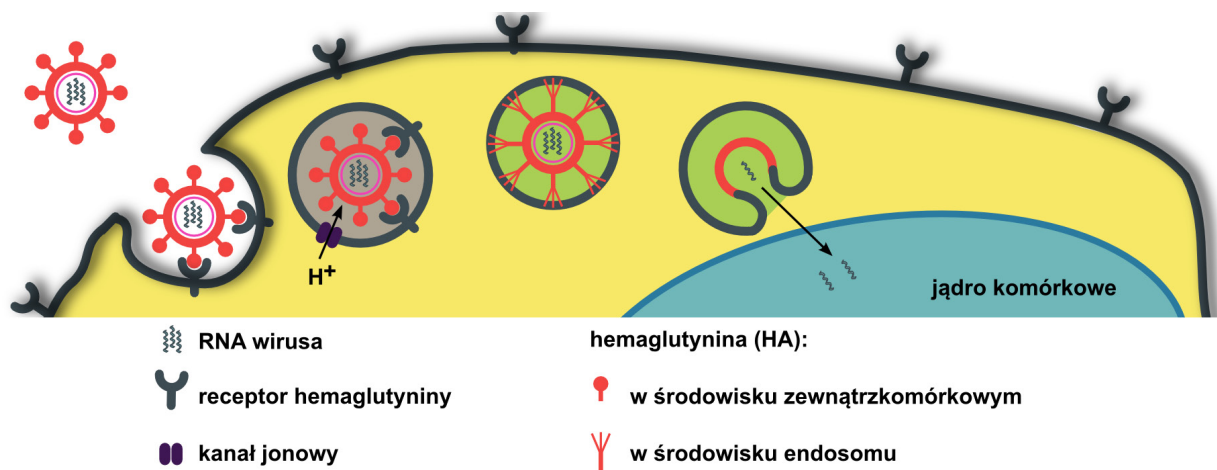
Podczas cyklu replikacyjnego wirusy muszą umieścić swój materiał genetyczny w komórce gospodarza. Dla wirusów mających otoczkę lipidową, do których zalicza się wirus grypy należący do rodziny ortomyksowirusów (*Orthomyxoviridae*), wiąże się to z koniecznością połączenia (fuzji) błon otoczki z błoną komórkową (ryc. 1). Etap ten realizowany jest za pośrednictwem tzw. wirusowych białek fuzyjnych (ang. viral fusion proteins, VFP), będących oligomerycznymi glikoproteinami z jednej strony zakotwiczonymi w błonie otoczki wirusa (ryc. 1). Pod wpływem zmian środowiskowych, takich jak np. zmiana pH w środowisku endosomu, białka te zmieniają konformację, ekspozując drugą część białka bezpośrednio kotwiczącą się w błonie komórki (ryc. 1).

W przypadku wirusa grypy rolę VFP odgrywa hemaglutynina (HA) syntetyzowana jako prekursor HA0, której cięcie proteolityczne prowadzi do powstania łańcuchów HA1 i HA2. N-końcowa część białka HA2, która bezpośrednio oddziałuje z błoną, nosi nazwę peptydu fuzyjnego (fusion peptide, fp). Więk-

szość N-końcowych aminokwasów jest dobrze zachowana wśród wyróżnianych 16 typów serologicznych wirusa grypy typu A (tab. 1).

Warto zauważyć, że o ile sekwencje wirusa typu A i B są do siebie podobne, o tyle sekwencja peptydu fuzyjnego wirusa typu C, najczęściej wywołującego lekkie infekcje u ludzi, znacznie się od nich różni. W przypadku wirusa typu A uwagę zwraca także obecność trzech C-końcowych aminokwasów W21-Y22-G23 we wszystkich serotypach. Za rozprzestrzenianie się epidemii ptasiej grypy w latach 2003-2005 odpowiedzialny był typ H5N1¹, a świńskiej grypy w 2009 roku – wiele typów z grupy A, przy czym głównie H1N1. Nie wiadomo natomiast dokładnie, jakie czynniki strukturalne wirusa grypy powodują jego zdolność do transmisji międzygatunkowej. Badania nad tymi zagadnieniami oraz nad tworzeniem wirusów hybrydowych są gorącym tematem badań oraz debat naukowców, etyków i agencji rządowych.

1. Wirus grypy typu A klasyfikowany jest również na podstawie innego białka wirusowego – neuraminidazy (NA lub N), z wyróżnieniem 9 typów (N1-N9). Typ B ma jeden typ N, natomiast typ C nie posiada neuraminidazy wcale.



Ryc. 1. Schemat zakażenia wirusem grypy. Na powierzchni komórki trimeryczna hemaglutynina (HA) wirusa łączy się z kwasem sialowym, który odgrywa rolę receptora. Wirus jest wchłaniany do wnętrza dzięki endocytozie. W kwaśnym środowisku endosomu dochodzi do zmiany konformacyjnej HA i do eksponowania peptydu fuzyjnego, który kotwiczy się w błonie endosomu. W rezultacie następuje fuzja lipidowej otoczki wirusowej i błony endosomu, co umożliwia przedostanie się RNA wirusa do jądra komórkowego. Rysunek przygotowany na podstawie [1, 2].

Struktura peptydu fuzyjnego

Badania nad peptydami fuzyjnymi wirusa grypy (HAfp) zostały rozpoczęte w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia. Wykazano m.in. zdolność do wiązania się do liposomów utworzonych z POPC niezależnie od pH, przy czym liposomy zawierające cholesterol mogły być łączone jedynie poniżej pH 6, co odpowiada środowisku endosomu [4]. Różną zdolność do łączenia liposomów zaobserwowano w funkcji długości (1-16 oraz 1-20) peptydu fuzyjnego [5]. Zależność zmian wielkości obserwowanych w spektroskopii emisyjnej od warunków środowiskowych została zbadana przez Clague i in. [6]. Prace z użyciem spektroskopii NMR wskazały na głębsze zakotwiczenie się peptydu i większą zawartość struktur helikalnych przy niższym pH [7]. Zwrócono także uwagę na zmiany konformacyjne peptydu w pH 5 i 7,4 [8].

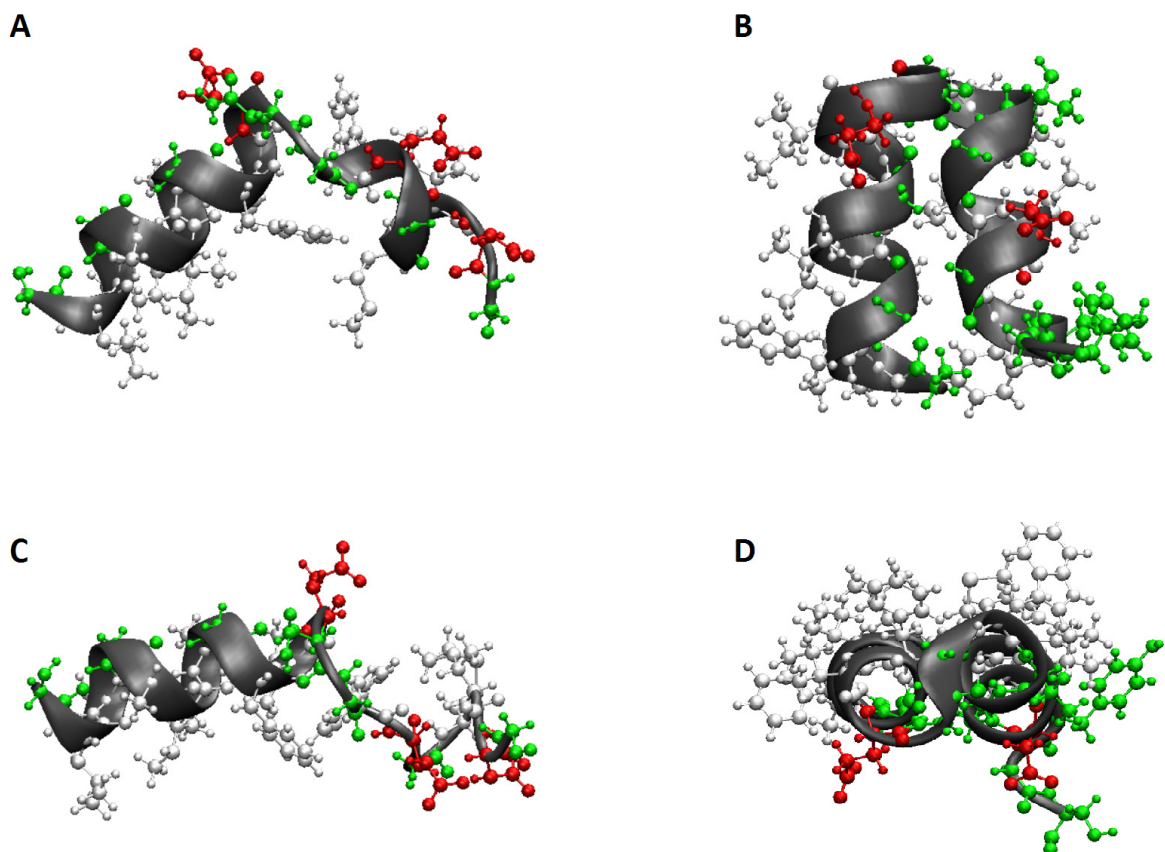
Jednakże nowe światło na, jak by się mogło wydawać, dobrze zbadany obiekt rzucają prace z ostatnich lat [9-13], w których autorzy pokazują, że peptyd fuzyjny zawierający wszystkie 23 aminokwasy w micelach z dodecylofosfatydylocholiną przyjmuje konformację typu „spinka”, utworzoną przez fragmenty Gly¹-Gly¹² oraz Trp¹⁴-Gly²³ z Gly¹³ stanowiącą bardzo krótkie zgięcie (ryc. 2).

Całość stabilizowana jest licznymi wiązaniami wodorowymi, co z pewnością ułatwia insercję peptydu do błony ze względu na niekorzystną energię insercji swobodnych grup amidowych [14]. Jak podkreślają autorzy, przez ostatnie kilkanaście lat peptydy fuzyjne wirusa grypy były najczę-

ściej badane w formie Gly¹-Gly²⁰ bez uwzględnienia ściśle zachowanych 3 ostatnich aminokwasów (Trp²¹-Tyr²²-Gly²³) (tab. 1). W wielu badaniach taki 20-aminokwasowy fragment był bezpośrednio łączony z silnie hydrofilowym fragmentem zapewniającym lepszą rozpuszczalność w środowisku wodnym. Okazuje się jednak, że konformacje peptydu oraz sposób jego funkcjonowania mogą ściśle zależeć od jego długości i formy peptydu. Uwagę również zwraca częste występowanie motywu GxxG oraz GxxxG w całej długości peptydu, przy czym ten ostatni znany jest jako czynnik często występujący w helisach transbłonowych [15]. Otwiera to na nowo problem szczegółowej charakterystyki oddziaływań peptydu fuzyjnego w różnych środowiskach. Czytelnik bardziej zainteresowany szczegółami strukturalnymi jest odsyłany do pracy przeglądowej [16].

Fuzja błonowa jako cel terapeutyczny

Proponowane badania dotyczą jednego z kluczowych etapów infekcji wirusa grypy, której leczenie mimo ogromnego postępu w rozwoju środków i szczepionek przeciwwirusowych jest nadal niesatysfakcjonujące. W samej Polsce w sezonach 2013/2014 oraz 2014/2015 liczba zachorowań i podejrzeń zachorowań na grypę przekraczała 3 mln (wg danych Państwowego Zakładu Higieny). Natomiast z powodów infekcji szczepem H5N1 na całym świecie (tzw. ptasia grypa) zmarło 355 osób z potwierdzonych 602 przypadków [17]. Podkreśla to ważność problemu i potrzebę stwarzania nowych środków farmakologicznych używanych zarówno w zapobieganiu zachorowaniom sezonowym,



Ryc. 2. (A) HAfp1-20, pH=5, konformacja „bumerangu” z fragmentem helisy 3-10 na C-końcu, utworzonej w pH fuzyjnym; (PDB ID: 1IBN) (B) HAfp1-23 pH=7,4, konformacja „spinki do włosów”, widok z boku; (PDB ID: 2KXA) (C) HAfp1-20, pH=7,4, konformacja „spinki do włosów”, widok z boku; (PDB ID: 2KXA) (D) HAfp1-23, pH=7,4, widok z boku. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy o charakterze kwasowym, zielonym – aminokwasy polarne, a białym – aminokwasy hydrofobowe.

jak i przeciw szczepom mogącym wywołać epidemię lub pandemię.

Obecnie stosowane leki przeciw wirusom grypy można podzielić na dwie grupy. Pierwsza zapobiega zakwaszeniu środowiska endosomu koniecznego do zmian konformacyjnych hemaglutyniny (ryc. 1) poprzez stosowanie pierścieniowych amin pierwszorzędowych [substancja czynna: amantadyna, preparaty zarejestrowane w Polsce: Amantix (Merz), Vigeryt K (Egis); pochodna amantadyny, rymantadyna, preparat: Rimantin (Genexo)]. Preparaty te jednak wykazują się skutecznym działaniem jedynie w pierwszych stadiach infekcji. Druga strategia polega na hamowaniu aktywności neuraminidazy, której poprawne działanie jest niezbędne do składania nowo powstałych cząsteczek wirusa w komórce gospodarza [substancja czynna: oseltamiwir, preparat: Tamiflu (Roche), oraz zanamiwir, preparat Relenza (GlaxoSmithKline Export Ltd., Wielka Brytania)]. W przypadku szczepionek (w Polsce jest zarejestrowanych łącznie osiem preparatów różnych firm) zawierających antygeny powierzchniowe i ele-

menty struktur wewnętrznych, głównie szczepów H1N1 oraz H3N2, istnieje problem ważności tylko w jednym sezonie grypowym ze względu na szybką zmienność genetyczną w obrębie całych białek wirusowych. Strategia uderzająca w mechanizm fuzji wirusa z błoną komórkową gospodarza wydaje się interesująca ze względu na bardzo niską zmienność sekwencji peptydu fuzyjnego hemaglutyniny (tab. 1). Zrozumienie molekularnych podstaw oddziaływań peptydu fuzyjnego wirusa grypy jest kluczowe w zrozumieniu początkowych etapów inwazji wirusowej oraz w projektowaniu potencjalnych strategii farmakologicznych.

Błony lipidowe i sztuczne systemy błonowe

W toku badań nad białkami błonowymi często konieczne jest zastosowanie sztucznych systemów błonowych. Błona żywej komórki oprócz lipidów zawiera liczne białka i inne elementy, co ze względu na jej stopień skomplikowania uniemożliwiłoby przygotowanie układu eksperymentalnego i wykonanie pomiarów. Przykładowym systemem błono-

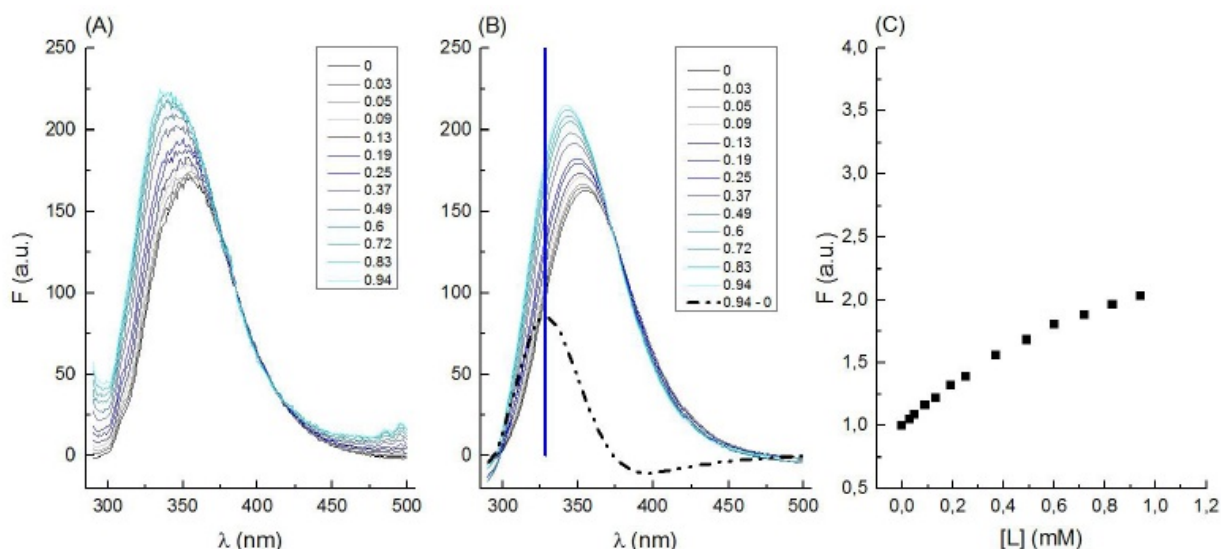
wym są jednowarstwowe pęcherzyki powszechnie używane w badaniach z powodu ich naturalnego kształtu, często występującego w systemach biologicznych w przeciwieństwie do planarnych systemów błonowych. Liposomy stosowane są również w badaniach klinicznych, gdzie wstrzykiwane pacjentom obniżają toksyczność leków, umożliwiając ich dostarczenie bezpośrednio do chorej tkanki, na przykład do guzów nowotworowych. Możliwe jest otrzymywanie liposomów różnej wielkości: od małych liposomów (small unilamellar vesicles – SUVs), poprzez duże pęcherzyki (large unilamellar vesicles – LUVs) o średnicy 50-200 nm, aż po ogromne jednowarstwowe pęcherzyki (giant unilamellar vesicles – GUVs). SUV-y składają się jedynie z kilkuset lipidów i mają średnicę nie większą niż 100 nm. Większe od nich są duże jednowarstwowe pęcherzyki LUV, które mogą przypominać wewnętrzkomórkowe pęcherzyki, takie jak lizosomy. Z powodu kształtu ich membrana jest stabilniejsza i bardziej upakowana w porównaniu z mniejszymi pęcherzykami SUV. To sprawia, że LUV-y są dobrym modelem do badań, na przykład zakłóceń wywoływanych przez lipidy lub białka. Największe pęcherzyki, GUV-y o średnicy wynoszącej około kilkudziesięciu mikrometrów, są łatwe w przygotowaniu, skład ich membrany może być ściśle kontrolowany oraz pozwalają na ich obserwację w mikroskopie optycznym [18, 19].

Jednowarstwowe liposomy GUV można otrzymać metodą elektroformacji. Polega ona na podłącze-

niu prądu zmiennego do dwóch platynowych drutów, na których powierzchni znajduje się film lipidowy. Film ten uzyskuje się poprzez nałożenie na każdy drut roztworu lipidów oraz barwnika fluorescencyjnego, którym pokrywa się druty aż do całkowitego odparowania roztworu. Aby mieć pewność, że rozpuszczalnik, czyli chloroform, całkowicie odparował, druty umieszcza się w cieplarni. Druty pokryte filmem lipidowym zanurza się w roztworze sacharozy znajdującym się w komorze teflonowej. Następnie komorę podłącza się do generatora prądu [19] (stosowano prąd o napięciu 3 V i częstotliwości 10 Hz przez 2 godziny, następnie co 30 min zmniejszano częstotliwość do 2 Hz). Tak przygotowane liposomy transferuje się do komory umożliwiającej obrazowanie, wypełnionej roztworem buforowym o takiej samej osmotyczności jak roztwór sacharozy (tu 0,3 M).

METODY BADAWCZE

Głównymi metodami badawczymi projektu były spektroskopia fluorescencyjna oraz różne techniki mikroskopii fluorescencyjnej. Spektroskopia fluorescencyjna jest potężnym narzędziem w badaniach oddziaływań białko-lipid ze względu na różne własności emisyjne tryptofanu w środowisku wodnym i niepolarnym (takim jak błona) (ryc. 3). Widma peptydu w przypadku dodawania porcji liposomów, po stosownej analizie polegającej na odjęciu tła i wygładzeniu oraz zastosowaniu poprawek na rozcieńczenie,



Ryc. 3. (A) zarejestrowane widma fluorescencji peptydu HAfp1-23 przy dodawaniu liposomów SUV utworzonych z DOPC (liczby oznaczają stężenie w μM); (B) widma po odjęciu tła i wygładzeniu, widmo różnicowe (czarna linia przerywana) oraz prosta (kolor niebieski), odpowiadająca maksymalnej różnicy między pierwszym i ostatnim widmem (w tym przypadku dla 328 nm). (C) punkty pobrane z widm odpowiadających danym stężeniom, z uwzględnieniem poprawki na objętość, znormalizowane do 1. Do tak przetworzonych danych dopasowuje się krzywą umożliwiającą wyznaczenie energii oddziaływania peptydu z błoną [20].

są przekształcane do postaci danych, do których dopasowanie krzywej pozwala na uzyskanie stałej inkorporacji [20, 21].

Wielkość ta jest miarą energii swobodnej tworzonego kompleksu, dlatego może być bezpośrednio porównywana dla różnych mutacji peptydów, składu liposomów i warunków środowiskowych (pH, siła jonowa, temperatura). Inny sposób wykorzystania tej techniki, pozwalający na stwierdzenie naruszenia ciągłości dwuwarstwy lipidowej, polega na przygotowywaniu liposomów z zamkniętą porcją barwnika fluorescencyjnego. Jego stężenie jest dobrane tak, że będąc w środku liposomu, ulega samowygaszeniu, natomiast jego fluorescencja jest wykrywalna, jeżeli jest on uwalniany na zewnątrz, np. w wyniku powstających w błonie porów. Przepływanie liposomów można badać również za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, która w wersji skaningowej i konfokalnej umożliwia wykonywanie obrazów znakowanych fluorescencyjnie struktur z rozdzielczością rzędu długości fali świetlnej. W wersji konfokalnej światło pochodzące z innych płaszczyzn niż płaszczyzna wzbudzenia jest blokowane przez aperturę kołową (ang. pinhole), co znacznie zmniejsza efekt rozmycia rejestrowanych obrazów. Na potrzeby projektu opracowano nowatorski sposób obrazowania i oceny ilościowej zachodzącej fuzji błonowej indukowanej peptydami fuzyjnymi między liposomami GUV i LUV, w których błonach są umieszczone barwniki fluorescencyjne. Między tymi barwnikami w trakcie fuzji dochodzi do rezonansowego przeniesienia energii (FRET) (ryc. 4). Efektywność zajścia zjawiska FRET była mierzona na podstawie wyznaczania czasów życia donora z wykorzystaniem techniki mikroskopowej FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) w trybie TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting). Obok technik eksperymentalnych ważną częścią projektu były symulacje dynamiki molekularnej dające komplementarny obraz zachowania się peptydów fuzyjnych i otaczających ich lipidów na poziomie pojedynczych atomów.

ZACHOWANIE SIĘ PEPTYDÓW W DWUWARSTWIE LIPIDOWEJ

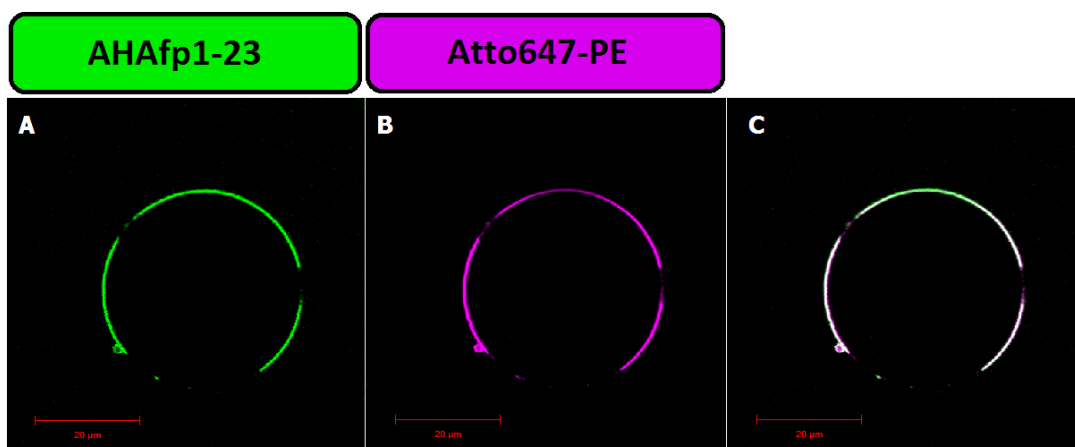
Różnice w strukturach peptydów o długościach 20 (HAfp1-20) i 23 aminokwasów (HAfp1-23) określone odpowiednio jako „bumerang” [8] oraz „spinka do włosów” [9] pozwalają na postawienie ważnego pytania dotyczącego sposobu oddziaływania N-końcowego fragmentu podjednostki HA2 hemaglutyniny. Pytanie to jest szczególnie zasad-

ne, gdy weźmiemy pod uwagę, że chętnie badane ze względu na stosunkową łatwość peptydy fuzyjne są jedynie molekułami modelowymi, na podstawie których wysnuwane są wnioski dotyczące zachodzących procesów w naturze, a więc z udziałem całych białek. Świadomi tych ograniczeń wyszliśmy z założenia, że rozszerzenie peptydu fuzyjnego o zachowane C-końcowe aminokwasy może pozwolić dostrzec nieopisywane dotychczas zjawiska. Dzięki poprowadzeniu prac w sposób równoległy: eksperymentalny i symulacyjny, doszliśmy do wniosku, że większa zdolność do fuzji błonowej jest związana z konformacją peptydu. Peptyd HAfp1-23, mający większą zdolność do fuzji błon, przyjmuje częściej konformację typu „spinka do włosów” i jest zakotwiczony głębiej w dwuwarstwie w porównaniu z peptydem HAfp1-20, częściej przyjmującym konformację otwartą („bumerang”) i lokującym się bliżej granicy błona-woda. Jednocześnie zauważono, że dla HAfp1-23 przeważa ustawienie prostopadłe (osie helikalnych ramion „spinki” są prostopadłe do płaszczyzny błony), co umożliwiłoby rozsądne „wyprowadzenie” łańcucha polipeptydowego z błony w przypadku białka o pełnej długości. Ten aspekt był podnoszony w literaturze w pracy [9]. Jednocześnie uzyskano ciekawy zestaw wyników dotyczący wpływu inkorporacji peptydów fuzyjnych do dwuwarstwy lipidowej. Zarówno pomiary czasów życia analogu lipidu C6-NBD-PE [22], jak i symulacje dynamiki molekularnej wskazują na występowanie większego nieporządku łańcuchów fosfolipidów, w przypadku kiedy wbudowywany jest peptyd HAfp1-23, w porównaniu z HAfp1-20.

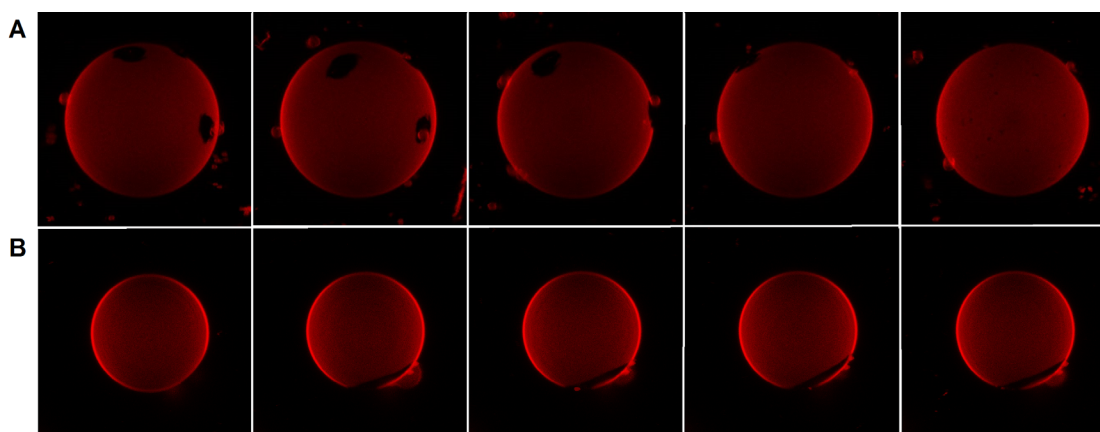
Dzięki eksperymentom z użyciem fluorescencyjnie znakowanego peptydu HAfp1-23 i obrazowaniu liposomów typu GUV utworzonych z mieszanek DOPC/sfingomielina cholesterol 2/2/1 (mol) udało się nam określić preferencję do oddziaływania peptydu z fazą lipid disordered (Ld) w porównaniu z fazą lipid ordered (Lo) (ryc. 4).

Wynik ten bardzo dobrze koresponduje z uzyskanymi wynikami dotyczącymi mniej korzystnej energii Gibbsa inkorporacji peptydów w błonach fosfolipidowych na podstawie danych spektroskopowych [23, 24]. Jednocześnie zaobserwowano ciekawe zjawisko indukcji makroskopowego ruchu domen indukowanego peptydem (ryc. 5).

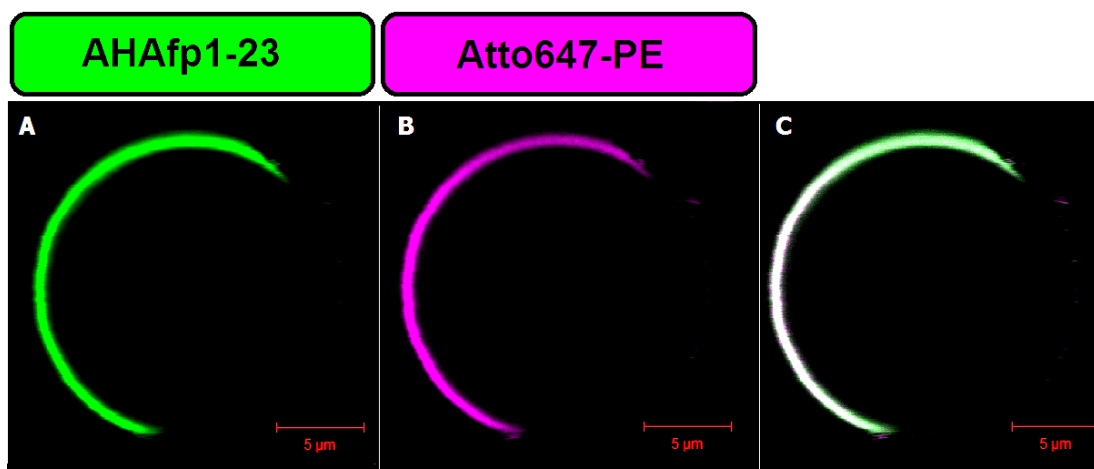
Co więcej, w przypadku peptydu HAfp1-23 zaobserwowano dotychczas nieopisywaną w literaturze dla peptydu fuzyjnego grypy zdolność do indukowania nowej fazy lipidowej w błonach zawierających cholesterol (ryc. 6).



Ryc. 4. Przykładowe liposomy GUV złożone z lipidów DOPC, cholesterolu i sfingomieliny Atto647-PE (magenta) z separacją faz Lo/Ld. Do liposomów dodano peptyd fuzyjny AHAfp1-23 z dołączonym barwnikiem Alexa fluor 488 (zielony), którego stężenie wynosiło 5 μ M. (A) zielony – detekcja dla zakresu emisji z maksimum emisji 525 nm dla barwnika Alexa fluor 488, (B) magenta – detekcja dla zakresu emisji z maksimum 669 nm dla barwnika Atto647N, (C) nałożone obrazy A i B.



Ryc. 5. Projekcja 3D (z-stack) liposomów GUV złożonych z lipidów DOPC, cholesterolu i sfingomieliny w stosunku molowym (2:1:2) z barwnikiem DOPE-Atto647-PE z separacją faz Lo/Ld. Do liposomów dodano peptyd fuzyjny HAfp1-23 (3 μ M). Na rysunku widoczna jest zmiana położenia faz lipidowych dla liposomów (A) z peptydem fuzyjnym HAfp1-23 oraz (B) bez peptydu fuzyjnego. Obraz liposomu wykonywano w odstępie 5 minut.



Ryc. 6. Liposom GUV złożony z lipidów POPC oraz cholesterolu w stosunku molowym 60:40 z barwnikiem DOPE-Atto647-PE (magenta). Do liposomu dodano mieszanke peptydów fuzyjnych AHAfp1-23 oraz HAfp1-23 (zielony) w stosunku molowym 1:1, których stężenie wynosiło 7 mM. (A) zielony – detekcja dla zakresu emisji z maksimum emisji 525 nm dla barwnika Alexa fluor 488, (B) magenta – detekcja dla zakresu emisji z maksimum 669 nm dla barwnika Atto647N, (C), (F) nałożone obrazy odpowiednio A i B.

W nowych pracach podobne zjawisko zaobserwowano dla pętli białkowej wirusa zapalenia wątroby typu C oddziałującej z błoną [25]. Zaobserwowano także zwiększone pączkowanie z obszaru granicy faz Lo/Ld, co z kolei dobrze koresponduje z faktem obserwacji miejsc fuzji w przypadku wirusa HIV [26]. Wydaje nam się, że są to zjawiska istotne w procesie fuzji, ponieważ przez wypychanie lipidów z fazy lamelarniej prowadzą do indukowania krzywizny dwuwarstwy, obniżając tym samym barierę energetyczną na proces fuzji z drugim fragmentem blisko sąsiadującej błony.

Co dała realizacja grantu Polpharma?

- Realizacja grantu przyniosła wiele nowych danych fizykochemicznych i obserwacji nowych, dotychczas niescharakteryzowanych zjawisk zachodzących z udziałem peptydów fuzyjnych. Poniżej najważniejsze spostrzeżenia.
- Charakterystyka ilościowa energetyki wiązania peptydów – mimo podobnych wartości energii swobodnej Gibbsa w pH 5 peptyd HAfp1-23 powoduje wydajniejszą fuzję błonową.
- Spadek energii swobodnej Gibbsa wiązania dla peptydów w błonach zawierających cholesterol

jest odwrotnie skorelowany ze zdolnością do fuzji.

- Badania mikroskopowe oraz symulacje dynamiki molekularnej wskazały na większe wprowadzanie nieporządku w otaczających fosfolipidach przez dłuższy peptyd.
- Peptyd w „pełnej” formie (HAfp1-23) w błonach zawierających cholesterol powoduje powstawanie nowej fazy lipidowej. Jest to zjawisko dotychczas nieopisywane dla peptydu fuzyjnego grypy.

Dalsze kierunki badań

Opracowany sposób mikroskopowej wizualizacji i oceny ilościowej fuzji pomiędzy błonami lipidowymi otwiera nowe możliwości badawcze. Dzięki temu, że używa się tu dwóch rodzajów liposomów, sposób ten w przyszłości może być wykorzystywany do oceny fuzji otoczek lipidowych całych wirionów grypy, jak również rekonstruowanej hemaglutyniny o pełnej długości w błonach o wybranym składzie. Możliwe jest także sprawdzanie substancji chemicznych działających jako potencjalne inhibitory fuzji.

PIŚMIENNICTWO

1. Alberts, Molecular biology of the cell: Garland Science, 2010.
2. Wharton, Basic virology: Blackwell Publishing, 2008.
3. Cross K.J., Langley W.A., Russell R.J., Skehel J.J., Steinhauer D.A., Composition and functions of the influenza fusion peptide, *Protein Pept Lett.*, 2009; 16: 766-78.
4. Wharton S.A., Martin S.R., Ruigrok R.W., Skehel J.J., Wiley D.C., Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin, *J Gen Virol.*, 1988; 69 (Pt 8): 1847-57.
5. Lear J.D., DeGrado W.F., Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA-2, *J Biol Chem.*, 1987; 262: 6500-5.
6. Clague M.J., Knutson J.R., Blumenthal R., Herrmann A., Interaction of influenza hemagglutinin amino-terminal peptide with phospholipid vesicles: a fluorescence study, *Biochemistry*, 1991; 30: 5491-7.
7. Hsu C.H., Wu S.H., Chang D.K., Chen C., Structural characterizations of fusion peptide analogs of influenza virus hemagglutinin. Implication of the necessity of a helix-hinge-helix motif in fusion activity, *J Biol Chem.*, 2002; 277: 22725-33.
8. Han X., Bushweller J.H., Cafiso D.S., Tamm L.K., Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin, *Nat Struct Biol.*, 2001; 8:715-20.
9. Lorieau J.L., Louis J.M., Bax A., The complete influenza hemagglutinin fusion domain adopts a tight helical hairpin arrangement at the lipid: water interface, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 11341-6.
10. Lorieau J.L., Louis J.M., Bax A., Helical hairpin structure of influenza hemagglutinin fusion peptide stabilized by charge-dipole interactions between the N-terminal amino group and the second helix, *J Am Chem Soc.*, 2011; 133: 2824-7.
11. Lorieau J.L., Louis J.M., Bax A., The impact of influenza hemagglutinin fusion peptide length and viral subtype on its structure and dynamics, *Biopolymers*, 2013; 99: 189-95.
12. Lorieau J.L., Louis J.M., Schwieters C.D., Bax A., pH-triggered, activated-state conformations of the influenza hemagglutinin fusion peptide revealed by NMR, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109: 19994-9.
13. Ghosh U., Xie L., Jia L., Liang S., Weliky D.P., Closed and Semiclosed Interhelical Structures in Membrane vs Closed and Open Structures in Detergent for the Influenza Virus Hemagglutinin Fusion Peptide and Correlation of Hydrophobic Surface Area with Fusion Catalysis, *J Am Chem Soc.*, 2015; 137: 7548-51.
14. Wimley W.C., White S.H., Experimentally determined

- hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces, *Nat Struct Biol.* 1996; 3: 842-8.
15. Senes A., Gerstein M., Engelman D.M., Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions, *J Mol Biol.*, 2000; 296: 921-36.
16. Worch R., Structural biology of the influenza virus fusion peptide, *Acta Biochim Pol.*, 2014; 61: 421-6.
17. Enserink M., Cohen J., Malakoff D., Influenza One H5N1 Paper Finally Goes to Press; Second Greenlighted, *Science*, 2012; 336: 529-30.
18. Chan Y.H., Boxer S.G., Model membrane systems and their applications, *Curr Opin Chem Biol.*, 2007; 11: 581-7.
19. Keller H., Worch R., Schwille P., Model membrane systems, *Methods Mol Biol.*, 2013; 1008: 417-38.
20. Ladokhin A.S., Jayasinghe S., White S.H., How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal Biochem*, 2000; 285: 235-45.
21. Matos P.M., Franquelim H.G., Castanho M.A., Santos NC., Quantitative assessment of peptide-lipid interactions. Ubiquitous fluorescence methodologies, *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1798: 1999-2012.
22. Stockl M.T., Herrmann A., Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1798: 1444-56.
23. Filipek A., Krupa J., Worch R., Length dependence of influenza virus fusion peptides for membrane fusion and binding, *European Biophysics Journal*, 2015; 44: 235.
24. Worch R., Krupa J., Filipek A., Szymaniec A., Setny P., Three conserved C-terminal residues of influenza fusion peptide alter its behavior at the membrane interface. *Wysłane do EMBO: J.* 2016.
25. Hanson J.M., Gettel D.L., Tabaei S.R., Jackman J., Kim M.C., Sasaki D.Y. et al., Cholesterol-Enriched Domain Formation Induced by Viral-Encoded, Membrane-Active Amphipathic Peptide. *Biophys J*, 2016; 110: 176-87.
26. Yang S.T., Kiessling V., Simmons J.A., White J.M., Tamm L.K., HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains, *Nat Chem Biol.*, 2015; 11: 424-31.

Ocena metylacji wybranych genów w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki – weryfikacja doniesień literaturowych

Evaluation of selected genes' methylation in nonfunctioning pituitary adenomas – verification of literature report

Paulina Kober¹
Mateusz Bujko¹
Krzysztof Goryca²
Maria Maksymowicz³
Jacek Kunicki⁴
Wiesław Bonicki⁴
Janusz A. Siedlecki¹

¹Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

²Zakład Genetyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

³Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

⁴Klinika Nowotworów Układu Nerwowego, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2014 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr n. med. Pauliny Kober grant na realizację projektu badawczego pt. „Identyfikacja zaburzeń metylacji DNA u chorych na nieczynne funkcjonalnie gruczolaki przysadki i ocena ich wartości prognostycznej”.

Streszczenie

Gruczolaki przysadki są jednymi z najczęstszych nowotworów śródczaszkowych. We wcześniejszych badaniach wykazano, że zaburzenia epigenetyczne, tj. nieprawidłowy wzór metylacji DNA w obrębie regionów regulatorowych określonych genów, odgrywają istotną rolę w patogenezie nieczynnych hormonalnie gruczolaków przysadki (NFPA).

W niniejszej pracy, wykorzystując dane z profilowania wzoru metylacji DNA w technologii mikromacierzy Infinium Human Methylation450 (Illumina), poddano analizie występowanie metylacji DNA w regionach regulatorowych wybranych 16 genów, w których zgodnie z opublikowanymi wcześniej wynikami często dochodzi do nieprawidłowej metylacji DNA w gruczolakach.

Oceniano różnice w poziomie metylacji DNA pomiędzy utkaniem gruczolaka i prawidłową przysadką oraz częstość występowania podwyższonej metylacji DNA poszczególnych regionów na podstawie danych eksperymentalnych dla 41 chorych oraz 6 wycinków prawidłowej tkanki.

Spośród 16 analizowanych genów w przypadku 7 potwierdzono znamienne wyższy poziom metylacji DNA w NFPA: *LGALS3*, *MMP14*, *NDRG2*, *RASSF1A*, *THBS1*, *TIMP3* i *TP73*. Wyniki naszych oznaczeń potwierdzają jednocześnie częste występowanie hipermetylacji DNA w tych genach u chorych. Największe rozbieżności między naszymi wynikami a danymi publikowanymi wcześniej dotyczą statusu metylacji genów *CDH1*, *GADD45G*, *GSTP1* oraz *P16*. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, inaczej niż dostępne dane literaturowe, że metylacja promotorów tych genów występuje jedynie w niewielkim odsetku chorych na NFPA. W opracowaniu poddano dyskusji możliwe przyczyny tych rozbieżności ze szczególnym uwzględnieniem różnic w stosowanych technikach laboratoryjnych, które w istotny sposób mogą determinować jakość i wiarygodność wyników oznaczeń metylacji DNA.

Wpłynęło: 10-03-2017
Zaakceptowano: 20-03-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji
dr n. med. Paulina Kober
Zakład Onkologii Molekularnej
i Translacyjnej, Centrum Onkologii
– Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Wawelska 15B, 02-034 Warszawa
tel.: +48 22 546 28 98
e-mail: paulina.kober@gmail.com

Słowa kluczowe: nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki
• metylacja DNA • reakcja PCR specyficzna względem metylowanej sekwencji • mikromacierz

Abstract

Pituitary adenomas are among the most common intracranial tumors. Previous studies have shown that epigenetic disorders, i.e. abnormal DNA methylation pattern within regulatory regions of specific genes play an important role in the pathogenesis of nonfunctioning pituitary adenomas (NFPA).

In this article, using data from DNA methylation profiling with Infinium HumanMethylation450 (Illumina) microarray technology, we analyzed the DNA methylation pattern in the regulatory regions of selected 16 genes, in which, according to previously published results, abnormal methylation of DNA is present in adenomas.

The differences in DNA methylation between pituitary adenoma and normal pituitary and the frequency of increased DNA methylation in individual regions were assessed based on experimental data for 41 patients and 6 normal tissue sections.

In case of 7 out of 16 analyzed genes, significantly higher levels of DNA methylation were detected in NFPA: *LGALS3*, *MMP14*, *NDRG2*, *RASSF1A*, *THBS1*, *TIMP3* and *TP73*. Our results confirm also the frequent occurrence of DNA hypermethylation in these genes in patients. The greatest discrepancies between our results and previously published data concern the methylation status of *CDH1*, *GADD45G*, *GSTP1* and *P16* genes. The obtained results show, unlike in the available literature, that the promoter methylation of these genes occurs only in a small proportion of the NFPA patients. The possible causes of these discrepancies were discussed, with particular emphasis on the differences in laboratory techniques that can determine the quality and reliability of DNA methylation assays.

Key words: nonfunctioning pituitary adenomas • DNA methylation
• methylation-specific PCR • microarray

WSTĘP

Pod względem klinicznym gruczolaki przysadki dzieli się na dwie główne grupy: guzy czynne hormonalnie, wydzielające w nadmiarze hormony i powodujące zespoły endokrynologiczne, oraz nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki (ang. nonfunctioning pituitary adenoma, NFPA). Są to łagodne nowotwory, które występują w populacji dość często [1, 2]. Nie wydzielając nadmiaru hormonów, NFPA przez pewien czas pozostają bezobjawowe. Dopiero po osiągnięciu znacznych rozmiarów zaczynają powodować wystąpienie objawów

neurologicznych, których przyczyną jest zwykle ucisk guza na sąsiadujące z nim struktury mózgu, np. skrzyżowanie nerwów wzrokowych [3, 4]. Dlatego nowotwory te są rozpoznawane dość późno, często gdy osiągają rozmiary makrogruczolaka, tj. powyżej 10 mm średnicy [3].

NFPA nadal pozostają słabo zdefiniowane pod względem molekularnym. Mimo wielu prób udało się zidentyfikować tylko nieliczne somatyczne mutacje punktowe występujące w tych nowotworach. Co więcej, okazało się, że wzór tych mutacji nie jest powtarzalny w poszczególnych przypad-

kach NFPA [5]. Poszukiwanie innych zmian molekularnych, które mogłyby mieć znaczący wpływ na patogenezę nieczynnych hormonalnie gruczolaków przysadki, przyniosło odkrycie zaburzeń epigenetycznych często obecnych w tych guzach [6, 7].

Jednym z podstawowych mechanizmów epigenetycznych jest metylacja DNA. Polega ona na przyłączeniu grupy metylowej do cytozyny w obrębie dwunukleotydu CpG. Modyfikacja ta zachodzi zwykle w miejscach genomu wyjątkowo bogatych w dwunukleotydy CpG, tzw. wyspach CpG. W klasycznym modelu metylacja DNA w obrębie promotora genu, często pokrywającego się z wyspą CpG, powoduje jego wyciszenie, natomiast brak tej modyfikacji sprzyja ekspresji genu [8].

Zaburzenia tego mechanizmu są powszechne w nowotworach. Obecność nieprawidłowej metylacji opisano na przykład w nowotworach urologicznych [9], w raku jelita grubego [10] oraz piersi [11]. Zmiany mogą polegać zarówno na obniżeniu, jak i podwyższeniu poziomu metylacji. W pierwszym przypadku może dochodzić do ogólnej hipometylacji genomu, skutkującej jego zwiększoną niestabilnością lub aktywacją ruchomych elementów genomu, a także do aktywacji genów ułatwiających rozwój nowotworu. Z kolei hipermetylacja genów, np. supresorowych, może powodować ich dezaktywację i utratę funkcji mimo braku mutacji w sekwencji DNA [12, 13].

Do tej pory opublikowano stosunkowo niewiele prac na temat zaburzeń metylacji DNA w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki. Większość dostępnych publikacji opisuje wyniki analizy metylacji DNA promotorów pojedynczych genów lub niewielkich paneli genowych. Badaniami obejmowano głównie promotory genów, których zaburzenia często są obserwowane w nowotworach i w przypadku których udokumentowany był również związek zaburzeń epigenetycznych ze zmianą ekspresji genu. Z dotychczasowych doniesień wynika, że w gruczolakach przysadki do nieprawidłowej, zwiększonej metylacji DNA dochodzi w promotorach genów, których białkowe produkty odpowiadają za procesy takie jak naprawa DNA (*MGMT*) [14], *TP73* [15], *p14(ARF)*, regulacja cyklu komórkowego (*CDKN2A* [16]), apoptoza (*DAPK*) [17], *CASP8* [15] *p14(ARF)* i inne.

W dotychczas opublikowanych pracach analiza metylacji DNA była prowadzona najczęściej przy wykorzystaniu metody łańcuchowej reakcji polimerazy specyficznej względem metylowanych sekwencji (ang. methylation-specific polymerase chain reac-

tion, MSP). Jest to dość archaiczna jakościowa metoda opracowana w połowie lat 90. XX w. [18]. Podobnie jak większość metod stosowanych do oceny profilu metylacji MSP wykorzystuje modyfikację genomowego DNA kwaśnym siarczynem sodu, pod którego wpływem niemetylowana cytozyna jest deaminowana do uracylu. Metylowana cytozyna nie ulega deaminacji, w związku z czym w wyniku modyfikacji mogą powstać dwie odmienne sekwencje w zależności od tego, jaki był wyjściowy status metylacji DNA. Modyfikowany DNA jest następnie amplifikowany przy użyciu starterów PCR zaprojektowanych tak, by umożliwiały wybiórczą amplifikację wariantu sekwencji, w której obecna była metylowana cytozyna, lub sekwencji oryginalnie niemetylowanej. Wynikiem oznaczenia jest obecność lub brak prążka na żelu agarozowym, który interpretowany jest jako obecność lub brak metylacji DNA w badanym regionie.

Wyniki z użyciem bardziej zaawansowanych technik wykorzystujących sekwencjonowanie DNA wskazują, że wzór i poziom metylacji poszczególnych miejsc CpG w preparacie genomowego DNA izolowanym z guza nowotworowego jest bardziej skomplikowany. Poszczególne miejsca CpG w danym regionie mogą w pewnym stopniu się różnić poziomem metylacji, który z kolei może generalnie przyjmować wartości od 0 do 100 proc. Wynik procentowy interpretowany jest jako frakcja alleli, w których pozycja jest metylowana. Metoda MSP zakłada więc znaczące uproszczenie. Zaznaczyć należy również, że metylacja DNA większości z opisanych genów była oceniana jedynie w pojedynczych badaniach na próbkach od chorych na NFPA. Wyniki tych badań jak dotąd nie były weryfikowane. W dużej części prac dotyczących roli zaburzeń metylacji DNA nie uwzględniono analizy wycinków przysadki prawidłowej. Publikowano jedynie wyniki dotyczące NFPA, przyjmując *a priori*, że prawidłowa tkanka charakteryzuje się brakiem metylacji danego regionu regulatorowego.

CEL PRACY

W ramach projektu pt. „Identyfikacja zaburzeń metylacji DNA u chorych na nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki i ocena ich wartości prognostycznej” finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy mieliśmy możliwość przeprowadzenia wielkoskalowej analizy metylacji DNA w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki z wykorzystaniem mikromacierzy Infinium HumanMethylation450 firmy Illumina (HM450). Technologia ta pozwala na ilościową ocenę pozio-

mu metylacji DNA w wybranych miejscach CpG w genomie, w znacznej mierze w cytozynach zlokalizowanych w regionach promotorowych genów. Celem niniejszej pracy była weryfikacja danych literaturowych, a więc statusu metylacji DNA wybranych genów badanych wcześniej metodą MSP przy wykorzystaniu danych ilościowych z eksperymentu wielkoskalowego.

Dane literaturowe oraz wyniki własne dotyczące genów analizowanych w niniejszym opracowaniu zebrano w tabeli 1.

MATERIAŁY I METODY

Do badania wykorzystano wycinki pochodzące z guzów od 35 chorych na nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki, operowanych w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie (COI). Materiał był gromadzony we współpracy z Kliniką Nowotworów Układu Nerwowego COI w latach 2008-2014. Fragmenty guzów mrożono niezwłocznie po pobraniu w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temp. -80°C do

czasu izolacji DNA. Dodatkowo wykorzystano materiał archiwalny w postaci bloczków parafinowych, który stanowiły wycinki guzów pochodzących od 6 chorych operowanych w COI w latach 2007-2011. Charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli 2. Jako materiał referencyjny wykorzystano 6 wycinków przysadek pobranych pośmiertnie w trakcie autopsji od osób zmarłych z powodów niezwiązanych z nowotworem przysadki.

DNA izolowano przy wykorzystaniu zestawu Qiaamp DNA Mini Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu. Genomowe DNA zostało poddane konwersji siarczynem sodu przy wykorzystaniu zestawu DNA EZ-96 (Zymo Research, Orange, CA, USA). Część laboratoryjna eksperymentu mikromacierzowego została wykonana przez firmę AROS Applied Biotechnology w Danii. Sondy podzielono na klasy wzorcowe i przypisano lokalizację genomową zgodnie z opisem udostępnionym przez firmę Illumina dla macierzy HumanMethylation450k. Intensywność sygnału dla sond normalizowano za pomocą pakietu BMIQ (wersja 1.3) przy użyciu domyślnych parametrów [29]. Dla każdej pozycji CpG wyznaczano wartość Beta będącą

Tabela 1. Zestawienie genów analizowanych w badaniu.

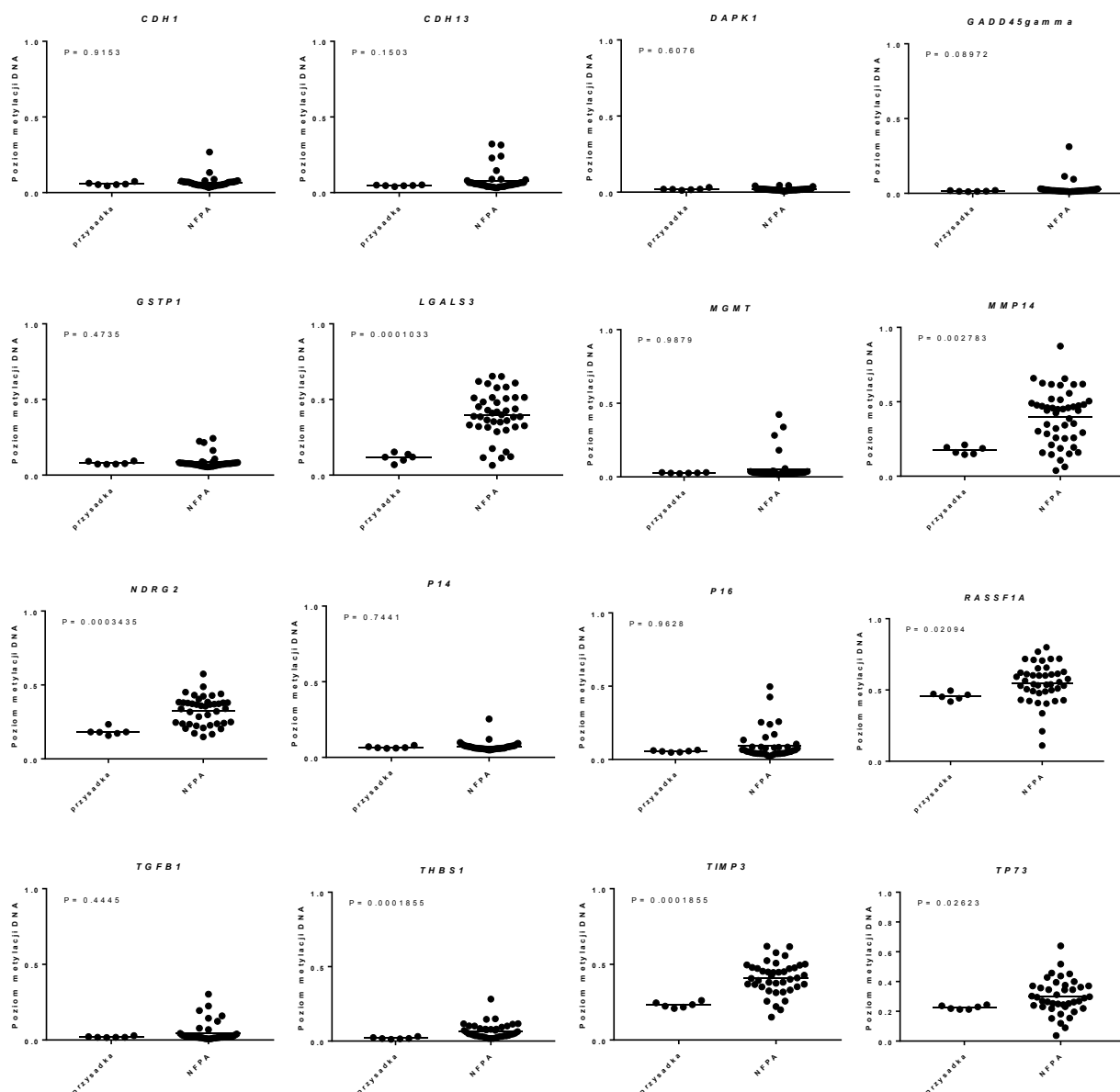
Dane literaturowe			Wyniki własne (macierze HM450)	
Gen	Częstość hipermetylacji DNA w NFPA	Liczba badanych próbek (NFPA/prawidłowa tkanka)	Uśredniony poziom metylacji DNA w NFPA versus prawidłowa tkanka	Częstość hipermetylacji DNA w NFPA
CDH1	46% [19]	24/5	6,5% vs 5,7%; $p=0,91$	5%
CDH13	29% [19]	24/5	7,8% vs 4,6%; $p=0,15$	12%
<i>CDKN2A</i> <i>P16</i>	43% [15]	23/2	9,6% vs 5,6%; $p=0,96$	<i>P16</i> – 17%
	79% [20]	19/0		
	80% [16]	10/0		
	75% [21]	24/0		
	58% [22]	19/0		
<i>P14</i>	13% [15]	23/2	7,2% vs 6,6%; $p=0,74$	<i>P14</i> – 4,8%
DAPK1	4% [15]	23/2	1,9% vs 2%; $p=0,61$	2,4%
	14% [17]	14/5		
GADD45G	53% [23]	17/3	3% vs 1,5%; $p=0,09$	2,4%
GSTP1	63,2% [24]	19/3	8,5% vs 8%; $p=0,47$	10%
LGALS3	57% [25]	7/3	39,7% vs 11,6%; $p=0,0001$	85%
MGMT	35% [14]	20/0	5,4% vs 2,7%; $p=0,99$	12%
	22% [15]	23/2		
MMP14	30% [26]	64/0	39,6% vs 17,4%; $p=0,0028$	83%
NDRG2	20,7% [27]	68/0	32,7% vs 18,5%; $p=0,0003$	66%
RASSF1	29% [28]	21/4	54,7% vs 45,8%; $p=0,0209$	49%
TGFB1	11% [26]	64/0	4,8% vs 2%; $p=0,4445$	17%
THBS1	39% [15]	23/2	6,6% vs 1,9%; $p=0,0002$	7,3%
TIMP3	13% [15]	23/2	41% vs 23,2%; $p=0,0002$	78%
TP73	26% [15]	23/2	29,8% vs 22,6%; $p=0,0262$	39%

stosunkiem intensywności świecenia sondy dla wariantu metylowanego do całkowitej intensywności świecenia sond dla danej pozycji CpG (suma intensywności świecenia sond dla metylowanego i niemetylowanego wariantu). Tak wyznaczona wartość Beta zawiera się w przedziale 0-1 i świadczy o procentowej zawartości metylocytozyny w danej pozycji, tj. o poziomie jej metylacji.

Wyboru genów, których promotory poddano analizie w niniejszej pracy, dokonano na podstawie przeglądu piśmiennictwa. Wybrano promotory genów, które były wcześniej analizowane w grupach chorych na nieczynne gruczolaki przysadki przy wykorzystaniu metody MSP (wybrane geny wraz z odnośnikami literaturowymi przedstawiono w tabeli 1).

W ramach przeglądu literatury, wykorzystując opublikowane sekwencje starterów MSP, identyfikowano regiony genomowe, których status metylacji DNA był analizowany przez poszczególnych badaczy. W analizie wykorzystano dane z sond HM450 zlokalizowanych w tych regionach genomowych dla próbek DNA z wycinków NFPA oraz wycinków prawidłowej przysadki.

Na potrzeby analizy statystycznej dla każdej próbki wyznaczano uśredniony poziom metylacji DNA w danym regionie regulatorowym określonego genu, wykorzystując wyniki dla wszystkich dostępnych sond zlokalizowanych w danym regionie. Porównywano grupę wycinków kontrolnych prawidłowej przysadki z grupą nieczynnych hormonalnie gruczolaków przysadki, wykorzystując test Manna-Whitneya. Przyjęto



Ryc. 1. Poziom metylacji DNA regionów regulatorowych analizowanych genów w prawidłowej przysadce i NFPA.

poziom istotności $\alpha=0,05$. Wykorzystano program GraphPad Prism (GraphPad Software).

Na potrzeby odniesienia pozyskanych wyników do danych literaturowych, w których raportowano odsetek próbek z nieprawidłową metylacją DNA danego regionu, próbki o podwyższonym poziomie metylacji klasyfikowano na podstawie arbitralnie przyjętego kryterium. Jako hipermetylowane klasyfikowano próbki, które w danym regionie miały poziom metylacji wyższy niż średnia wartość dla próbek kontrolnych powiększona o 10 punktów procentowych.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Analizę porównawczą przeprowadzono dla 16 wybranych regionów regulatorowych genów, które miały pokrycie w sondach macierzy HM450. W analizie danych z mikromacierzy przypadało średnio 3,8 sondy na 1 badany region (od 2 do 9 sond). W przypadku 7 genów: *LGALS3*, *MMP14*, *NDRG2*, *RASSF1A*, *THBS1*, *TIMP3* i *TP73*, stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomu metylacji DNA w gruczolakach przysadki w porównaniu z wycinkami kontrolnymi. Największą różnicę obserwowano dla genów *MMP14* (średnia 39,6% w próbkach NFPA względem 17,4% w wycinkach prawidłowej przysadki), *LGAL* (średnia 39,7% względem 11,6%), *NDRG2* (średnia 32,7% względem 18,5%) i *TIMP3* (średnia 41% względem 23,2%). W przypadku tych genów stwierdzono największy odsetek próbek o podwyższonym poziomie metylacji DNA na podstawie przyjętego kryterium. Częstość występowania hipermetylacji DNA w tych regionach była wyższa niż opisana w piśmiennictwie najprawdopodobniej ze względu na różnice metodyczne. W naszym opracowaniu próbki klasyfikowano jako hipermetylowane na podstawie wybranego arbitralnie progu odcięcia, podczas gdy w opublikowanych badaniach wynikał on z czułości stosowanej techniki laboratoryjnej. Generalnie w przypadku tych regionów nasza analiza potwierdzała występowanie zaburzeń epigenetycznych w znacznym odsetku gruczolaków i ich związek z patogenezą guzów przysadki.

W przypadku pozostałych genów nie stwierdziliśmy znacząco wyższego poziomu metylacji w wycinkach gruczolaków w porównaniu z wycinkami kontrolnymi. Mimo to w pewnym odsetku próbek NFPA obserwowaliśmy podwyższoną metylację DNA poszczególnych regionów. Częstości występowania hipermetylacji DNA promotorów *DAPK* i *TGFB1* były zbliżone do danych prezentowanych we wcześniejszych doniesieniach. Poziom metylacji DNA regionów regulatorowych analizowanych przez nas genów w prawidłowej przysadce i NFPA przedstawiono na rycinie 1.

Dla pozostałych genów nasze wyniki nie są zgodne z dotychczasowymi danymi literaturowymi. Największe rozbieżności dotyczą statusu metylacji genów *CDH1*, *GADD45G*, *GSTP1* oraz *P16*. Według danych literaturowych zaburzenia epigenetyczne tych genów występują przynajmniej u ok. połowy chorych, podczas gdy według naszych danych były one hipermetylowane u mniej niż 10% chorych (za wyjątkiem promotora *P16*, który był metylowany w 16% NFPA). Podejrzewamy, że różnice te wynikają przede wszystkim z niedoskonałości stosowanej we wcześniejszych badaniach metody analitycznej, tj. MSP.

Niektóre opublikowane prace wskazują, że MSP jest metodą podatną na wyniki fałszywie dodatnie. Mogą one wynikać z niedoskonałości sekwencji starterów [30], niepełnej konwersji DNA w reakcji z siarczynem sodu lub innych czynników, takich jak np. obecność jednonukleotydowych wariantów polimorficznych w sekwencji DNA, do której projektowany jest starter PCR [31].

Jednym z najlepiej opisanych biomarkerów epigenetycznych jest hipermetylacja promotora *MGMT*, gdyż jest ona czynnikiem rokowniczym u chorych na glejaka wielopostaciowego. Hipermetylacja *MGMT* opisywana jest jako marker odpowiedzi na leczenie temozolomidem w tej grupie chorych.

W większości opublikowanych prac dotyczących glejaków status metylacji *MGMT* był oceniany przy wykorzystaniu MSP. Najczęściej obserwowano tę zmianę u ok. 40% chorych na glejaka, przy czym można zauważyć istotne rozbieżności pomiędzy publikacjami, tj. wyniki, według których zaburzenia metylacji *MGMT* występują u 25% [32], jak również u 68% [33] chorych na glejaki. W publikowanym niedawno opracowaniu doświadczeń kilkuletniej praktyki w oznaczaniu *MGMT* do celów diagnostycznych przedstawiono dane na temat rozbieżności wyników testu MSP dla próbek, które były analizowane rutynowo w dwóch powtórzeniach. Niepowtarzalne wyniki MSP obserwowano w przypadku 12% badanych próbek [34]. W dyskusji tej pracy przyczyn niepowtarzalności wyników doszukiwano się głównie w szczegółach technicznych, co obrazuje niedoskonałości metody MSP.

W badaniach dotyczących gruczolaków przysadki częstość występowania hipermetylacji promotora *MGMT* obserwowano u 22% i nawet 35% [14, 15]. Doniesienia te sugerowały, że analogicznie jak u chorych na glejaka status *MGMT* mógłby być czynnikiem predykcyjnym przy leczeniu temozolomidem, zwłaszcza że we wstępnym badaniu dotyczącym leczenia gruczolaków przysadki

Tab. 2. Charakterystyka chorych.

	Liczba
Pacjenci ogółem	41
Płeć	
kobiety	15
mężczyźni	26
Wiek (lata)	
zakres	36-85
mediana	59
Rozpoznanie patomorfologiczne	
gonadotropowy	36
<i>null cell adenoma</i>	2
wielohormonalny	2
niemy kortykotropowy	1
Inwazyjność	
tak	19
nie	15
brak danych	7

z wykorzystaniem temozolomidu powiązano lepszą odpowiedź na chemioterapię z niższym poziomem białka MGMT [35]. W naszej analizie hipermetylację *MGMT*, wbrew wcześniejszym doniesieniom, stwierdziliśmy jedynie u 5 chorych na NFPA.

Należy zaznaczyć, że wykorzystana w niniejszej pracy technologia mikromacierzy ma swoje ograniczenia. Podstawowym z nich jest fakt, że metoda ta pozwala na ocenę jedynie wybranych, poszczególnych pozycji CpG – tych, dla których zaprojektowano sondy na macierzy. Nie jest zatem możliwa ocena metylacji DNA wszystkich miejsc, w których może dochodzić do metylacji cytozyny w badanym regionie. Dla niektórych wybranych przez nas regionów macierze HM450 (Illumina) mają dość gęste pokrycie, 7 lub 9 sond w wybranym regionie długości ok. 200 pz. (geny *RASSF1A*, *NDRG1* i *CDH13*). Dla niektórych

analizowanych regionów mieliśmy dane dla mniejszej liczby sond. Najmniej, tylko 2 sondy, znajdowały się w analizowanych regionach *P14* i *P16* (gen *CDK-N2A*). W niniejszym opracowaniu konsekwentnie wykorzystywaliśmy dane mikromacierzowe jedynie dla sekwencji CpG w regionach, w których metylacja DNA była wcześniej oceniana przez innych badaczy.

Porównując nasze wyniki z wcześniej opublikowanymi wynikami innych autorów, należy zaznaczyć, że większość poprzednich badań obejmowała mniej liczne grupy chorych niż badana przez nas grupa pacjentów (tab. 1). Większość publikacji, na które się powołujemy w niniejszym opracowaniu, opierała się na analizie ok. 20 chorych na NFPA. Wydaje się, że obok różnic w stosowanych technikach badawczych mała liczba chorych uwzględnionych w poprzednich badaniach może również częściowo tłumaczyć rozbieżności pomiędzy naszymi wynikami i danymi literaturowymi, co obserwowaliśmy w przypadku części badanych regionów.

WNIOSKI

1. W grupie 41 chorych z NFPA występowało częste podwyższenie poziomu metylacji DNA w regionach regulatorowych genów *LGALS3*, *MMP14*, *NDRG2*, *RASSF1A*, *THBS1*, *TIMP1* i *TP73*. Stwierdzono rzadkie występowanie hipermetylacji DNA w pozostałych badanych genach.
2. Występowanie zaburzeń epigenetycznych w znacznym odsetku NFPA może wskazywać na ich związek z patogenezą gruczolaków przysadki.
3. Zastosowane metody badawcze mogą mieć istotny wpływ na uzyskiwane wyniki badań molekularnych i wymagają ich właściwego doboru.

PIŚMIENICTWO

1. Greenman Y., Stern N. A., Non-functioning pituitary adenomas, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009; 23: 625-638.
2. Ezzat S. *et al.*, The prevalence of pituitary adenomas: A systematic review, *Cancer*, 2004; 101: 613-619.
3. Cury M.L.C.D.A.R. *et al.*, Non-functioning pituitary adenomas: clinical feature, laboratorial and imaging assessment, therapeutic management and outcome, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 2009; 53: 31-9.
4. Arafah B.M., Prunty D., Ybarra J., Hlavin M.L., Selman, W.R., The dominant role of increased intrasellar pressure in the pathogenesis of hypopituitarism, hyperprolactinemia, and headaches in patients with pituitary adenomas, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000; 85: 1789-1793.
5. Newey P.J. *et al.*, Whole-exome sequencing studies of non-functioning pituitary adenomas, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013; 98: E796-800.
6. Farrell, W.E., Clayton R.N., Epigenetic change in pituitary tumorigenesis, *Endocr. Relat. Cancer*, 2003; 10: 323-330.
7. Ling C. *et al.*, A pilot genome-scale profiling of DNA methylation in sporadic pituitary macroadenomas: association with tumor invasion and histopathological subtype, *PLoS One*, 2014; 9: e96178.
8. Bird A.P., CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature*, 1986.

9. Wu P., Cao Z., Wu S., New Progress of Epigenetic Biomarkers in Urological Cancer, *Dis. Markers*, 2016.
10. Sameer A.S., Nissar S., Epigenetics in diagnosis of colorectal cancer, *Mol. Biol. Res. Commun.*, 2016; 5: 49-57.
11. Györfy B. *et al.*, Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes, *Int. J. Cancer*, 2016; 138: 87-97.
12. Esteller M., Epigenetics in Cancer, *N. Engl. J. Med.*, 2008; 1-12.
13. Sandoval J., Esteller M., Cancer epigenomics: Beyond genomics, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2012; 22: 50-55.
14. Arya S. *et al.*, Implications of MGMT methylation status in pituitary adenoma, *Pathol. – Res. Pract.*, 2014; 210: 407-411.
15. Bello M.J., De Campos J.M., Isla A., Casartelli C., Rey J.A., Promoter CpG methylation of multiple genes in pituitary adenomas: Frequent involvement of Caspase-8, *Oncol. Rep.* 2006; 15: 443-448.
16. Jaffrain-Rea M.L. *et al.*, p16 (INK4a, MTS-1) gene polymorphism and methylation status in human pituitary tumours, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1999; 51: 317-325.
17. Simpson D.J., Clayton R.N., Farrell W.E., Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion, *Oncogene*, 2002; 21: 1217-1224.
18. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996; 93: 9821-9826.
19. Qian Z.R. *et al.*, Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas, *Mod. Pathol.*, 2007; 20: 1269-1277.
20. Seemann N. *et al.*, CDKN2A/p 16 inactivation is related to pituitary adenoma type and size, *J. Pathol.*, 2001; 193: 491-497.
21. Ogino A. *et al.*, The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2005; 64: 398-403.
22. Yoshino A. *et al.*, Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas, *J. Neurooncol.*, 2007; 83: 153-162.
23. Bahar A., Bicknell J.E., Simpson D.J., Clayton R.N., Farrell W.E., Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45gamma, in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation, *Oncogene*, 2004; 23: 936-944.
24. Yuan Y. *et al.*, Reduction of GSTP1 expression by DNA methylation correlates with clinicopathological features in pituitary adenomas, *Mod. Pathol.*, 2008; 21: 856-865.
25. Ruebel K.H. *et al.*, Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors, *Cancer Res.*, 2005; 65: 1136-1140.
26. Ruskyte K. *et al.*, MMP-14 and TGFβ-1 methylation in pituitary adenomas, *Oncol. Lett.*, 2016; 3013-3017, doi:10.3892/ol.2016.4919.
27. Vaitkiene P., Valiulyte I., Glebauskienė B., Liutkeviciene R., N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) promoter methylation and expression in pituitary adenoma, *Diagn. Pathol.*, 2017; 12: 33.
28. Qian Z.R. *et al.*, Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas, *Lab. Invest.*, 2005; 85: 464-473.
29. Teschendorff A.E. *et al.*, A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data, *Bioinformatics*, 2013; 29: 189-196.
30. Aggerholm A., Hokland P., Guldberg, P., DAP-kinase CpG island methylation in acute myeloid leukemia: methodology versus biology?, *Blood*, 2000; 95: 2997-2998.
31. Hussain Askree S. *et al.*, Allelic dropout can cause false-positive results for prader-willi and Angelman syndrome testing, *J. Mol. Diagnostics*, 2011; 13: 108-112.
32. Hassler M. *et al.*, Diversity of cytogenetic and pathohistologic profiles in glioblastoma, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2006; 166: 46-55.
33. Blanc J.L. *et al.*, Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas, *J. Neurooncol.*, 2004; 68: 275-283.
34. Xia D., Reardon D.A., Bruce J.L., Lindeman N.I., The Clinical Implications of Inconsistently Methylated Results from Glioblastoma MGMT Testing by Replicate Methylation-Specific PCR, *J. Mol. Diagnostics*, 2016; 18: 864-871.
35. Bengtsson D. *et al.*, Long-term outcome and MGMT as a predictive marker in 24 patients with atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas given treatment with temozolomide, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015; 100: 1689-1698.

Rola mikroRNA w mechanizmach oporności niedrobnokomórkowego raka płuca na inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR oraz perspektywy klinicznego wykorzystania tego zjawiska

The role of microRNA in the molecular mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment in NSCLC and the current perspective on its clinical applications

Adam Szpechciński
Mateusz Florczuk

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Praca powstała w ramach projektu badawczego prowadzonego pod kierunkiem dr. n. med Adama Szpechcińskiego w Zakładzie Genetyki i Immunologii Klinicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, finansowanego z grantu udzielonego przez Naukową Fundację Polpharmy w 2015 roku.

Streszczenie

Niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) jest główną przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania i próby wdrożenia nowych metod leczenia tej choroby. Trwają również badania nad skuteczniejszym wykorzystaniem nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej, które umożliwią identyfikację określonych cech genetycznych i epigenetycznych nowotworu (biomarkerów predykcyjnych) i pozwolą dobrać najefektywniejsze metody leczenia dla konkretnego chorego (terapia spersonalizowana). Najpowszechniej stosowaną postacią terapii spersonalizowanej NDRP jest leczenie ukierunkowane molekularnie z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (IKT EGFR). Korzystna odpowiedź na leczenie IKT EGFR jest uzależniona od obecności somatycznych mutacji w genie EGFR. Największym ograniczeniem stosowania IKT EGFR w terapii spersonalizowanej NDRP jest oporność na te leki nabywana przez chorych w trakcie leczenia.

miRNA (mikroRNA) to klasa niekodujących RNA o stosunkowo małych cząsteczkach (od 19 do 22 nukleotydów), które funkcjonują w komórce jako epigenetyczne regulatory ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Oddziaływanie miRNA na transkrypty genów biorących udział w różnych procesach komórkowych obejmuje szeroki zakres aktywności: począwszy od kontroli różnicowania i wzrostu komórek, poprzez naprawę DNA, po kierowanie komórki na drogę apoptozy. Liczne badania potwierdziły zaangażowanie miRNA w procesy nowotworowe związane z rozwojem NDRP. W procesie kancerogenezy pewne miRNA mogą pełnić funkcję onkogenną, a inne onkosupresorową. Poznanie epigenetycznych mechanizmów regulujących zjawiska wrażliwości i oporności komórek NDRP na IKT EGFR może się okazać przełomem w terapii spersonalizowanej tego typu nowotworu. Z klinicznego punktu widzenia podwójna rola miRNA w rozwoju nowotworu może mieć decydujący wpływ na skuteczność terapii ukierunkowanych molekularnie. Ponadto stabilne postaci nowotworo-

Wpłynęło: 28-04-2017
Zaakceptowano: 30-05-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji:
dr Adam Szpechciński
Zakład Genetyki i Immunologii
Klinicznej, Instytut Gruźlicy
i Chorób Płuc
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel.: +48 22 431 21 05
e-mail: a.szpechcinski@igichp.edu.pl

wego miRNA wykrywa się nie tylko bezpośrednio w tkance guza, ale również w płynach ustrojowych chorego, zwłaszcza we krwi obwodowej, co stwarza dodatkowe możliwości bezinwazyjnego diagnozowania i monitorowania efektywności leczenia w czasie.

Słowa kluczowe: miRNA • niedrobnokomórkowy rak płuca • biomarkery • terapia ukierunkowana molekularnie • inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR • oporność lekowa

Abstract

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of death from cancer over the world. Currently, a large number of research studies are conducted to develop and implement new treatment strategies. Intensive efforts are also made to improve robustness of modern molecular diagnostics to identify more precisely specific genetic and epigenetic cancer features (predictive biomarkers) and adjust the most effective treatment options for individual patient (personalized therapy). So called targeted therapy based on using epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKI) is nowadays the most widely chosen form of personalized treatment in advanced NSCLC. Favorable response to treatment with EGFR TKIs depends on the presence of somatic mutations in *EGFR* gene, detectable in lung cancer tissue. The resistance to EGFR TKIs acquired by most patients during treatment is the main obstacle to overcome in NSCLC targeted therapy.

miRNAs (microRNAs) are small, non-coding RNA molecules that play a key role in the regulation of basic cellular processes, including differentiation, proliferation and apoptosis, by controlling gene expression at the post-transcriptional level. Deregulation of miRNA activity results in the loss of homeostasis and the development of a number of pathologies, including lung cancer. During lung carcinogenesis, miRNAs exhibit dual regulatory function: they act as oncogenes or as tumour suppressors. Better understanding of epigenetic mechanisms regulating either the sensitivity or the resistance of NSCLC cells to EGFR TKIs, through activity of miRNAs, may become a breakthrough in targeted therapy of lung cancer. The dual regulatory role of miRNA in cancer might drive the further development of personalised therapies in NSCLC. Furthermore, stable forms of tumour-related miRNAs are detectable in the peripheral blood of patients with NSCLC that offers the potential benefits of using extracellular miRNAs as part of the diagnostic evaluation of cancer.

Keywords: miRNA • non-small cell lung cancer • biomarkers • targeted therapy • EGFR tyrosine kinase inhibitors • drug resistance

WPROWADZENIE

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów na choroby nowotworowe na świecie (1,59 mln przypadków śmiertelnych w 2012 roku) [1]. W Polsce jest najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i drugim, po raku piersi, u kobiet. W 2013 roku w Pol-

sce liczba zachorowań na nowotwory złośliwe płuc wynosiła blisko 21 tys. przypadków, a zgonów nieco ponad 22 tys. (16 tys. mężczyzn i 6,5 tys. kobiet) [2]. Tak wysoka śmiertelność wynika z tego, że większość chorych jest diagnozowana w zaawansowanym stadium choroby, kiedy możliwość zastosowania skutecznego leczenia chirurgicznego jest ograniczona.

Mutacje oporności				
			T790 (3-5%) D770_N771 (ins NPG) D770_N771 (ins SVQ) D770_N771 (ins G) N771T V769L D761Y S768I	
	D761Y			
Mutacje aktywujące	<1%		5%	
	Ekson 18	Ekson 19	Ekson 20	Ekson 21
	5%	45-50%	<1%	40-45%
	G719X (3-4%) V689M N709K/Q S720P	ΔE746-A750 ΔE746-T751 ΔE746-A750 (ins RP) ΔE746-T751 (ins A/I) ΔE746-T751 (ins VA) ΔE746-S752 (ins A/V) ΔL747-E749 (A750P) ΔL747-A750 (ins P) ΔL747-T751 ΔL747-T751 (ins P/S) ΔL747-S752 ΔL747-752 (E746V) ΔL747-752 (P753S) ΔL747-P752 (ins Q) ΔL747-P753 ΔL747-P753 (ins S) ΔS747-I759	V765A T783A	L858R (40-45%) L861X (2%) N826S A839T K846R G863D

Rycina 1. Najważniejsze z klinicznego punktu widzenia mutacje genu EGFR zlokalizowane w eksonach 18-21. Najwyższą częstość (proc.) występowania wśród chorych na NDRP prezentują delecje w obrębie eksonu 19. i mutacje punktowe w eksonie 21. genu [6].

Brak również satysfakcjonującej efektywności standardowej chemioterapii i radioterapii.

Niedrobnokomórkowy rak płuca jest trudnym celem diagnostycznym, zarówno ze względu na znaczące zróżnicowanie klonów komórek nowotworowych w guzie, jak i na utrudniony dostęp do dobrego jakościowo, informatywnego materiału diagnostycznego [3]. W miarę rozwoju nowotworu zmienia się również profil markerów molekularnych [4]. Obecnie prowadzone są intensywne poszukiwania i próby wdrożenia nowych metod leczenia NDRP. Badania te opierają się głównie na identyfikacji potencjalnych markerów predykcyjnych nowotworu, jak również na typowaniu najodpowiedniejszej i najskuteczniejszej metody leczenia (rozwój terapii personalizowanej). Należy podkreślić, że analiza profilu zmian epi-/genetycznych w NDRP może dać wskazówki istotne nie tylko z perspektywy doboru najskuteczniejszych leków i efektywności prowadzonej terapii, ale również minimalizacji skutków ubocznych wynikających z nieuzasadnionego klinicznie zastosowania leku. Scharakteryzowanie zaburzeń molekularnych towarzyszących kolejnym stadiom rozwoju NDRP, mających jedno-

cześnie walor markera diagnostycznego, prognostycznego lub predykcyjnego, wciąż nastrocza wielu trudności mimo intensywnych poszukiwań prowadzonych przez wiele ośrodków na całym świecie. W przypadku leków ukierunkowanych molekularnie konieczność oznaczania molekularnych czynników predykcyjnych wpisana jest niemal w ich definicję.

LECZENIE UKIERUNKOWANE MOLEKULARNIE

Koncepcja personalizowanej terapii NDRP zakłada dobór optymalnego leczenia dla konkretnych grup pacjentów opierający się na zrozumieniu różnic w przebiegu procesu nowotworowego na poziomie molekularnym między osobami chorującymi na tę samą chorobę. Medycyna personalizowana wymaga zintegrowanego podejścia klinicznego, łączącego precyzyjne diagnozowanie choroby na poziomie molekularnym i terapię z użyciem selektywnych leków, działających specyficznie na komórki nowotworowe obciążone konkretną zmianą genetyczną. Obecnie najpowszechniej stosowaną formą personalizowanej terapii NDRP jest leczenie ukierunkowane moleku-

larnie (ang. *targeted therapy*, terapia celowana) z zastosowaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT), które w odróżnieniu od standardowej chemioterapii wybiórczo hamują wzrost komórek nowotworu poprzez swoiste oddziaływanie na domenę wewnątrzkomórkową receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) [5].

Szlak sygnałowy EGFR jest istotnym elementem w powstawaniu i progresji wielu chorób nowotworowych. Aktywacja EGFR poprzez przyłączenie swojego liganda lub mutację genu promuje proliferację i migrację komórek nowotworowych, zwiększając ich inwazyjny potencjał, oraz hamuje sygnały apoptotyczne [6].

W leczeniu NDRP korzystna odpowiedź na IKT EGFR warunkowana jest obecnością somatycznych mutacji w genie *EGFR* [7, 8]. Obecność mutacji aktywujących związana jest ze zwiększonym powinowactwem receptora do cząsteczki inhibitora i indukcją wzmożonej apoptozy komórek guza w odpowiedzi na terapię IKT. Mutacje aktywujące występują w obrębie eksonów 18-21 genu *EGFR* kodujących domenę kinazową receptora i powodują jego konstytutywną aktywację. Zidentyfikowano ponad 188 różnych mutacji *EGFR*, lecz u 85 proc. chorych na NDRP, którzy odpowiadają na leczenie IKT EGFR, wykrywa się 2 najczęstsze typy mutacji: niewielkie delecje w obrębie eksonu 19. (45-50 proc.) oraz mutację punktową L858R w eksonie 21. (40-45 proc.; rycina 1) [6]. Mutacje w genie *EGFR* dotyczą głównie chorych na raka gruczołowego płuca, niepalących, nieznacznie częściej kobiet i osób po 65. roku życia [9-11]. Mutacje występują też znacznie częściej u chorych rasy azjatyckiej (40 proc.) niż kaukaskiej (10 proc., z czego 3-25 proc. w populacji amerykańskiej, a 10-24 proc. w populacji południowoeuropejskiej).

Inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR

Standardem klinicznym w personalizowanym leczeniu chorych z miejscowo zaawansowanym lub rozsiazanym NDRP jest terapia ukierunkowana molekularnie z użyciem IKT wiążących EGFR w sposób odwracalny (erlotynib i gefitynib) bądź nieodwracalny (afatynib, ozymertynib) [12, 13]. Inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR pierwszej generacji są związkami o małej masie cząsteczkowej, które odwracalnie, lecz selektywnie wiążą się z wewnątrzkomórkową domeną EGFR o aktywności kinazy tyrozynowej, zapobiegając fosforylacji tyrozyny i aktywacji szlaku przekazu sygnału. Prowadzi to do zahamowania przekazywania sygnału komórkowego szlakami kinazy serynowo-treoninowej (AKT), aktywowanej mitogenem kinazy białkowej (MAPK), czynników

transkrypcyjnych (STAT), zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1 oraz nasilenia apoptozy [14].

Nieodwracalne inhibitory EGFR różnią się chemicznie od odwracalnych, przez co formują kowalentne połączenie z wewnątrzkomórkową domeną receptora EGF. W związku z tym przełamanie działania hamującego receptor możliwe jest tylko na drodze syntezy nowych białek. Afatynib, inhibitor drugiej generacji, oprócz zmutowanego EGFR hamuje równocześnie inne receptory, o których wiadomo, że odgrywają kluczową rolę we wzroście i rozprzestrzenianiu się najbardziej rozpowszechnionych nowotworów, np. HER2, lub też wszystkie receptory z rodziny ErbB (tzw. inhibitor pan-ErbB) [15]. Obserwacje modeli komórkowych *in vitro* oraz przedklinicznych modeli zwierzęcych poddawanych działaniu afatynibu sugerują potencjalną skuteczność tego inhibitora w blokowaniu ścieżki sygnałowej pochodzącej od EGFR z mutacją T790M [16]. Wyniki wczesnych faz badań klinicznych z zastosowaniem kombinacji afatynibu i cetuksymabu (monoklonalne przeciwciało blokujące EGFR) również wskazują na możliwość przełamania nabytej oporności na IKT EGFR u chorych leczonych wcześniej erlotynibem lub gefitynibem, choć podwójna blokada EGFR znacząco nasila działania niepożądane i toksyczność leków [17].

Ozymertynib jest nieodwracalnym inhibitorem najnowszej generacji, który wykazuje wysokie powinowactwo do EGFR zawierającego zarówno mutacje aktywujące, jak i mutację oporności T790M [18]. Ozymertynib jest metabolizowany w organizmie do co najmniej 2 krążących metabolitów, z których każdy nadal wykazuje aktywność wobec zmutowanego EGFR [19]. Ozymertynib był dotychczas badany wyłącznie jako lek drugiej linii u pacjentów z mutacją T790M, którzy byli wcześniej leczeni inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR [18]. Można oczekiwać, że będzie on również skuteczny u pacjentów z pierwotną mutacją T790M, którzy nie otrzymywali wcześniej IKT EGFR [20].

Mechanizmy pierwotnej i nabytej oporności na IKT EGFR

Największym ograniczeniem stosowania IKT EGFR jest oporność na te leki. Może ona mieć charakter pierwotny, warunkowany głównie przez tzw. mutacje oporności od początku obecne w komórkach guza i równolegle do mutacji aktywujących, albo charakter nabyty, kiedy mutacje oporności i inne zmiany epi-/genetyczne rozwijają się w trakcie terapii IKT EGFR (tabela 1) [21, 22]. Szacuje się, że u 30 proc. chorych mechanizmy nabytej oporności na IKT EGFR są wciąż nieznane [23]. Niemal wszy-

Tabela 1. Mechanizmy pierwotnej i nabytej oporności na IKT EGFR u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Podano częstość występowania danego zjawiska oszacowaną na podstawie badań klinicznych z udziałem chorych na NDRP oraz leki z grupy IKT EGFR, których związek z danym typem oporności jest najlepiej udokumentowany.

Mechanizm	Częstość występowania		Leczenie IKT EGFR	Cytacja
	Oporność pierwotna	Oporność nabyta		
Mutacje oporności w genie EGFR				
T790M	3-5%	50%	gefitynib, erlotynib, afatynib	[24-26]
D761Y, L747S, T854A	<1%	<5%	gefitynib, erlotynib	[6, 27]
C797S		20-40%	ozymertynib	[28]
Zmiany w szlaku sygnałowym MAPK/ERK				
Mutacja w 2. eksonie genu KRAS	20-30%			[29]
Mutacje genu BRAF	7%	1%		[30]
Oboczne ścieżki sygnałowe				
Amplifikacja MET	4%	20%	gefitynib, erlotynib	[27, 31]
Nadekspresja HGF	30%	60%	gefitynib, erlotynib, afatynib	[32, 33]
Amplifikacja HER2	2%	12%		[34]
Mutacje w genie PIK3CA	2-3%	5%	gefitynib, erlotynib	[35, 36]
Utrata PTEN (brak ekspresji białka)	bardzo rzadko	bardzo rzadko	gefitynib, erlotynib, ozymertynib	[37]
Nadekspresja IGF-R1	42%*	in vitro	gefitynib, erlotynib, afatynib	[38]
Fuzja genów EML4-ALK	2-7%			[39]
Zmiany fenotypowe				
Transformacja NDRP do raka drobnokomórkowego	<1%	3-14%	gefitynib, erlotynib	[25, 35]
Przemiana nabłonka w mezenchymę (EMT)	<1	20-44%	gefitynib, erlotynib	[40, 41]
Inne, dotąd niepoznane mechanizmy oporności		30%		[39]

*W grupie chorych na NDRP z potwierdzoną mutacją genu EGFR.

scy chorzy na NDRP, którzy początkowo wykazują korzystną odpowiedź na IKT EGFR, z czasem nabywają oporność na te leki, zwykle między 9. a 12. miesiącem leczenia. Zrozumienie mechanizmów oporności nabywanej przez chorych w trakcie pierwszej linii leczenia IKT EGFR (erlotynib, gefitynib, afatynib) ma szczególne znaczenie dla wyboru późniejszej strategii terapeutycznej.

Guz pierwotny płuca jest tworem genetycznie heterogennym. Oznacza to, że możliwe jest współistnienie klonów komórek nowotworowych z mutacją aktywującą EGFR i z natywną formą genu (*wild-type*), a nawet komórek wrażliwych i opornych na leczenie IKT EGFR. Prowadzenie terapii ukierunkowanej molekularnie powoduje eliminację klonu wrażliwego i selekcję komórek bez mutacji aktywujących lub mutacji warunkujących oporność, co klinicznie daje obraz częściowej remisji/wznowy lub ograniczonej

odpowiedzi na leczenie – w zależności od udziału odsetkowego poszczególnych populacji komórkowych w guzie.

Obecnie określenie momentu nabycia oporności na IKT EGFR w trakcie leczenia jest w praktyce klinicznej bardzo trudne z uwagi na to, że ponowna operacja i/lub biopsja w celu pobrania materiału tkankowego do analizy molekularnej jest niemożliwa do przeprowadzenia u większości pacjentów. W tym przypadku analiza krwi obwodowej chorego zawierającej pozakomórkowy materiał genetyczny pochodzący z komórek guza mogłaby umożliwić śledzenie rozwoju choroby w czasie i monitorowanie przebiegu leczenia [42]. Uważa się, że miRNA, ogrywające kluczową rolę w mechanizmach nowotworzenia, mogłyby stanowić nową klasę epigenetycznych biomarkerów, pomocnych w ocenie statusu choroby i skuteczności leczenia.

miRNA

miRNA (microRNA) to klasa niekodujących, endogennych i jednoniciowych RNA o stosunkowo małych cząsteczkach o długości 19-22 nukleotydów. miRNA funkcjonują jako regulatory ekspresji genów zarówno w komórkach roślin, jak i zwierząt [43, 44]. W przypadku ssaków, w tym człowieka, zakłada się, że miRNA mogą regulować ponad 50 proc. wszystkich genów kodujących białka [45]. Od czasu ich odkrycia liczba nowo zidentyfikowanych ludzkich miRNA stale wzrasta i obecnie sięga ponad 2,5 tys. znanych sekwencji [46]. Odpowiada to 1-4 proc. wszystkich genów ulegających ekspresji u człowieka, przez co miRNA są uważane za jedną z najliczniejszych klas genowych regulatorów [47-49].

Cząsteczki miRNA są zdolne do regulacji genów na poziomie posttranskrypcyjnym poprzez specyficzne rozpoznawanie i oddziaływanie na matrycowe RNA (mRNA) [50]. Proces wyciszania genów może przebiegać na dwa sposoby, w zależności od stopnia komplementarności pomiędzy cząsteczkami miRNA i mRNA. Aby miRNA mogło się przyłączyć do odpowiedniej sekwencji mRNA, wystarczy jedynie 2-7 komplementarnych nukleotydów. Dzięki temu pojedyncza cząsteczka miRNA wpływa na tysiące różnych transkryptów mRNA, a jedno mRNA podlega regulacji przez wiele rodzajów miRNA. U człowieka i zwierząt miRNA spełniają swoją funkcję regulatorową, przyłączając się najczęściej na zasadzie niepełnej komplementarności do końca 3' nici mRNA w regionie nieulegającym translacji (3'-UTR), który odpowiada za poliadenylację, translację i stabilność mRNA [51-53]. W tym przypadku ekspresja białka jest hamowana przez zatrzymanie translacji lub przez deadenylację cząsteczki mRNA [54].

Pozakomórkowe miRNA

Badania naukowe wielu grup potwierdziły występowanie miRNA w różnych płynach ustrojowych człowieka, m.in. surowicy [55-57] i osoczu krwi [55, 56], ślinie [58], moczu [59], mleku [60], płynie mózgowo-rdzeniowym [61] oraz płynie nasiennym [62].

Dotychczas poznane mechanizmy uwalniania miRNA poza komórkę obejmują udział procesów śmierci komórkowej (nekrozy i apoptozy) oraz aktywnej sekrecji [54]. W tym ostatnim mechanizmie miRNA jest wydzielane wewnątrz egzosomów i innych pęcherzykowatych struktur lub w postaci kompleksów z białkami wiążącymi RNA z rodziny argonautów lub lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Badania nad miRNA obecnym we krwi potwierdziły jego wysoką stabilność zarówno w osoczu, jak i w surowicy [63].

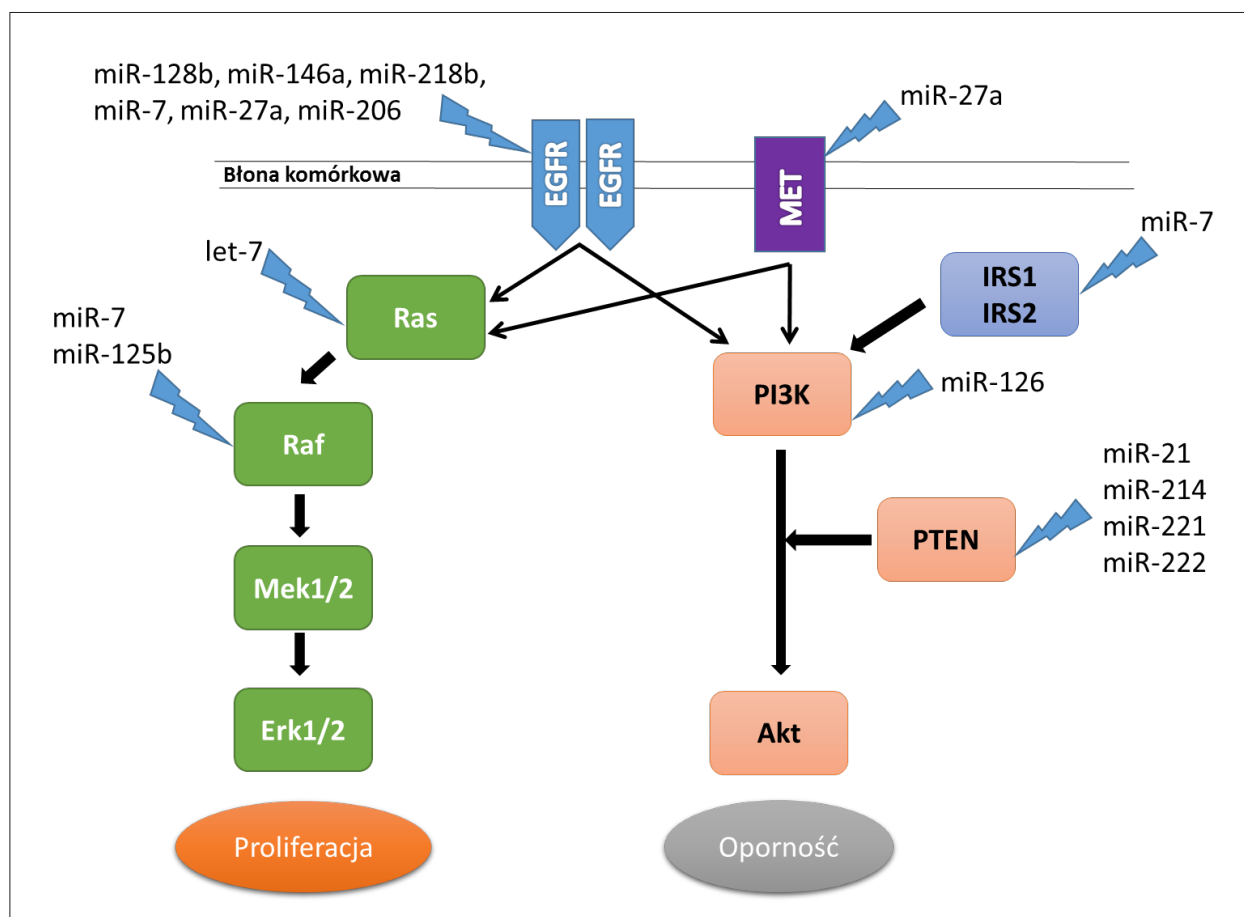
Analizy biochemiczne wykazały, że pozakomórkowe miRNA obecne we krwi jest odporne na działanie RNaz, a także wyjątkowo trwałe w środowisku o skrajnych wartościach pH i temperatury [55, 56].

miRNA jako regulatory kluczowych szlaków sygnałowych w kancerogenezie

Oddziaływanie niekodujących RNA na mRNA genów biorących udział w różnych procesach biologicznych obejmuje szeroki zakres aktywności, począwszy od kontroli różnicowania i wzrostu komórek, poprzez naprawę DNA, na kierowaniu komórki na drogę apoptozy skończywszy. Sugeruje to ścisły związek miRNA z przebiegiem kancerogenezy, w której powyższe procesy są zaburzone. Faktem jest występowanie dużej liczby genów miRNA w punktach złamań chromosomów, sekwencjach deletowanych lub amplifikowanych, co podczas transformacji nowotworowej powoduje implikacje funkcjonalne. Następstwem tych aberracji jest nadmiar lub brak obecności konkretnych miRNA w transformowanej komórce, a co za tym idzie, upośledzony jest mechanizm kontroli prawidłowej ekspresji wielu genów. Gdy miRNA w prawidłowej komórce oddziałuje hamująco na pewien onkogen, to w przypadku delekcji genu miRNA dany onkogen ulegnie nadekspresji. Przeciwnie, amplifikacja genu miRNA regulującego supresor nowotworu spowoduje blokadę jego ekspresji i promocję kancerogenezy.

Ponadto aktywacja/inaktywacja miRNA podlega regulacji przez czynniki transkrypcyjne lub mechanizmy epigenetyczne (metylacja promotora genu miRNA, acetylacja histonów). Opisano również mutacje w sekwencjach miRNA oraz sekwencjach 3' regionów UTR genów docelowych rozpoznawanych przez miRNA. W obydwu przypadkach specyficzność rozpoznania miRNA-mRNA zostaje zmieniona: miRNA „nabywa” zdolność rozpoznawania nowego mRNA bądź dany gen docelowy wymyka się spod negatywnej kontroli miRNA [64]. Zatem niektóre miRNA mogą działać onkosupresorowo, a inne onkogennie, stymulując rozwój nowotworów [65].

Zaburzona ekspresja konkretnych sekwencji lub rodzin miRNA ma swoje poważne konsekwencje w postaci nieprawidłowej regulacji aktywności kluczowych komponentów najważniejszych szlaków sygnałowych w komórkach nowotworu (ryc. 2). Podwójna, onkogenna lub supresorowa aktywność miRNA w kancerogenezie wydaje się mieć znaczący wpływ na skuteczność terapii ukierunkowanych molekularnie, w tym IKT EGFR w raku płuca. Nieprawidłowa regulacja ekspresji genów przez miRNA prowadzi do uruchomienia alternatywnych (obocznych) ścieżek sygnałowych lub aktywacji kolejnych mediatorów sygna-



Rycina 1. Najważniejsze z klinicznego punktu widzenia mutacje genu EGFR zlokalizowane w eksonach 18–21. Najwyższą częstość (proc.) występowania wśród chorych na NDRP prezentują delecje w obrębie eksonu 19. i mutacje punktowe w eksonie 21. genu [6].

łu, omijając szlak zablokowany przez inhibitor IKT EGFR. Sprzężenie zwrotne pomiędzy poziomem miRNA a aktywnością pewnych genów docelowych (rozpoznawanych przez dane miRNA), w tym onkogenów i supresorów nowotworu, powoduje dynamiczne zmiany ekspresji miRNA, których pomiar umożliwiłby ocenę aktualnego statusu aktywności genetycznej komórek. Identyfikacja profilu miRNA zaangażowanych w mechanizmy odpowiedzi komórkowej na IKT EGFR może stworzyć nowy kierunek badań nad opracowaniem skuteczniejszej terapii personalizowanej dla chorych na NDRP, jak również w znaczący sposób zwiększyć efektywność monitorowania przebiegu choroby oraz samego leczenia.

UDZIAŁ miRNA W MECHANIZMACH WRAŻLIWOŚCI I OPORNOŚCI NA IKT EGFR W RAKU PŁUCA

Profile ekspresji miRNA u chorych na NDRP z różnym statusem mutacji genu EGFR

Liczne badania potwierdzają potencjalną użyteczność poszczególnych sekwencji miRNA jako biomar-

kerów nowotworowych ze względu na ich dużą stabilność zarówno w utrwalonych preparatach tkanki nowotworowej (zwłaszcza w postaci blochków parafinowych), jak i płynach ustrojowych. Zaletą potencjalnego wykorzystania miRNA w diagnostyce onkologicznej jest możliwość ich analizy ilościowej i jakościowej z użyciem real-time PCR jako powszechnie dostępnej techniki laboratoryjnej oraz zvalidowanych, dostępnych komercyjnie zestawów odczynnikowych. Wobec ścisłego powiązania między szlakiem sygnałowym EGFR i ekspresją pewnych miRNA wysunięto hipotezę, że cząsteczki te mogłyby uzupełnić aktualne biomarkery predykcyjne dla terapii z użyciem IKT EGFR.

Zhang i wsp. [66] obserwowali niższy poziom ekspresji miR-195 i miR-122 u chorych na NDRP z potwierdzoną obecnością mutacji aktywujących w genie EGFR w stosunku do chorych bez mutacji. Badania przeprowadzono na próbkach osocza pobranych od 105 niepalących kobiet chorujących na NDRP typu gruczolowego. Poziom ekspresji obu tych sekwencji miRNA był istotnie związany z obecnością mutacji w genie EGFR u chorych z gruczolakorakiem płuca, zwłaszcza u pacjentek z zaawansowaną postacią

NDRP. Obniżony poziom ekspresji miR-122 i miR-195 w osoczu korelował także z dłuższym czasem całkowitego przeżycia u pacjentek w zaawansowanym stadium choroby (HR=0,23; 95% CI 0,07-0,84; oraz HR=0,22; 95% CI 0,06-0,77).

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na liniach komórkowych NDRP wytypowano kilka sekwencji miRNA, których poziom ekspresji istotnie korelował z obecnością mutacji w genie EGFR (miR-141-3p, miR-200c-3p, miR-203, miR-3182, miR-934 i miR-3196) [67]. W dalszej części doświadczeń przeprowadzono analizę 3 wybranych sekwencji miRNA (miR-200c, miR-203 i miR-3196) w próbkach surowicy pobranych od kobiet niepalących z NDRP, u których wykryto mutację aktywującą w genie EGFR w porównaniu z chorymi bez mutacji. Obniżony poziom ekspresji miR-3196 w surowicy korelował dodatnio z obecnością delekcji w eksonie 19. genu EGFR.

Ekspresja panelu 5 pozakomórkowych sekwencji miRNA (miR-21, miR-122, miR-195, miR-125b, miR-25) również korelowała ze statusem mutacji w genie EGFR u chorych na NDRP [68]. Potwierdzono to w badaniach *in vitro* na kilku liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca o różnym stopniu wrażliwości na gefitynib, dokonując selekcji panelu miRNA metodą mikromacierzową. Następnie ekspresję wyselekcjonowanych miRNA sprawdzono w 150 próbkach tkanki nowotworowej i osocza od chorych na NDRP. Panel 5 miRNA korelował z obecnością mutacji EGFR z czułością i swoistością około 87 proc.

Wang i wsp. [69] obserwowali istotnie wyższą ekspresję 3 miRNA (miR-21, miR-27a i miR-218; odpowiednio: $p=0,011$; $p=0,011$ i $p=0,026$) w grupie chorych na zaawansowaną postać NDRP, którzy przestali odpowiadać na leczenie IKT EGFR, w porównaniu z grupą chorych prezentujących odpowiedź na leczenie.

Gasparini i wsp. [70] badali profile ekspresji miRNA w preparatach tkanki nowotworowej od 67 chorych na NDRP, które różniły się statusem mutacji kilku onkogenów: genu kinazy chłoniaka anaplastycznego (ALK), EGFR i KRAS, w odniesieniu do 18 kontrolnych materiałów prawidłowej tkanki płuca. Analiza statystyczna danych metodą taksonomiczną (hierarchical clustering) pozwoliła wyodrębnić unikalne sygnatury ekspresji miRNA dla materiałów różniących się statusem rearanżacji genu ALK (rearanżacja genu versus typ natywny) oraz statusem mutacji genów EGFR i KRAS (mutacja genu versus typ natywny) wśród materiałów z natywnym wariantem ALK. Wysoki poziom ekspresji miR-504 korelował dodatnio

z obecnością mutacji w genie EGFR ($p=0,04$). Sugeruje to możliwość wykorzystania cząsteczek miRNA jako nowych biomarkerów, które mogłyby uzupełnić metody molekularne stosowane obecnie w diagnostyce onkologicznej.

Należy podkreślić, że żadna z omawianych wyżej prac nie ma jeszcze charakteru aplikacyjnego, a jej wyniki nie mogą być wdrożone w praktyce klinicznej. Wskazana jest walidacja wytypowanych sygnatur miRNA w warunkach *ex vivo*, na podstawie zarówno nowotworowego materiału tkankowego, jak i krwi obwodowej (płynnej biopsji) od dużej liczby chorych na NDRP ze zróżnicowanym statusem mutacji genu EGFR, w celu jednoznacznej weryfikacji powyższych danych.

miRNA regulujące szlak sygnałowy MAPK/ERK

Weiss i wsp. wysunęli hipotezę, że obniżona ekspresja lub utrata miRNA regulujących aktywność genu EGFR może powodować większą produkcję białka EGFR stanowiącego cel molekularny inhibitorów kinazy tyrozynowej [71]. Autorzy typowali miRNA o wysokiej homologii sekwencji do fragmentu 3'-UTR genu EGFR, których loci znajdowały się w regionach chromosomów szczególnie podatnych na delekcje w komórkach raka płuca. Po przeanalizowaniu danych wyselekcjonowano miRNA-128b, którego gen kodujący zlokalizowany jest na chromosomie 3p. Delekcję chromosomu 3p wykrywa się w 96 proc. przypadków raka płuca oraz 78 proc. próbek stanu przednowotworowego w nabłonku płuc. Utrata heterozygotyczności (delekcja jednego z alleli lub rearanżacja w regionie 3p22 chromosomu) miRNA-128b korelowała z lepszą odpowiedzią na gefitynib przez chorych leczonych IKT EGFR.

Edmonds i wsp. [72] obserwowali istotnie zwiększoną ekspresję miR-31 w preparatach tkanki nowotworowej od chorych na NDRP typu gruczolowego w I stadium w odniesieniu do prawidłowej tkanki płuc (5,7-krotny wzrost ekspresji). Co więcej, poziom ekspresji miR-31 istotnie wzrastał wraz z kolejnymi stopniami klinicznego zaawansowania nowotworu (13,5-krotny wzrost w stadiach II i II, 35-krotny wzrost w stadium IV; $p=0,0001$). Indukowana nadekspresja miR-31 w tkance płuc transgenicznym myszy skutkowała rozwojem ognisk hiperplazji nabłonka płuc, prowadząc do rozwoju raka typu gruczolowego. Znacząco wyższy odsetek myszy z indukowaną transformacją nowotworową płuc obserwowano u zwierząt z jednoczesną nadekspresją miR-31 i zmutowanego genu KRAS (60 proc.) w stosunku do myszy z nadekspresją KRAS (40 proc.), co sugeruje synergizm działania obu czynników

w onkogenezie raka gruczołowego płuca. Następnie za pomocą analizy bioinformatycznej wytypowano geny, których regiony 3'-UTR w mRNA wykazywały wysokie powinowactwo do sekwencji miR-31. Cztery spośród wytypowanych genów: *RASA1*, *SPRED1*, *SPRED2*, *SPRY4*, to negatywne regulatory szlaku MAPK/ERK. Ekspresja tych genów na poziomie mRNA była istotnie obniżona w preparatach tkanki raka gruczołowego stosunku do wartości dla prawidłowej tkanki płuc oraz ujemnie korelowała z poziomem ekspresji miR-31. Potwierdza to onkogeną rolę miR-31 w rozwoju raka płuca typu gruczołowego poprzez regulację szlaku MAPK/ERK zależnego od EGFR.

W innych badaniach wywołanie nadekspresji 3 supresorowych miRNA (miRNA-126, miRNA-145, let-7) w liniach komórkowych raka płuca (H460, A549) z natywną formą genu EGFR oraz zmutowanym genem KRAS pozwoliło przełamać pierwotną oporność tych komórek na gefitynib [73]. W szczególności nadekspresja miRNA-126 zwiększyła aż 6-krotnie wrażliwość komórek linii H460 na cytotoksyczne działanie gefitynibu.

Webster i wsp. w badaniach *in vitro* linii raka płuca A549 zaobserwowali, że miR-7 jest zdolne do zablokowania ekspresji genów Raf1 i EGFR poprzez degradację ich mRNA [74]. Transfekcja komórek nowotworowych prekursorowym miR-7 (pre-miR-7) powodowała znaczące zmniejszenie ich żywotności, a w efekcie również ich liczebności. Dodatkowo spadek żywotności komórek linii A549 następował poprzez hamowanie ekspresji genu EGFR i indukcję innych szlaków ekspresji genów wywołujących śmierć komórki.

Udział miRNA w aktywacji obocznych szlaków sygnałowych promujących oporność na IKT EGFR

Aktywacja obocznych (alternatywnych) szlaków sygnałowych, w szczególności szlaków HGF/Met oraz PI3K/AKT, należy do najczęstszych mechanizmów nabytej oporności na IKT EGFR zaraz po mutacjach oporności w genie EGFR. Identyfikacja miRNA regulujących aktywność genów zaangażowanych w szlaki sygnałowe promujące oporność komórek nowotworowych na IKT EGFR może stworzyć nowe kierunki badań nad rozwojem efektywniejszych terapii celowanych dla chorych na NDRP.

Szlak PI3K/AKT to jedna z głównych dróg przekazu sygnału od aktywowanego EGFR do wnętrza komórki, promującego jej proliferację i przeżycie [6, 75]. Badania wykazały, że szlak PI3K/AKT może

zostać aktywowany również przez sygnał pochodzący od IGF-1R (receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1), w przypadku gdy EGFR został zablokowany [76]. Ponadto zwiększona aktywność kinazy w nowotworach może wynikać z amplifikacji genu PI3K lub obecności aktywujących mutacji w tym genie oraz utraty aktywności fosfatazy PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome).

Wykazano, że w raku płuca niska ekspresja genu PTEN, warunkująca oporność na IKT EGFR, jest wynikiem negatywnej regulacji przez miR-21. Li i wsp. [77] badali rolę miRNA w pierwotnej oporności na IKT EGFR u chorych na zaawansowane postaci NDRP, u których stwierdzono mutację w genie EGFR. W grupie 25 chorych na NDRP, którzy byli poddani leczeniu IKT EGFR, autorzy obserwowali istotny wzrost ekspresji miR-21 po nabyciu oporności na leczenie w porównaniu z wartościami początkowymi, przed leczeniem ($p < 0,01$). Doświadczenia *in vivo* prowadzone na modelu mysim wykazały udział miR-21 w zjawisku nabywania oporności na IKT EGFR poprzez modulację ekspresji genów *PTEN* i *PDCD4* oraz aktywację ścieżki sygnałowej PI3K/AKT. W innych badaniach nadekspresja miR-21, indukowana w warunkach *in vitro*, znacząco zwiększała oporność linii komórkowej PC-9 na gefitynib poprzez obniżenie ekspresji PTEN, ale także stymulowała aktywację szlaku sygnałowego zależnego od AKT i ERK [78]. Natomiast knock-down genu miR-21 w linii niewrażliwej na IKT EGFR wywoływał proces odwrotny. U chorych na NDRP leczonych inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR wysoka ekspresja miR-21 korelowała z krótszym czasem przeżycia wolnym od progresji choroby. Ponadto wysoka ekspresja miR-21 i niska ekspresja genu PTEN były istotnie związane ze słabszą odpowiedzią na leczenie IKT EGFR oraz krótszym całkowitym czasem przeżycia.

Ścieżka sygnałowa zależna od kinazy tyrozynowej c-Met, pełniącej funkcję receptora czynnika wzrostu hepatocytów (HGFR), została zidentyfikowana jako potencjalny cel dla terapii ukierunkowanych molekularnie w wielu typach nowotworów, w tym NDRP [79]. W niedrobnokomórkowym raku płuca częstym zaburzeniem molekularnym jest nadekspresja genu HGF i/lub genu MET, kodującego receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów, które powiązane z nabytą opornością na IKT EGFR u 5-20 proc. chorych z mutacjami w genie EGFR poprzez zależną od ERBB-3 aktywację szlaku sygnałowego PI3K/AKT. Obecnie we wczesnych fazach badań klinicznych znajduje się kilka inhibitorów kinazy tyrozynowej oddziałujących na c-Met [80].

Dowodzono, że ekspresja genu MET podlega negatywnej regulacji ze strony trzech miRNA: miR-34a, miR-34b i miR-34c, stanowiących tzw. rodzinę miR-34 [81]. Transfekcja komórek nowotworowych syntetycznymi prekursorami miR-34b/c prowadziła do istotnego zmniejszenia białka c-Met w komórkach NDRP, nawet w tych, które uprzednio wykazywały nadekspresję i amplifikację genu MET [82]. W odpowiedzi na stymulację HGF transfekowane komórki wykazywały ograniczoną zdolność migracji i zrywania połączeń międzykomórkowych w stosunku do kontroli. Z kolei zablokowanie ekspresji endogennych miR-34b i miR-34c z użyciem syntetycznych „antagomiRów” (antagonistów miRNA) skutkowało zwiększeniem poziomu ekspresji MET.

Cząsteczki miRNA należące do klastra miR-221/222 pełnią funkcję onkogennych regulatorów genu MET [81]. Garofalo i wsp. [83] analizowali miRNA związane z mechanizmami oporności na IKT EGFR i wytypowali 8 cząsteczek (221/222, 30b/c, 21, 29a/c, 100), które podlegają zwrotnej regulacji ze strony zarówno EGFR, jak i MET. Autorzy wykazali, że gefitynib wywołuje apoptozę wrażliwej komórki NDRP poprzez hamowanie aktywności miR-30b/c oraz miR-221/222. Indukowana nadekspresja MET powodowała oporność komórek NDRP na gefitynib poprzez aktywację miR-30b/c i miR-221/222, przez co dalsze blokowanie EGFR za pomocą leku przestawało być skuteczne. Intryguje to, że jednoczesne stosowanie gefitynibu wraz z inhibitorami c-Met lub syntetycznymi antagonistami 221/222 i anti-30c pozwalało przełamać nabytą oporność na IKT EGFR w mysich modelach ksenograftów NDRP.

Rola miRNA w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek NDRP

Cząsteczki miRNA odgrywają istotną rolę we wspomnianym już procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego, będącym jednym z mechanizmów nabytej oporności na IKT EGFR [84]. W procesie EMT komórki nabłonkowe przerywają połączenia międzykomórkowe i tracą właściwości adhezyjne, nabывая większej ruchliwości i zdolności do migracji. EMT komórek nowotworowych sprzyja progresji choroby i tworzeniu odległych przerzutów w organizmie.

Transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- β 1) jest cytokiną o szerokim spektrum działania, która odpowiada m.in. za indukcję EMT poprzez aktywację wielu czynników transkrypcyjnych związanych z tym procesem, takich jak: Snail, Twist, ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1) [85]. Zdolność TGF- β 1 do indukcji EMT potwierdzono zarówno

w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [86]. W badaniach nad epigenetyczną regulacją procesu EMT w niedrobnokomórkowym raku płuca wykazano udział miR-134 i miR-487b, które poprzez hamowanie ekspresji genu MAGI2 promowały fosforylację białka PTEN i utratę jego aktywności [87]. Utrata aktywności PTEN skutkowała nabyciem przez komórki NDRP oporności na gefitynib w warunkach *in vitro*.

W innej pracy dowiedziono, że miR-23a reguluje zależny od TGF- β 1 proces EMT w komórkach NDRP poprzez hamowanie ekspresji E-kadheryny [88]. Nokaut genu miR-23a skutkował częściowym przywróceniem ekspresji E-kadheryny w warunkach stymulacji komórek TGF- β 1. Natomiast indukowana nadekspresją miR-23a hamowała aktywność E-kadheryny, promując proces EMT, co z kolei istotnie wzmacniało oporność komórek na gefitynib.

Kolejnym miRNA zaangażowanym w mechanizm oporności na IKT EGFR jest miR-147 [89]. Poziom jego ekspresji jest znacząco obniżony zarówno w próbkach surowicy, jak i tkanek guza pobranych od chorych na NDRP [90]. W warunkach *in vitro* miR-147 wykazało zdolność do kontroli procesu przejścia mezenchymalno-epitelialnego komórek linii A549 i przywrócenia ich wrażliwości na IKT EGFR w komórkach nowotworowych pierwotnie opornych na ten typ terapii [89]. Indukcja nadekspresji miR-147 w transfekowanych komórkach NDRP skutkowała zmniejszeniem oporności na gefitynib. W innych badaniach indukowana nadekspresja miR-130a powodowała hamowanie proliferacji komórek NDRP i ich zwiększoną apoptozę po zastosowaniu gefitynibu, natomiast obniżenie ekspresji miR-130a wywoływało proces odwrotny [91].

Rodzina miR-200 oraz miR-205 odpowiada za regulację ekspresji czynników transkrypcyjnych ZEB1 i ZEB2 zaangażowanych w procesie EMT. Badania wskazują, że rodzina miR-200 kontroluje ekspresję ZEB1/2, lecz transkrypcja tych miRNA jest zwrotnie regulowana przez czynniki ZEB1/2. Ten wzajemny wpływ zapewnia ścisłą kontrolę procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego, a zaburzenie równowagi między oddziałującymi ZEB1/2 a cząsteczkami z rodziny miR-200 powoduje nabycie zdolności do inwazji i przerzutowania przez komórkę nowotworową [89].

Intrygujących wyników dostarczyła kliniczna praca Li i wsp. [92], którzy obserwowali wyższą skuteczność leczenia IKT EGFR wśród chorych na NDRP bez mutacji somatycznych EGFR i wysoką ekspresją miR-200c w tkance nowotworowej (n=26) w porównaniu z grupą chorych z niskim poziomem ekspresji tego miRNA

(n=40). Chorzy z wysoką ekspresją miR-200c prezentowali istotnie dłuższy czas życia wolny od progresji (5 miesięcy [95% CI 1,41-8,59] vs. 1,2 miesiąca [95% CI 0,89-1,51]; p=0,001) i całkowity czas przeżycia (9,6 miesiąca [95% CI 4,27-14,93] vs. 5 miesięcy [95% CI 3,90-6,10]; p=0,037) oraz liczbowo wyższy odsetek odpowiedzi na leczenie (11,5% vs. 2,5%; p=0,292) niż chorzy z niską ekspresją. Podobnej zależności nie obserwowano jednak w grupie chorych na NDRP z mutacją EGFR (n=73). Powyższe dane sugerują potencjalną przydatność miR-200c jako kolejnego obok mutacji EGFR biomarkera predykcyjnego w leczeniu ukierunkowanym molekularnie chorych na zaawansowane postaci NDRP. Obecnie jedynie chorzy prezentujący obecność mutacji aktywującej EGFR w nowotworowym DNA mogą korzystać z leczenia IKT EGFR. Wyniki tej pracy wymagają potwierdzenia w prospektywnym badaniu klinicznym.

PODSUMOWANIE

W ciągu kilkunastu lat, które upłynęły od odkrycia miRNA, wiele badań poświęcono możliwości wykorzystania tych małych, regulatorowych cząsteczek jako biomarkerów przydatnych w diagnozowaniu i leczeniu NDRP. Z uwagi na zaangażowanie miRNA w procesy kancerogenezy na wszystkich jej etapach cząsteczki te mogłyby służyć nie tylko jako specyficzne indykatory choroby nowotworowej płuc (biomarkery diagnostyczne), ale również jako dynamiczne wskaźniki statusu tkanki guza przed leczeniem (bio-

markery prognostyczne) i w jego trakcie (biomarkery predykcyjne). Szczególną przydatność kliniczną zdają się prezentować pozakomórkowe miRNA, wydzielane w stabilnej formie przez komórki nowotworu do krwi i innych płynów ustrojowych już we wczesnych stadiach rozwoju raka płuca. Ich podstawową zaletą jest łatwość śledzenia zmian ilościowych i jakościowych na każdym etapie choroby bez narażania pacjentów na inwazyjne pobieranie materiału do badań. Obecnie ogromne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem pozakomórkowych cząsteczek miRNA jako biomarkerów w prognozowaniu skuteczności leczenia ukierunkowanego molekularnie, zwłaszcza opartego na IKT EGFR.

Ogromny postęp technologiczny, jaki się dokonał w czasie ostatniej dekady w metodologii wykrywania i identyfikacji miRNA, zwłaszcza technikami wysokoprzepustowymi, takimi jak sekwencjonowanie nowej generacji, rozpoczął nową erę badań translacyjnych, umożliwiając obiektywną analizę już nie pojedynczych, lecz wielu miRNA jednocześnie w kontekście tworzenia epigenetycznych profili raka płuca. Nie mniejsze znaczenie ma tutaj rozwój narzędzi bioinformatycznych potrzebnych do analizy ogromnej liczby surowych danych, klasyfikacji rodzin miRNA oraz przewidywania ich potencjalnych genów docelowych. Wydaje się rzeczą oczywistą to, że wszelkie eksperymenty mające na celu zrozumienie patomechanizmów choroby nowotworowej przybliżają nas do przełożenia wyników badań laboratoryjnych na praktykę kliniczną.

PIŚMIENNICTWO

1. Siegel R., Naishadham D., Jemal A., *Cancer statistics, CA Cancer J Clin*, 2013; 63(1): 11-30.
2. Wojciechowska U., Didkowska J., *Zachorowania i zgonu na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów*, 2013.
3. Chorostowska-Wynimko J., Szpechciński A., The impact of genetic markers on the diagnosis of lung cancer: a current perspective, *J Thorac Oncol*, 2007; 2(11): 1044-51.
4. Chorostowska-Wynimko J., Skroński M., Szpechciński A., Markery molekularne we wczesnej diagnostyce raka płuca – fakty i nadzieje, *Onkologia Info*, 8(3): 152-159.
5. Chorostowska-Wynimko J., Skroński M., Szpechciński A., Molekularne markery prognostyczne i predykcyjne w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca, *Onkologia Info*, 2011; 8(3): 160-167.
6. Sharma S.V. et al., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nat Rev Cancer*, 2007; 7(3): 169-81.
7. Lynch T.J. et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N Engl J Med*, 2004; 350(21): 2129-39.
8. Uramoto H., Mitsudomi T., Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer?, *British Journal of Cancer*, 2007; 96(6): 857-863.
9. Kawaguchi T. et al., Japanese ethnicity compared with Caucasian ethnicity and never-smoking status are independent favorable prognostic factors for overall survival in non-small cell lung cancer: a collaborative epidemiologic study of the National Hospital Organization Study Group for Lung Cancer (NHSGLC) in Japan and a Southern California Regional Cancer Registry databases, *J Thorac Oncol*, 2010; 5(7): 1001-10.
10. Rosell R. et al., Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *N Engl J Med*, 2009; 361(10): 958-67.

11. Shigematsu H. et al., Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers, *J Natl Cancer Inst*, 97(5): 339-46.
12. Park K. et al., Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial, *The Lancet Oncology*, 2016; 17(5): 577-589.
13. Haaland B. et al., Meta-analysis of first-line therapies in advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR-activating mutations, *J Thorac Oncol*, 9(6): 805-11.
14. Kowalczyk A. et al., Znaczenie inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca, *Onkol Prak Klin*, 2005; 1(4): 217-224.
15. Solca F. et al., Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, *J Pharmacol Exp Ther*, 2012; 343(2): 342-50.
16. Regales L. et al., Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer, *J Clin Invest*, 2009; 119(10): 3000-10.
17. Janjigian Y.Y. et al., Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations, *Cancer Discov*, 2014; 4(9): 1036-45.
18. Sullivan L., Planchard D., Osimertinib in the treatment of patients with epidermal growth factor receptor T790M mutation-positive metastatic non-small cell lung cancer: clinical trial evidence and experience, *Ther Adv Respir Dis*, 2016; 10(6): 549-565.
19. Cross D.A. et al., AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer, *Cancer Discov*, 2014; 4(9): 1046-61.
20. Ramalingam S. et al., LBA1_PR: Osimertinib as first-line treatment for EGFR mutation-positive advanced NSCLC: updated efficacy and safety results from two Phase I expansion cohorts, *Journal of Thoracic Oncology*, 11(4): 152.
21. Lin L., Bivona T.G., Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Resistance in NSCLC Patients, *Chemother Res Pract*, 2012; 817297.
22. Janne P.A., Challenges of detecting EGFR T790M in gefitinib/erlotinib-resistant tumours, *Lung Cancer*, 2008; 60 suppl. 2: 3-9.
23. Majem M., Remon J., Tumor heterogeneity: evolution through space and time in EGFR mutant non-small cell lung cancer patients, *Translational Lung Cancer Research*, 2013; 2(3): 226-237.
24. Wu S.G. et al., The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients, *Oncotarget*, 7(11): 12404-13.
25. Yu H.A. et al., Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR mutant Lung Cancers, *Clinical Cancer Research*: an official journal of the American Association for Cancer Research, 19(8): 2240-2247.
26. Inukai M. et al., Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer, *Cancer Res*, 2006; 66(16): 7854-8.
27. Gainor J.E., Shaw A.T., Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer, *J Clin Oncol*, 2013, 31(31): 3987-96.
28. Song H.-N. et al., Acquired C797S mutation upon treatment with a T790M-specific third-generation EGFR inhibitor (HM61713) in non-small cell lung cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 11(4): e45-e47.
29. Mao C. et al., KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies, *Lung Cancer*, 2010; 69(3): 272-8.
30. Ohashi K. et al., Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109(31): E2127-33.
31. Engelman J.A. et al., MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling, *Science*, 2007; 316(5827): 1039-43.
32. Yano S. et al., Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations, *Cancer Res*, 2008; 68(22): 9479-87.
33. Yano S. et al., Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort, *J Thorac Oncol*, 2011; 6(12): 2011-7.
34. Mazières J. et al., Lung cancer that harbors an HER2 mutation: Epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives, *Journal of Clinical Oncology*, 2013; 31(16): 1997-2003.
35. Sequist L.V. et al., Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors, *Sci Transl Med*, 2011; 3(75): 75ra26.
36. Wang L. et al., PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wildtype subgroup, *PLoS One*, 2014; 9(2): e88291.
37. Sos M.L. et al., PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of AKT and EGFR, *Cancer Res*, 2009; 69(8): 3256-61.
38. Yeo C.D. et al., Expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) predicts poor responses to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer patients harboring activating EGFR mutations, *Lung Cancer*, 2015; 87(3): 311-7.
39. Huang L. Fu L., Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors, *Acta Pharm Sin B*, 2015; 5(5): 390-401.
40. Shien K. et al., Acquired Resistance to EGFR Inhibitors Is Associated with a Manifestation of Stem cell-

- like Properties in Cancer Cells, *Cancer Research*, 2013; 73(10): 3051-3061.
41. Uramoto H. et al., Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma, *Anticancer Res*, 2010; 30(7): 2513-7.
42. Zandberga E. et al., Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer, *Genes Chromosomes & Cancer*, 2013; 52(4): 356-369.
43. Baek D. et al., The impact of microRNAs on protein output, *Nature*, 455(7209): 64-71.
44. Bartel D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 2004; 116(2): 281-97.
45. Turchinovich A., Weiz L., Burwinkel B., Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function, *Trends in Biochemical Sciences*, 2012; 37(11): 460-465.
46. Chou C.H. et al., miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database, *Nucleic Acids Res*, 2016; 44(D1): D239-47.
47. Chang S. et al., MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode, *Nature*, 2004; 430(7001): 785-9.
48. Lim L.P. et al., Vertebrate microRNA genes, *Science*, 2003; 299(5612): 1540.
49. Berezikov E. et al., Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes, *Cell*, 2005; 120(1): 21-4.
50. Giovannetti E. et al., Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice, *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012; 81(2): 103-22.
51. Bartel D.P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 2009; 136(2): 215-33.
52. Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D., Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements, *Cell Mol Life Sci*, 2012; 69(21): 3613-34.
53. Pichon X. et al., RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation, *Curr Protein Pept Sci*, 2012; 13(4): 294-304.
54. Schwarzenbach H. et al., Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer, *Nat Rev Clin Oncol*, 2014; 11(3): 145-56.
55. Chen X. et al., Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases, *Cell Res*, 2008; 18(10): 997-1006.
56. Gilad S. et al., Serum microRNAs are promising novel biomarkers, *PLoS One*, 2008; 3(9): e3148.
57. Mitchell P.S. et al., Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008; 105(30): 10513-10518.
58. Park N.J. et al., Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection, *Clin Cancer Res*, 2009; 15(17): 5473-7.
59. Hanke M. et al., A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer, *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 2010; 28(6): 655-661.
60. Kosaka N. et al., microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, *Silence*, 2010; 1(7).
61. Cogswell J.P. et al., Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways, *Journal of Alzheimers Disease*, 2008; 14(1): 27-41.
62. Hanson E.K., Lubenow H., Ballantyne J., Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs, *Anal Biochem*, 2009; 387(2): 303-14.
63. Lu J. et al., MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 2005; 435(7043): 834-8.
64. Szaumkessel M., Szyfter K., mikro RNA w patogenezie płaskonabłonkowych raków głowy i szyi, *Biotechnologia*, 2010; 3(90): 64-74.
65. Croce C.M., Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer, *Nat Rev Genet*, 2009; 10(10): 704-14.
66. Zhang H. et al., Circulating microRNAs in relation to EGFR status and survival of lung adenocarcinoma in female non-smokers, *PLoS One*, 2013; 8(11): e81408.
67. Ju L. et al., Exploration of genome-wide microRNA in lung adenocarcinoma with egfr exon 19 deletion: Mir-3196 as a potential biomarker, *Chest*, 2016; 149(4S): A329-A329.
68. Zhao Q. et al., Circulating miRNAs is a potential marker for gefitinib sensitivity and correlation with EGFR mutational status in human lung cancers, *American Journal of Cancer Research*, 2015; 5(5): 1692-1705.
69. Wang S. et al., Identification of plasma microRNA profiles for primary resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with EGFR activating mutation, *Journal of Hematology & Oncology*, 2015; 8: p. 127.
70. Gasparini P. et al., microRNA classifiers are powerful diagnostic/prognostic tools in ALK-, EGFR-, and KRAS-driven lung cancers, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015; 112(48): 14924-9.
71. Weiss G.J. et al., EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines, *Ann Oncol*, 2008; 19(6): 1053-9.
72. Edmonds M.D. et al., MicroRNA-31 initiates lung tumorigenesis and promotes mutant KRAS-driven lung cancer, *J Clin Invest*, 2016; 126(1): 349-64.
73. Zhong M. et al., MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer, *Chem Biol Interact*, 2010; 184(3): 431-8.
74. Webster R.J. et al., Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7, *J Biol Chem*, 2009; 284(9): 5731-41.

75. Gandhi J. et al., Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines, *PLoS One*, 2009; 4(2): e4576.
76. Zhou J. et al., Implication of epithelial-mesenchymal transition in IGF1R-induced resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, 2015; 6(42): 44332-45.
77. Li B. et al., MiR-21 overexpression is associated with acquired resistance of EGFR-TKI in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 2014; 83(2): 146-153.
78. Shen H. et al., Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer, *PLoS One*, 2014; 9(7): e103305.
79. Morgensztern D. et al., Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014, *J Thorac Oncol*, 2015; 10(1 suppl 1): 1-63.
80. Gelsomino F. et al., Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer, *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014; 89(2): 284-99.
81. Brighenti M. MicroRNA and MET in lung cancer, *Ann Transl Med*, 2015; 3(5): 68.
82. Migliore C. et al., MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth, *Cancer Res*, 2008; 68(24): 10128-36.
83. Garofalo M. et al., EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers, *Nat Med*, 2011; 18(1): 74-82.
84. Zhang J., Ma L., MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis, *Cancer Metastasis Rev*, 2012; 31(3-4): 653-62.
85. Miyazono K., Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2009; 85(8): 314-23.
86. Zavadil J., Bottinger E.P., TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions, *Oncogene*, 2005; 24(37): 5764-74.
87. Kitamura K. et al., MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells, *Mol Cancer Ther*, 2014; 13(2): 444-53.
88. Cao M. et al., MiR-23a regulates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells, *Int J Oncol*, 2012; 41(3): 869-75.
89. Lee C.G. et al., MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance, *PLoS One*, 2014; 9(1): e84597.
90. Chu G., Zhang J., Chen X., Serum level of microRNA-147 as diagnostic biomarker in human non-small cell lung cancer, *J Drug Target*, 2016; 24(7): 613-7.
91. Zhou Y.M., Liu J., Sun W., MiR-130a overcomes gefitinib resistance by targeting met in non-small cell lung cancer cell lines, *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014; 15(3): 1391-6.
92. Li J. et al., miR-200c overexpression is associated with better efficacy of EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer patients with EGFR wild-type, *Oncotarget*, 2014; 5(17): 7902-16.

Ocena aktywności prokariotycznych modułów addykcyjnych w kontekście poszukiwania nowych immunotoksyn

The assessment of prokaryotic addictive modules' activity in the context of seeking novel immunotoxins

Katarzyna Oszajca
Łukasz Wieteska
Magdalena Cybula
Janusz Szemraj

Zakład Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Projekt zrealizowano dzięki środkom przyznanych w 2011 roku przez Naukową Fundację Polpharmy zespołowi pod kierownictwem dr n. med. Katarzyny Oszajcy.

Streszczenie

Stosowane dziś chemioterapeutyki mimo wielu sukcesów klinicznych w dalszym ciągu nie są preparatami doskonałymi. Ważną, obecnie intensywnie badaną nową grupą substancji, w której pokłada się wiele nadziei, są immunotoksyny, czyli hybrydowe białka składające się z komponenty o działaniu cytotoksycznym oraz części odpowiedzialnej za wybiórcze łączenie się z komórkami nowotworowymi. Niestety także ta grupa preparatów nie jest wolna od wad, dlatego w dalszym ciągu ważne jest rozwijanie idei preparatu terapii celowanej. W niniejszej pracy przetestowano toksynę VapC pochodzącą z prokariotycznych modułów addykcyjnych pod kątem jej przydatności w konstrukcji immunotoksyn. Badane białko fuzyjne zawierające toksynę wykazywało właściwości RNazowe, trawiąc całkowite RNA po różnych czasach inkubacji. Praca wykazała również, że badane białko ma właściwości proapoptotyczne i ma wpływ na cykl komórkowy wybranych nowotworowych linii komórkowych.

Słowa kluczowe: immunotoksyny • systemy toksyna-antytoksyna
• komórki nowotworowe

Abstract

Despite of the fact that current anticancer chemotherapeutics have many beneficial achievements, there is an urgent need for new efficient therapies. A new type of drugs which are extensively investigated are immunotoxins – hybrid proteins that consist of cytotoxic component and second part which is responsible for selective binding to the receptors on tumor cells. Unfortunately, this group of therapeutics still has many drawbacks. There is a strong demand for research on a new substances and developing targeted therapy strategies. In the present study we tested VapC toxin derived from prokaryotic addictive modules as a potential component in the construction of immunotoxins. Investigated fusion protein consists of VapC toxin has RNase activity and digests total RNA in various treatment times. Moreover, studied protein displays proapoptotic properties and cell cycle arrest in selected cancer cell lines.

Key words: immunotoxins • toxin-antitoxin systems • cancer cells

Wpłynęło: 06-02-2017
Zaakceptowano: 07-04-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji:
dr n. med. Katarzyna Oszajca
Zakład Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź
e-mail:
katarzyna.oszajca@umed.lodz.pl

WSTĘP

Leczenie chorób nowotworowych za pomocą leków cytostatycznych jest podstawową metodą leczenia nowotworów rozsianych oraz metodą wspomagającą leczenie nowotworów ograniczonych ze współistnieniem przerzutów. Stosowane dzisiaj chemioterapeutyki mimo wielu sukcesów klinicznych w dalszym ciągu nie są preparatami doskonałymi [1]. Głównym problemem związanym z chemioterapią jest wysoka nieswoistość oraz wąski indeks terapeutyczny stosowanych preparatów [2]. Większość stosowanych leków przeciwnowotworowych nie działa wybiórczo, uszkadzając przy okazji tkanki szybko rosnące, do których należą: szpik, komórki nabłonkowe, komórki układu immunologicznego oraz gamety [1].

Intensywnie rozwijaną grupą leków są immunotoksyny, czyli hybrydowe białka składające się z komponenty o działaniu cytotoksycznym oraz części odpowiedzialnej za wybiórcze łączenie się z komórkami nowotworowymi. Jako komponentę cytotoksyczną wykorzystuje się zazwyczaj toksynę błoniczą, egzotoksynę *A Pseudomonas aeruginosa* lub toksyny roślinne, tj. rycynę, saponiny i geloninę. Aby związać immunotoksynę z komórką nowotworową, stosuje się czynniki wzrostu, rekombinowane przeciwciała lub częściej fragmenty przeciwciał [3, 4]. Po związaniu się cząsteczki immunotoksyny z receptorem na powierzchni komórki nowotworowej zachodzi internalizacja kompleksu do jej wnętrza. Kolejnym etapem jest uwolnienie części toksycznej do cytoplazmy, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki [5]. Najważniejszą cechą odróżniającą immunotoksyny od konwencjonalnej chemioterapii jest wybiórczość działania – projektowane cząsteczki w założeniu mają trafić tylko pod wskazany adres – do komórki nowotworowej, oszczędzając inne komórki prawidłowe, także te wykazujące intensywny metabolizm [6]. Dodatkowo immunotoksyny działają na komórki wykazujące mniejszą intensywność podziału, a także na komórki nieaktywne [7].

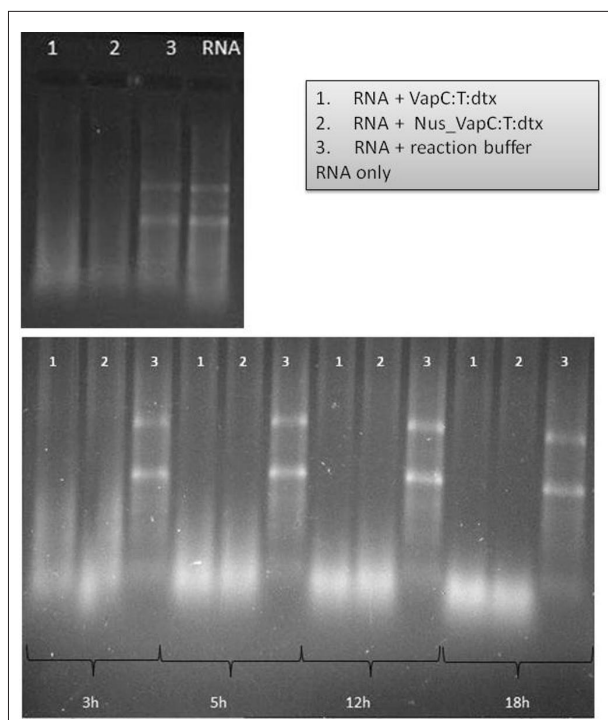
Istnieją jednak pewne ograniczenia utrudniające zastosowanie immunotoksyn w lecznictwie. Główna przeszkoda jest związana z ich dużą immunogennością i niewystarczającą specyficznością działania [6, 8]. Do tej pory najlepsze rezultaty w badaniach *in vivo* osiągnięto w terapiach nowotworów hematologicznych. Tylko jedna immunotoksyna – *Denileukin diftotox* (preparat OntakTM) – uzyskała pozwolenia rejestracyjne FDA i jest stosowana w terapii chłoniaków skórnych T-komórkowych [9]. Obecnie w fazie badań na różnym etapie znajduje się kilka immunotok-

syn [3]. W przypadku guzów litych wyniki są zdecydowanie mniej obiecujące. Związane jest to głównie ze specyficznym środowiskiem guza nowotworowego: komórki w jego wnętrzu są ściśle upakowane, występuje zwiększone ciśnienie śródmiąższowe, zakłócona jest równowaga kwasowo-zasadowa, znacznie upośledzone jest też ukrwienie. Wymienione czynniki oraz dodatkowo duży rozmiar cząsteczek immunotoksyn są przyczyną słabej penetracji leku do wnętrza guza [10].

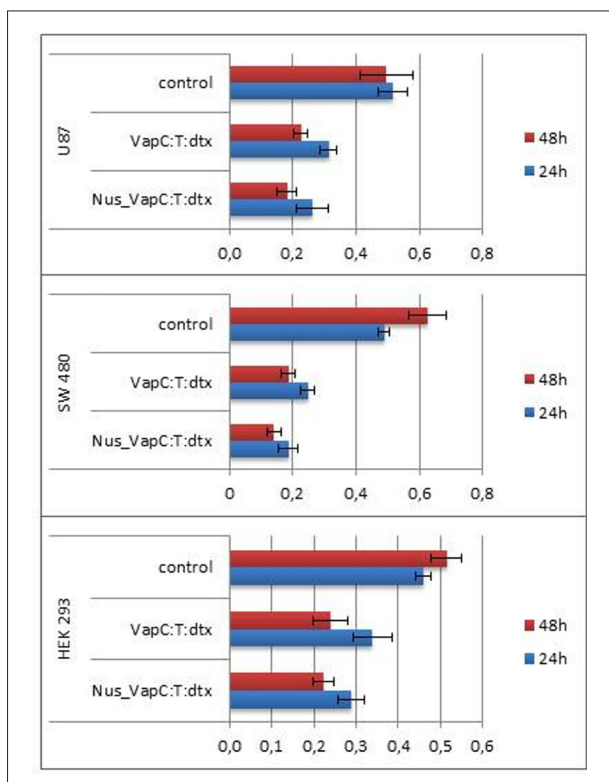
By zmniejszyć immunogenność toksyn pochodzenia bakteryjnego lub roślinnego, próbuje się je zastąpić białkami endogennymi o charakterze proapoptotycznym lub niewielkimi białkami o niskiej immunogenności wykazującymi aktywność RNazową. Ciekawą alternatywą wydają się niewielkie toksyny bakteryjne zorganizowane w tzw. moduły addykcyjne (systemy toksyna-antytoksyna). Po raz pierwszy opisano je jako systemy odpowiedzialne za utrzymanie plazmidowego DNA w populacji. W późniejszych badaniach ujawniono ich zaangażowanie w programowaną śmierć komórkową oraz usuwaniu nieprawidłowych transkryptów [11, 12]. Na system TA (toksyna-antytoksyna) składają się zazwyczaj dwa komponenty: stabilna toksyna oraz labilna antytoksyna. W przypadku gdy oba produkty są obecne w komórce, ulega hamowaniu aktywność toksyny. Gdy komórka utraci geny kodujące system TA (np. po stracie plazmidu), pula antytoksyny jako bardziej labilnej zmniejsza się szybciej, pozostawiając aktywne toksyny, które w efekcie uśmiercają komórkę [12]. Opisano do tej pory 5 różnych klas systemów toksyna-antytoksyna, spośród których najlepiej poznana jest klasa II, gdzie oba składniki są białkami o niewielkich rozmiarach (90-130 aminokwasów) [13].

CEL PRACY

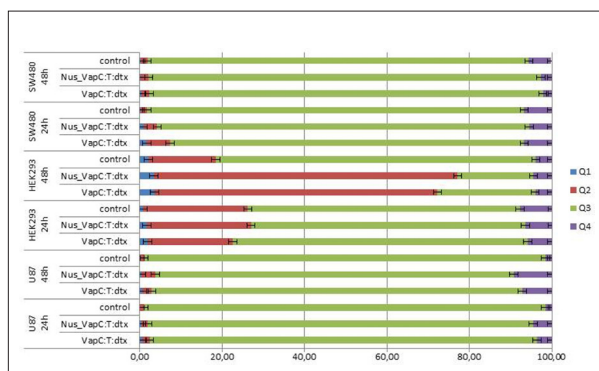
Celem niniejszej pracy było przetestowanie wybranych toksyn pochodzących z prokariotycznych modułów addykcyjnych pod kątem ich przydatności w konstrukcji immunotoksyn. Toksyny te jako niewielkie, stabilne białka o bardzo konserwatywnej, mało immunogennej budowie i aktywności rybonukleazowej wydają się interesującą alternatywą do obecnie stosowanych. Do badań wytypowano toksynę MazF pochodzącą z chromosomu *Escherichia coli*, toksynę PasB z DNA plazmidu pTF-FC2 wyizolowanego z *Thiobacillus ferrooxidans* (pozyskanego dzięki uprzejmości prof. D.E. Rawling) oraz VapC 2829 pochodzącą z chromosomu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (pozyskanego dzięki uprzejmości prof. J. Dziadka). W toku przygotowań zrezygnowano jednak z dalszych badań nad toksynami MazF



Ryc. 1. Aktywność RNazowa badanego białka. Rycina górna przedstawia aktywność białka po godzinie inkubacji z ludzkim RNA, dolna kolejno po inkubacji przez 3, 5, 12 i 18 godzin. Ścieżki nr 1 przedstawiają aktywność białka pozbawionego Nus-Tag, ścieżki nr 2 – aktywność białka z Nus-Tag, ścieżki nr 3 – kontrolę w postaci RNA z buforem reakcyjnym. Intensywność prążków analizowano densytometrycznie.



Ryc. 2. Analiza przeżywalności komórek nowotworowych wybranych linii komórkowych HEK 293, U 87, SW 480 wobec badanego białka po 24- i 48-godzinnej ekspozycji. Oznaczenie wykonano przy stężeniu białka 100 µg/ml.



Ryc. 3. Cytometryczna analiza aktywności badanego białka wobec wybranych linii komórkowych: Q1 – komórki nekrotyczne, Q2 – komórki późnoapoptotyczne, Q3 – komórki żywe, Q4 – komórki wczesnoapoptotyczne.

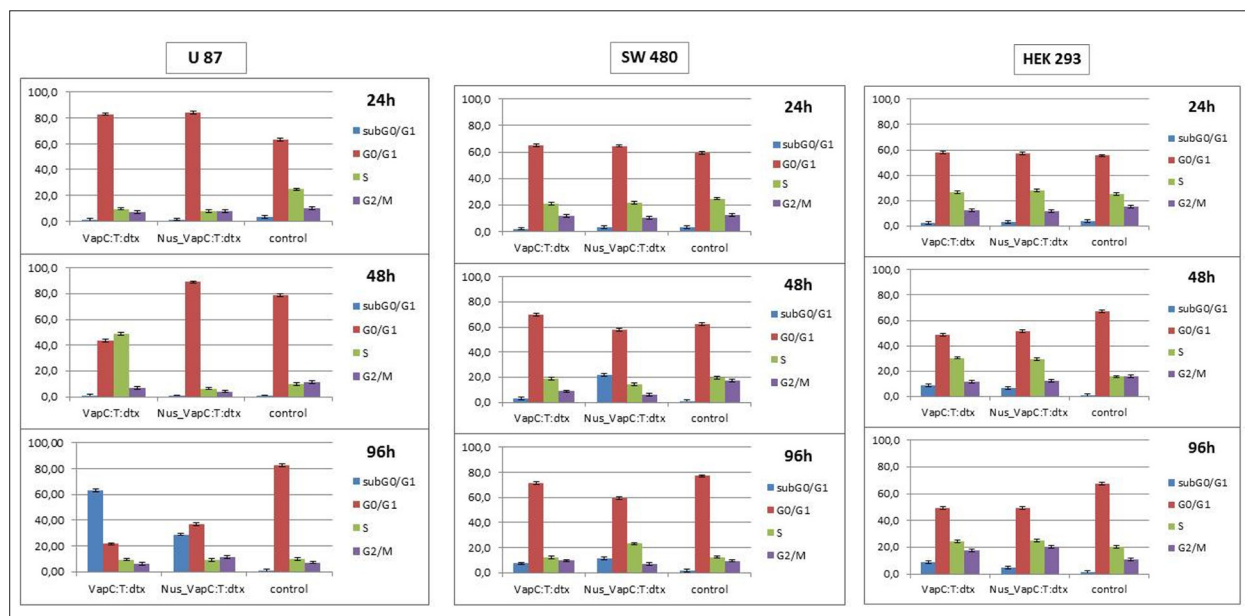
oraz PasB ze względu na trudności w pracy z ich konstruktami. Ostatecznie do badania komponentów modułów addykcyjnych pod kątem przydatności w konstrukcji immunotoksyn wytypowano toksynę VapC 2829.

WYNIKI

Odpowiednio przygotowany konstrukt białka fuzyjnego zawierał sekwencje toksyny VapC, łącznika (T) odpowiedzialnego za translokację części toksycznej do cytozolu z pęcherzyka endocytarnego oraz fragment receptorowy z domeną transbłonową (:Dtx_R) pochodzący z toksyny błoniczej (pozyskany dzięki uprzejmości prof. S. Olsena). Po kilku etapach przygotowań uzyskano właściwe białko, które przeznaczono do dalszych analiz.

Białko fuzyjne zostało poddane testowi *in vitro* na aktywność RNazową. W teście zbadano aktywność wyjściowego białka zawierającego Nus-Tag oraz jego gotową formę po odcięciu wszystkich domen pomocniczych. W obu przypadkach białko wykazywało aktywność RNazową (ryc. 1), jednak po obróbce proteolitycznej jego aktywność jest nieznacznie wyższa. Oznacza to, że dołączony Nus-Tag jedynie w niewielkim stopniu wpływa na obniżenie aktywności badanego białka fuzyjnego.

Wykorzystując technikę cytometrii przepływowej oraz testy przeżywalności, oceniono aktywność badanego białka na 3 wyselekcjonowanych liniach nowotworowych: HEK 293, SW 480 oraz U87 MG. W przypadku oznaczeń wykonanych cytometrem komórki barwiono jodkiem propidyny (w celu uwidocznienia komórek martwych) oraz antyciałem przeciw aneksynie V połączonym z FITC (AnnexinV-FITC, BD), uwiadczniającym komórki wcze-



Ryc. 4. Analiza cyklu komórkowego badanych linii komórkowych.

snoapoptotyczne. W oznaczeniach przeżywalności stosowano także test biochemiczny MTT. Inkubację z badanym właściwym białkiem oraz białkiem zawierającym Nus-Tag prowadzono przez 24 i 48 godzin. W przypadku wszystkich linii zaobserwowano istotny statystycznie spadek przeżywalności w odpowiedzi na ekspozycję na badane białko fuzyjne (ryc. 2).

W wyniku przeprowadzonych oznaczeń stwierdzono, że istnieje duża różnica w aktywności pomiędzy badanymi liniami. Najwrażliwsza na działanie badanego białka fuzyjnego jest linia HEK 293 (ryc. 3). W przypadku tej linii zaobserwowano statystycznie istotny wzrost populacji komórek późnoapoptotycznych po 48 godzinach inkubacji w porównaniu z komórkami żywymi. W przypadku pozostałych linii aktywność okazała się znacząco niższa, w zakresie lub niewiele powyżej błędu statystycznego.

Dla wspomnianych wyżej linii nowotworowych wykonano również testy obrazujące, czy badane białko fuzyjne wpływa na cykl komórkowy linii nowotworowej. Po określonym czasie inkubacji (24, 48 i 96 godzinach) komórki utrwalano, barwiono jodkiem propidyny i oznaczano przy użyciu cytometru przepływowego. Spośród badanych linii najwrażliwsza na działanie białka okazała się linia U 87. Po 24 godzinach inkubacji zaobserwowano zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1, z kolei po 96 go-

dzinach stwierdzono wzrost liczebności populacji subG0/G1. W przypadku linii SW 480 oraz HEK 293 nie zaobserwowano istotnego wpływu badanego białka fuzyjnego, choć widoczny jest niewielki wzrost populacji komórek w fazie subG0/G1 w porównaniu z kontrolą (ryc. 4).

WNIOSKI

Wyniki niniejszej pracy pokazują, że białko fuzyjne zawierające toksynę VapC wykazuje aktywność RNazową. Również prekursor toksyny zawierający składnik Nus wykazuje tego typu aktywność, która okazała się nieznacznie niższa od dojrzałego białka. Badane białko ma właściwości proapoptotyczne w stosunku do linii HEK 293, zwiększając istotnie liczebność populacji komórek późnoapoptotycznych po 48 godzinach inkubacji. Z kolei w przypadku linii U 87 białko fuzyjne powoduje zatrzymanie cyklu w fazie G0/G1, co może wynikać z posiadania przez nie właściwości rybonukleazowych. Trawiąc całkowite RNA, doprowadza do zahamowania syntezy białek w komórce. W efekcie niemożności syntezy niezbędnych białek podziałowych następuje areszt w fazie G0/G1. Badane białko wpływa na cykl komórkowy linii U 87, zwiększając liczebność populacji subG0/G1 świadczącej o nasilonej fragmentacji DNA w czasie śmierci komórki. Badane białko nie wykazuje właściwości proapoptotycznych ani nie wpływa na cykl komórkowy linii SW 480.

PIŚMIENNICTWO

1. Serkova N.J., Eckhardt S.G., Metabolic Imaging to Assess Treatment Response to Cytotoxic and Cytostatic Agents, *Front Oncol.*, 2016; 6: 152.
2. Takimoto C.H., Calvo E., Principles of oncologic pharmacotherapy, [w:] Pazdur R., Wagman L.D., Camphausen K.A., Hoskins W.J., editors, *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. Londyn, Wielka Brytania, UBM Medica, 2008; 42-58.
3. Alewine C., Hassan R., Pastan I., Advances in anticancer immunotoxin therapy, *Oncologist*, 2015; 20: 176-185.
4. Choudhary S., Mathew M., Verma R., Therapeutic potential of anticancer immunotoxins, *Drug Discov Today*, 2011; 16: 495-503.
5. Dosio F., Brusa P., Cattel L., Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components, *Toxins*, 2011; 3: 848-883.
6. Kreitman R.J., Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies, *Bio Drugs*, 2009; 23: 1-13.
7. Hassan R., Alewine C., Pastan I., New Life for Immunotoxin Cancer Therapy, *Clin Cancer Res.*, 2016; 22: 1055-1058.
8. Li Z., Yu T., Zhao P. et al., Immunotoxins and Cancer Therapy, *Cell Mol Immunol.*, 2005; 2: 106-112.
9. Antignani A., Fitzgerald D., Immunotoxins: the role of the toxin, *Toxins*, 2013; 5: 1486-1502.
10. Messmer D., Kipps T.J., Treatment of solid tumors with immunotoxins, *Breast Cancer Res.*, 2005; 7: 184-186.
11. Guglielmini J., Van Melder L., Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere, *Mob Genet Elements*, 2011; 1: 283-290.
12. Engelberg-Kulka H., Hazan R., Amitai S., mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria, *J Cell Sci.*, 2005; 118: 4327-4332.
13. Unterholzner S.J., Poppenberger B., Rozhon W., Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application, *Mob Genet Elements*, 2013; 3: e26219.

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji. Zeszyty Naukowe Fundacji Polpharmy to czasopismo naukowe publikujące przeglądowe i pogładowe prace naukowe powstałe na podstawie projektów badawczych finansowanych ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy. Tematyka prac publikowanych w czasopiśmie obejmuje wiele zagadnień z zakresu medycyny i farmacji. **Celem publikacji jest prezentacja osiągnięć Autorów projektów finansowanych przez Fundację w odniesieniu do stanu wiedzy w obszarze nauki, którego dotyczył realizowany projekt.**

Skład Rady Naukowej gwarantuje wysoki poziom publikowanych prac.

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji ukazują się raz w roku. Redakcja przyjmuje do druku artykuły w języku polskim lub angielskim, przy czym tytuł, streszczenie, słowa kluczowe i afiliacje powinny być dodatkowo napisane w języku angielskim (lub polskim w przypadku prac anglojęzycznych).

Redakcja *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* uznaje zasady zawarte w Deklaracji helsińskiej i w związku z tym oczekuje od autorów, aby wszelkie badania wykonane z udziałem człowieka zostały przeprowadzone zgodnie z tymi zasadami.

REGULAMIN RECENZOWANIA I PRZYJMOWANIA PRAC

Redakcja rozpatruje nadesłane prace, które zostaną uznane przez recenzentów i redaktorów za właściwe pod względem tematyki i stanowiące oryginalny wkład do postępu w nauce i/lub praktyce klinicznej lub mają pożądaną wartość dydaktyczną (szkoleniową). Podpis pierwszego autora pod oświadczeniem jest równoznaczny ze stwierdzeniem, że:

- złożona praca jest własna,
- wszyscy autorzy wyrażają zgodę na publikację przedstawionego materiału.

Otrzymany manuskrypt jest na wstępie oceniany przez zespół redakcyjny *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* pod względem poprawności przygotowania manuskryptu, dokumentacji fotograficznej, obecności zgody wszystkich autorów na publikację. Manuskrypty niekompletne będą zwracane autorom do uzupełnienia bez analizy merytorycznej.

Manuskrypt, co do którego nie ma uwag wstępnych, zostaje opatrzony kolejnym numerem, o którym informuje się autora korespondencyjnego. Maszynopis każdej pracy poddaje się recenzjom. Kompetentnych recenzentów wyznacza Redaktor Naczelny. Recenzenci przygotowują opinie, które zawierają uzasadnione zalecenia i sugestie poprawek i uzupełnień treści i formy artykułu. Recenzje są anonimowe.

Dyskwalifikacja nadesłanego maszynopisu wymaga dwóch negatywnych recenzji. Redaktor Naczelny zastrzega sobie prawo odmowy druku pracy zawierającej wyniki badań, w których nie

przestrzegano zasad etycznych eksperymentu klinicznego sformułowanych w Deklaracji Światowego Zgromadzenia Medycznego w Helsinkach w roku 1964, w Tokio w roku 1975 i w zaleceniach Światowej Organizacji Zdrowia w 1982 roku.

Ostateczna decyzja o przyjęciu pracy do druku lub jej odrzuceniu należy do uprawnień Rady Naukowej i nie podlega odwołaniu. Podjętych decyzji Rada Naukowa nie musi uzasadniać.

Proces recenzowania pracy nie powinien trwać dłużej niż 3-4 tygodnie, jednak Redakcja nie może zagwarantować określonego terminu podjęcia decyzji.

ZEZWOLENIA NA DRUK

Materiałom wykorzystanym z innych źródeł musi towarzyszyć pisemna zgoda pierwszego autora oraz wydawcy pierwotnej publikacji, w której materiał ten został opublikowany i w której wyrażona jest zgoda na przedruk na łamach *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji*.

W stosunku do prac, które są w trakcie przygotowania do druku, należy uzyskać zgodę na piśmie od autorów, osoby, jak również Redakcji czasopisma, które udostępniło dane niepublikowane lub informacje ustne wykorzystywane w artykule.

POUFNOŚĆ INFORMACJI O PACJENCIE

Zmiana danych biograficznych pacjenta w celu ochrony tożsamości stanowi manipulację danych i nie powinno do niej dochodzić. Niemniej jednak autorzy prac naukowych mają obowiązek ochraniać dane osobowe pacjenta. Publikować należy wyłącznie informacje o znaczeniu naukowym lub klinicznym. W związku z tym jeżeli zawarte w artykule informacje umożliwiają w jakikolwiek sposób ustalenie tożsamości badanej osoby, autorzy muszą uzyskać pisemną zgodę tej osoby lub jej opiekuna na opublikowanie jej wyników, w tym zdjęć fotograficznych, obrazów radiologicznych i innych, przed złożeniem pracy do druku. Szczegóły dotyczące rasy, pochodzenia etnicznego, kulturowego i religii osoby badanej powinny być podane wyłącznie w przypadku, gdy zdaniem autora wywierają wpływ na przebieg choroby i/lub leczenia dyskutowanego w danym tekście.

PRAWA AUTORSKIE

Po akceptacji pracy do druku autorzy przekazują prawa autorskie Naukowej Fundacji Polpharmy. Od momentu akceptacji pracy do druku w *Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji* informacji w niej zawartych nie wolno ujawnić w prasie do czasu ukazania się numeru czasopisma, w którym artykuł występuje.

Po akceptacji pracy do druku złożone materiały stają się własnością Naukowej Fundacji Polpharmy i nie mogą się ukazywać w innej publikacji bez pisemnej zgody Naukowej Fundacji Polpharmy.

Za datę przyjęcia do druku uważa się datę nadesłania ostatecznej wersji artykułu. Redakcja dostarcza jeden egzemplarz czasopisma każdemu autorowi opublikowanej pracy.

ODPOWIEDZIALNOŚĆ CYWILNA

Wydawca i Rada Naukowa czynią wszelkie starania, aby zapewnić rzetelność informacji, opinii i stwierdzeń zawartych w artykule ukazującym się w *Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji*. Niemniej jednak za treść artykułów i reklam odpowiada wyłącznie autor, sponsor lub firma marketingowa. Zgodnie z powyższym ani Wydawca, ani Rada Naukowa, ani Naukowa Fundacja Polpharmy nie ponoszą odpowiedzialności za skutki ewentualnych nierzetelności.

Redakcja stara się zapewnić w zakresie publikacji rzetelność dawkowania leków i innych danych ilościowych. Jednakowoż Redakcja zaleca czytelnikom, aby wszystkie metody i techniki polegające na podawaniu leków opisane w *Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji* były stosowane wyłącznie zgodnie z instrukcjami i zaleceniami producentów leków lub sprzętu, wydanymi w kraju danego czytelnika.

KATEGORIE ARTYKUŁÓW

Redakcja *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* przyjmuje do druku:

- **prace przeglądowe**, tj. doniesienia przedstawiające obecny stan wiedzy na dany temat ze szczególnym uwzględnieniem bieżących kontrowersji, podejścia teoretycznego i praktycznego do zagadnienia, nierozwiązanych problemów itp., uwzględniające właściwie dobrane piśmiennictwo;
- **prace poglądowe**: opisy dotyczące ważnych zagadnień, kontrowersji i opinii w medycynie i farmacji, teksty dydaktyczne (szkoleniowe);
- **krótkie doniesienia**: opisy wybranych rozwiązań klinicznych w przypadku konkretnych problemów, ewentualnie nowe odkrycia jeszcze niepotwierdzone eksperymentalnie.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW

Niniejszy regulamin jest zgodny z wytycznymi opracowanymi przez Wspólny Komitet Wydawców Czasopism Biomedycznych, opublikowanymi w opracowaniu pt.: „Jednolite wymagania dotyczące prac złożonych do druku w czasopismach biomedycznych” (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals N Eng J Med 1997; 336: 309-15; www.acponline.org/journals/resource/unifreq.htm).

PRZYGOTOWYWANIE I NADSYŁANIE MANUSKRYPTÓW

Tekst

Manuskrypt powinien być przygotowany w dowolnej wersji Microsoft Word. Tekst należy pisać czcionką 12-punktową *Times New Roman* z odstępami półtoręj linii między wierszami.

Tabele

Tabele można nadsyłać w dowolnej wersji edytora tekstowego Microsoft Word lub arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel.

Wykresy

Wykresy lub diagramy powinny być nadesłane w postaci plików:

- Microsoft Word (wklejone rysunki),
- prezentacji Microsoft Power Point,
- wykresów arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel,
- graficznych o rozszerzeniach *.jpg, *.gif, *.tiff.

Każdy wykres lub diagram powinien być zawarty w oddzielnym pliku. W przypadku użycia jakiegokolwiek innego oprogramowania (np. statystycznego) prosimy o kontakt z redakcją w celu uzgodnienia szczegółów dotyczących wybranego formatu wykresu.

Ryciny

Ryciny powinny być przygotowane w rozdzielczości 300 dpi lub większej w formacie *.pdf, *.eps lub *.jpeg.

Strona tytułowa

Praca powinna mieć stronę tytułową, na której znajdują się następujące informacje:

- pełny tytuł artykułu w języku polskim i angielskim,
- imię i nazwisko każdego autora (bez tytułów), jednostkę organizacyjną każdego autora (miejsce pracy),
- streszczenie w języku polskim i angielskim,
- 3-6 słów kluczowych w języku polskim i angielskim,
- imię i nazwisko, tytuł, adres, numer telefonu i/lub faksu, e-mail autora, który odpowiada za przygotowanie pracy do druku,
- źródła wsparcia materialnego w postaci grantów i dotacji, subwencji, sprzętu, leków itp.

Streszczenia

Streszczenia nie powinny przekraczać 250 słów.

W tekście pracy należy zamieścić w postaci wyodrębnionych tabel następujące zestawienia:

1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu;
2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy;
3. Dalsze kierunki badań (opcjonalnie).

Przed piśmiennictwem w razie potrzeby można załączyć **podziękowania**. Podkreśla się w nich wkład wszystkich osób, które pomagały w prowadzeniu badań i które nie spełniają kryteriów włączenia do zespołu autorów, np. asystentów, techników, kierowników jednostek dających tylko ogólne wsparcie. Autorzy mają obowiązek ujawnić fakt otrzymywania wsparcia finansowego lub materialnego.

Piśmiennictwo zawiera pozycje z literatury ponumerowane w kolejności ich występowania w tekście (*styl Vancouver*), wybrane pod względem ważności, aktualności i dostępności. Pozycje występujące po raz pierwszy w tabelach lub rycinach należy ponumerować tak, aby utrzymać kolejność z pozycjami cytowanymi w tekście.

DOPUSZCZALNE FORMATY CYTOWANIA

We wszystkich przypadkach prosimy o zwrócenie uwagi na stosowane znaki interpunkcyjne oddzielające poszczególne pola bibliograficzne cytowanej pozycji. Źródła internetowe z racji łatwości zmian lub korekt powinny zawierać datę pobrania bądź przejrzenia pliku. Podając listę autorów, należy użyć zwrotu „i wsp.”, jeśli liczba autorów cytowanej pozycji jest wyższa niż 3.

Typowy artykuł w czasopiśmie

Lichtenstein G.R., Hanauer S.B., Sandborn W.J.: Management of Crohn's disease in adults, *Am J Gastroenterol*, 2009; 104: 465-83.

Ten sam artykuł z uwagi na pomyłki redakcyjne z opublikowaną później erratą

Koffler D., Reidenberg M.M.: Antibodies to nuclear antigens in patients treated with procainamide or acetylprocainamide [errata opublikowana w: *N Engl J Med*, 1979; 302: 322-5], *N Engl J Med*, 1979, 301: 1382-5.

Artykuł opublikowany wyłącznie elektronicznie

Drayer D.E., Koffler D.: Factors in the emergence of infectious diseases, *Emerg Infect Dis* [periodyk online], 1995, Jan-Mar [cytowany 1996.06.05]; 1(1): [24 ekrany]. Dostępny pod adresem URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Artykuł bez autora

Cancer in South Africa [tekst redakcyjny], *S Afr Med J*, 1994; 84: 15.

Monografia z określonym/określonymi autorem/autorami

Ringsven M.K., Bond D.: Gerontology and leadership skills for nurses. II wyd. Albany, Nowy Jork, Delmar Publishers, 1996.

Książka redagowana

Norman U., Redfern S.J. redd.: Mental health care for elderly people, Nowy Jork, Churchill Livingstone, 1996.

Książka wydana przez organizację

Institute of Medicine (US), Looking at the Future of the Medical Program, Waszyngton, The Institute, 1992.

Rozdział w książce

Phillips S.J., Whisnant J.R.: Hypertension and stroke, w: Laragh J.H., Brenner B.M. editors: Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management, II wyd., Nowy Jork, Raven Press, 1995, 465-78.

Materiały kongresowe

Kimura J., Shibasaki H. redd.: Recent advances in clinical neurophysiology, materiały z X Międzynarodowego Kongresu EMG i Neurofizjologii Klinicznej, 1995.10.15-19, Kioto, Japonia, Amsterdam, Elsevier, 1996.

Referat

Bengtsson S., Solheim B.G.: Enforcement of data protection, privacy and security in medical information, w: Lun K.G., Oegoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O. redd.: MEDINFO 92, materiały z VII Światowego Kongresu nt. Informatyki Medycznej, 1992.09.6-10, Genewa, Szwajcaria.

Nie należy cytować, na ogół, abstraktów, niepublikowanych danych ani informacji ustnej. Jeżeli jednak są one niezbędne (dotyczą własnych wyników zamieszczonych w pracach będących w druku lub szykowanych do niego), można je włączyć do tekstu w odpowiednim miejscu.

TABELE I ILUSTRACJE

Tabele mają swoją numerację w kolejności występowania pierwszego odwołania w tekście oraz krótki tytuł. W nagłówkach kolumn stosuje się krótkie hasła lub skróty. Wskazany jest najprostszy możliwy układ tabeli, bez zbędnych poziomych lub pionowych linii podziału. Wyjaśnienia, w tym tłumaczenia niestandardowych skrótów, należy umieścić w przypisach pod tabelą, nie zaś w samej tabeli. Dolne przypisy pod tabelą należy ponumerować odrębnie, zaczynając od 1 dla każdej tabeli. Należy się upewnić, czy każda tabela jest wymieniona w tekście.

Należy przedstawić pomiary statystyczne odmiennie, jak np. odchylenie standardowe, standardowy błąd pomiaru średniej. Jeżeli dane pochodzą z innego źródła opublikowanego lub niepublikowanego, należy uzyskać zgodę i podać źródło w pełnym cytacie.

Ryciny i zdjęcia powinny być wykonane profesjonalnie; nie dopuszczalne są napisy ręczne. Redakcja przyjmuje ryciny i zdjęcia w formie elektronicznej w możliwie najwyższej jakości (rozdzielczość min. 300 dpi). Litera, cyfry i symbole muszą być wszędzie jasne i równomierne i mieć taki rozmiar, aby po zmniejszeniu w celu drukowania pozostały czytelne. Tytuły i wyjaśnienia należy pisać w podpisach, nie zaś na samych rycinach.

Ryciny powinny być ponumerowane w kolejności występowania pierwszego odwołania w tekście. Należy się upewnić, czy każda rycina jest wymieniona w tekście. Jeżeli dana rycina została już opublikowana, należy podać źródło i uzyskać pisemną zgodę osoby mającej prawa autorskie na przedruk materiału za wyjątkiem dokumentów stanowiących dobro publiczne. Zdjęcia mogą być kolorowe lub czarno-białe. Redakcja drukuje standardowo zdjęcia w postaci czarno-białej. Istnieje możliwość wydrukowania zdjęcia w pełnym kolorze, po konsultacji z Redakcją.

Zdjęcia mikroskopowe powinny mieć wewnętrzne oznaczenie skali. Używane w zdjęciu mikroskopowym symbole, strzałki i litery powinny być w kolorze kontrastującym z tłem. W przypadku fotografii badanych osób albo należy ukryć ich tożsamość, albo uzyskać pisemną zgodę na opublikowanie zdjęcia. Redakcja przyjmuje zdjęcia w formie elektronicznej w możliwie najwyższej jakości (rozdzielczość min. 300 dpi).

Legendy pod rycinami należy numerować cyframi arabskimi odpowiadającymi kolejnym rycinom.

Jednostki miary. Pomiary długości, wysokości, wagi i objętości powinny być podane w jednostkach metrycznych (np. metr, kilogram, litr i inne) lub w systemie dziesiętnym (np. decymetry). Temperatura musi być podana w stopniach Celsjusza. Ciśnienie tętnicze powinno być podane w milimetrach słupa rtęci. Wszystkie kliniczne pomiary hematologiczne i chemiczne powinny być podane w systemie metrycznym według Międzynarodowego Systemu Miar (SI). Alternatywne jednostki, niepocho- dzące z tego systemu, powinny być dodane w nawiasach.

Skróty i symbole. Redakcja wymaga stosowania jedynie standardowych skrótów. Nie należy używać skrótów w tytule ani w streszczeniach. Pełna wersja terminu, dla którego używa się danego skrótu, musi być podana przed pierwszym wystąpieniem skrótu w tekście za wyjątkiem standardowych jednostek miar.

WYSŁANIE ARTYKUŁU DO CZASOPISMA

Autorzy są proszeni o przesłanie manuskryptu drogą elektroniczną na adres: office@indexcopernicus.com.

Manuskryptowi powinien towarzyszyć list przewodni podpisany, w miarę możliwości, przez wszystkich autorów. List ten powinien zawierać:

1. **Oświadczenie** dotyczące statusu danej pracy, faktu, że nie była dotąd opublikowana albo że została opublikowana częściowo w innej redakcji, według wytycznych zawartych powyżej;
2. **Zaświadczenie** ujawniające istnienie ewentualnych związków finansowych (w tym informacje dotyczące np. grantu, z podaniem źródła i numeru grantu) lub powiązań mogących budzić zastrzeżenia;
3. **Oświadczenie**, że wszyscy autorzy czytali i potwierdzili, że określone powyżej wymagania dotyczące współautorstwa zgodnie z powyższym zostały spełnione oraz że każdy autor uważa, że złożony tekst stanowi rzetelną pracę wszystkich wymienionych autorów;
4. **Dane personalne, adres i telefony głównego autora**, który odpowiada za porozumiewanie się z pozostałymi autorami w sprawach dotyczących ewentualnych korekt i końcowego zatwierdzenia „szczotki” autorskiej do druku (jeżeli autor nie poda odrębnego adresu do korespondencji dla czytelników, adres ten zostanie wydrukowany na końcu opublikowanej pracy jako „adres do korespondencji”).

Należy załączyć również zgody na przedruki opublikowanych materiałów, na wykorzystanie reprodukcji publikowanych materiałów, na użycie zdjęć lub podawanie danych o osobach, których tożsamość można ustalić, oraz zgody na imienne wyróżnienie osób za ich wkład.

Redakcja *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* uważa ww. warunki za spełnione, jeżeli złożony zostanie podpis pierwszego autora.

KOMPLET MATERIAŁÓW NALEŻY PRZESŁAĆ DO REDAKCJI NA ADRES:

Index Copernicus sp. z o.o.
Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji
ul. Żurawia 6/12, 00-503 Warszawa
tel.: +48 22 487 53 93
e-mail: office@indexcopernicus.com

Jesteśmy największym polskim producentem leków i substancji farmaceutycznych. Naszym mottem jest hasło „Ludzie pomagają Ludziom”. Od ponad 80 lat cieszymy się zaufaniem lekarzy, farmaceutów i pacjentów, wytwarzając leki wysokiej jakości, bezpieczne i skuteczne.



Dynamicznie rozwijamy się
w regionie Europy
Środkowo-Wschodniej
i Azji Centralnej.



Jesteśmy liderem
polskiego rynku
farmaceutycznego.



7500

Zatrudniamy ok. 7500
pracowników w Polsce
i za granicą.



Wdrażamy najlepsze
praktyki społecznej
odpowiedzialności biznesu.



Stworzyliśmy jedno
z najnowocześniejszych
laboratoriów
biotechnologicznych
w Europie.



Zajmujemy 1. miejsce wśród
polskich firm pod względem
liczby europejskich
zgłoszeń patentowych.



Od 2000 r. zainwestowaliśmy
ponad 1,5 mld zł w badania
i rozwój – najwięcej
w polskiej farmacji.



Przeznaczyliśmy ok. 20 mln zł
na rozwój polskiej nauki
i działalność Naukowej
Fundacji Polpharmy.

Jesteśmy dumni z naszego rozwoju



www.polpharma.pl/fundacja