

Powstrzymać śmierć

Aż 7,6 miliona ludzi rocznie umiera na nowotwory. Mimo iż statystyki są wystarczająco przerażające, specjaliści nie zapowiadają poprawy. Wręcz przeciwnie, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że w 2030 roku liczba ofiar może zwiększyć się do... 17 milionów!

Joanna Stojak

Najczęściej atakuje i zabija rak piersi oraz rak płuc. W dobie diagnostyki molekularnej lekarze zalecają wykonywanie testów genetycznych, które z powodzeniem umożliwiają wcześniejszą diagnostykę. Cena takiej analizy może być jednak wysoka – nie tylko ze względów finansowych. W Polsce obecnie wykonuje się testy genetyczne dla około 300 chorób, w tym nowotworów (np. gen BRCA1 w przypadku nowotworu piersi). Najczęściej badaniom poddają się osoby, w których rodzinie udokumentowano chorobę nowotworową, bywają jednak i pacjenci chcący poznać obciążenia genetyczne z ciekawości lub „na wszelki wypadek”.

W Polsce obecnie wykonuje się testy genetyczne dla około 300 chorób, w tym nowotworów (np. gen BRCA1 w przypadku nowotworu piersi). Najczęściej badaniom poddają się osoby, w których rodzinie udokumentowano chorobę nowotworową, bywają jednak i pacjenci chcący poznać obciążenia genetyczne z ciekawości lub „na wszelki wypadek”.

Występowanie danego markera genetycznego podnosi ryzyko wystąpienia choroby u nosiciela, nie jest jednak jednoznaczne z zachorowaniem. Składnik genetyczny stanowi część niezwykle zawiłego procesu kancerogenezy, w którym pierwszoplanową rolę odgrywają czynniki środowiskowe, na które jesteśmy podatni.

Proces kancerogenezy wywołany jest przez czynniki mutagenne (promieniowanie UV, wirusy, toksyny), które *de facto* wcale nie

zawsze powodują bezpośrednio dalsze uszkodzenia, prowadząc jednak do wytworzenia głównych winowajców – czynników pośrednich (np. wolnych rodników tlenowych). Organizm człowieka uzbrojony jest w mechanizmy antymutagenne – przeciwutleniacze (witaminy C i E, glutation, dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa) oraz systemy naprawy DNA (bezpośrednie i bardziej zaawansowane pośrednie). Najbardziej niebezpiecznymi zmianami są mutacje w genach odpowiedzialnych za kontrolę cyklu komórkowego i ewentualną samobójczą śmierć komórki – apoptozę (należy do nich na przykład białko p53 określane mianem supresora nowotworowego). Uszkodzenie tych rejonów DNA prowadzi do powstania nowotworu, umożliwiając przerost nieprawidłowej tkanki nad pozostałymi. Wymusza to rozpoczęcie w zmienionym rejonie procesu angiogenezy (tworzenie nowych sieci naczyń krwionośnych, doprowadzających składniki odżywcze do przerosniętej tkanki, a także umożliwiających rozprzestrzenianie się nowotworu po całym organizmie, czyli przerzuty).

Powstaje pytanie, czy warto narażać się na stres, żyjąc ze świadomością o genetycznej podatności, ryzyku, które może nie nadejść nigdy lub w każdej chwili. Co więcej, warto wspomnieć, iż do tej pory nie zidentyfikowano żadnych markerów genetycznych dla nowotworów jelita grubego, płuc czy prostaty, a niektóre laboratoria diagnostyczne w Polsce oferują takie testy!

Onkologiczny oręż

Onkologia jest nauką łaknącą nowych odkryć, umożliwiających wyprzedzenie nowotworów przo-

dujących w trwającej od lat walce. Początkowo jedyną metodą leczenia było chirurgiczne usunięcie nieprawidłowej tkanki, obecnie stosuje się także leki przeciwnowotworowe. W chemioterapii wykorzystywane są głównie leki cytostaticzne, a także leki hormonalne, leki celowane molekularnie czy przeciwciała monoklonalne, natomiast w radioterapii – promieniowanie jonizujące. Leki cytostaticzne zabijają komórki dzielące się, co jest jednoznaczne z niszczeniem nie tylko komórek nowotworowych, ale i zdrowych komórek pacjenta.

Wywołuje to nudności i wymioty, prowadzi do łysienia, uszkodzenia szpiku, głównych organów (m.in. nerek, płuc, serca) czy układów (m.in. odpornościowego, pokarmowego, nerwowego). Nic dziwnego, że zdesperowani pacjenci gotowi są poddać się leczeniu eksperymentalnemu, a naukowcy pracują pod olbrzymią presją, poszukując preparatów i metod bardziej skutecznych, a jednocześnie wywołujących mniej powikłań.

Immuno-nadzieja?

Układ immunologiczny pozostaje obojętny na kancerogenezę do momentu pojawienia się pierwszych zmian nowotworowych. Naukowcy zauważyli jednak, iż działanie to jest niezwykle sprytnie hamowane przez nowotwór.

Zazwyczaj obecność w organizmie obcego antygeny wywołuje silną, skuteczną odpowiedź immunologiczną, złożoną z dwóch elementów. Odpowiedź komórkowa polega na niespecyficznym cytotoxycyście komórek Natural Killers (NK) i specyficznym cytotoxycyście limfocytów T (Tc). Odpowiedź humoralna opiera się na dopasowaniu antygeny do odpowia-

dającego mu przeciwciała z bazy limfocytów B (z pomocą pomocniczych limfocytów Th, pobudzających limfocyty B cytokinami) i pomnożenia tego wariantu wielokrotnie, w celu zmasowanego ataku na intruza. Zauważono jednak, że antygeny nowotworowe (ang. *tumor associated antigens*, TAA) wywołują bardzo słabą lub prawie żadną odpowiedź immunologiczną, doprowadzając do dezorientacji układu odpornościowego i bezproblemowego namnażania komórek nowotworowych (proces ten nazwano ułatwieniem immunologicznym).

Wiedzę tę wykorzystuje immunoterapia, której celem jest modyfikacja działania układu odpornościowego poprzez indukowanie lub wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej pacjenta (immunoterapia niespecyficzna) czy nakierowanie przeciwciał monoklonalnych lub „szczepionek immunologicznych” na konkretny, wymagający zwalczania rodzaj komórek (immunoterapia celowana).

Immunoterapia wykorzystuje naturalne mechanizmy i składniki układu odpornościowego – aktywność komórek NK, limfocytów Tc, cytotoksyczność zależną od przeciwciał i dopełniacza, a także aktywność cytokin wydzielanych przez makrofagi i limfocyty Th.

Cytokiny charakteryzuje pleiotropia (zdolność jednej cytokiny do oddziaływania na wiele różnych komórek i wywoływania różnych efektów) oraz redundancja (zdolność różnych cytokin do wywoływania tego samego efektu). Cytokiny współdziałają antagonisticznie lub synergicznie.

Do cytokin zaliczono m.in. interferony i interleukiny. Interferony są białkami wytwarzanymi w odpowiedzi na obecność w komórce patogenów (np. wirusów), uruchamiającymi mechanizmy obronne (aktywacja NK i makrofagów, prezentacja antygenów limfocytom Tc). Wyróżniono dwa typy interferonów: typ I – interferon α i β , typ II – interferon γ . Interleukiny z kolei cechuje niezwykła różnorodność w budowie i działaniu

– wspomagają syntezę swoistych przeciwciał przez limfocyty B, aktywują komórki NK i makrofagi, wspomagają różnicowanie i aktywację limfocytów Tc, a także bezpośrednio zabijają komórki nowotworowe (wykorzystując limfotoksyny i TNF¹) lub hamują ich proliferację.

Mimo olbrzymiej wiedzy naukowcy nadal napotykają przeszkody i nierozwiązane problemy uniemożliwiające immunoterapii uleczenie onkologii. Metoda ta pozostaje w cieniu tradycyjnych sposobów leczenia, będąc jedynie ich uzupełnieniem. Układ odpornościowy wciąż skrywa przed badaczami zbyt wiele tajemnic, by móc nad nim zapanować całkowicie.

Biotechnologiczne science fiction

Aż 95% zachorowań na przewlekłą białaczkę szpikową (ang. *chronic myeloid leukemia*, CML) jest spowodowanych translokacją protoonkogenu Abl z chromosomu 9 na chromosom 22, na którym dochodzi do fuzji protoonkogenu Abl z sekwencją Bcr. Onkologia zidentyfikowała mnóstwo innych mechanizmów i markerów molekularnych, charakterystycznych dla powstawania chorób nowotworowych. Faktem jest zatem, iż u podłoża większości zachorowań leżą mutacje zwiększające niestabilność genetyczną i skłonność do dalszych zmian. Czy istnieje nadzieja, by nie tylko powstrzymać tę niebezpieczną kaskadę transformacji, ale i cofnąć już zaistniałe uszkodzenia?

Zaproponowana w latach 80. XX wieku terapia genowa posuwa się znacznie dalej niż immunoterapia, majsterkując w zepsutym genomie. Z założenia miała dzielić się na genoterapię germinalną (zakazaną i uznaną za nieetyczną) oraz somatyczną (obecnie stosowaną). Terapia germinalna wprowadzałaby zmiany w komórkach rozrodczych, zapewniając w ten sposób dziedziczenie cechy. Terapia somatyczna może jedynie złagodzić lub usunąć objawy, nie naprawiając defektu, czyli przekazywanie choroby potomstwu jest kontynuowane.

Terapia genowa stosuje kilka strategii, w zależności od rodzaju zaistniałych zmian, opartych na technikach inżynierii genetycznej. W przypadku braku w komórce enzymu potrzebnego do prawidłowego funkcjonowania organizmu (np. w mukowiscydozie) niezbędne jest wprowadzenie dodatkowej, prawidłowej kopii genu kodującego ów enzym. W przypadku chorób dominujących (np. płasawicy Huntingtona) należy zastąpić uszkodzony fragment genu lub cały gen poprawną sekwencją. Popularne jest również inaktywowanie genów, których produkty odpowiedzialne są za chorobę. W tym celu wykorzystywane są antysensowne oligonukleotydy, rybozomy (zbudowane z kwasu rybonukleinowego i części białkowej, zdolne do katalizowania niektórych reakcji chemicznych) lub interferencja RNA wykorzystująca siRNA (ang. *small interfere RNA* – małe interferujące) oraz miRNA (ang. *micro RNA*). W onkologii duże znaczenie ma eliminacja uszkodzonych komórek,

W chemioterapii wykorzystywane są głównie leki cytostatyczne, a także leki hormonalne, leki celowane molekularnie czy przeciwciała monoklonalne, natomiast w radioterapii – promieniowanie jonizujące. Leki cytostatyczne zabijają komórki dzielące się, co jest jednoznaczne z niszczeniem nie tylko komórek nowotworowych, ale i zdrowych komórek pacjenta.

uzyskiwana po podaniu preparatów genowych zawierających cDNA kodujące czynniki proapoptotyczne, toksyczne białka czy czynniki „uczulające” układ immunologiczny na wybrany typ komórek. Żadna z tych strategii nie byłaby możliwa bez zastosowania odpowiednich wektorów genetycznych.

Wektory wirusowe wykorzystują zmodyfikowane cząstki herpeswirusów (odpowiedzialne za wywoływanie m.in. opryszczki), retrowirusów, adenowirusów i wirusów związanych z adenowirusami (ang. *adeno-associated virus*, AAV). Po usunięciu genów związanych

¹ TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik nekrozy nowotworów.

z cyklem życiowym (w to miejsce wklonowywany jest transgen kodujący terapeutyczny gen) wirus traci możliwość namnażania się w komórce docelowej, jednocześnie dostarczając transgen i umożliwiając mu integrację z DNA komórkowym. Retrowirusy zapewniają wydajną transformację i stabilną integrację transgenu w komórkach dzielących się, niestety następuje to w przypadkowym miejscu. Herpeswirusy i adenowirusy infekują komórki dzielące się (terapeutyczny gen nie integruje zatem z DNA gospodarza), zapewniając niezwykle wydajną ekspresję transgenu. Wektory te nie są

Immunoterapia wykorzystuje naturalne mechanizmy i składniki układu odpornościowego – aktywność komórek NK, limfocytów Tc, cytotoksyczność zależną od przeciwciał i dopełniacza, a także aktywność cytokin wydzielanych przez makrofagi i limfocyty Th.

jednak całkowicie pozbawione genów wirusowych, co w konsekwencji może prowadzić do silnej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Alternatywą dla wektorów wirusowych są wektory syntetyczne, czyli związki chemiczne (np. polimery kationowe) lub syntetyczne konstrukty (liposomy), wnikaące do komórki na drodze endocytozy. Wektory te cechuje słaba wydajność transformacji, jednak należy podkreślić, iż olbrzymią zaletą tego nośnika jest bezpieczeństwo, czyli brak immunogenności. Liposomy nowej generacji posiadają dodatkowo grupy chemiczne rozpoznające receptory powierzchniowe swoistych komórek docelowych.

Wyróżnić można dwie możliwe drogi podania preparatu genowego do komórek pacjenta. Pierwsza

Tabela 1. Fazy badań klinicznych

Faza I	Wstępna ocena bezpieczeństwa badanej substancji: metabolizm, wchłanianie, wydalanie, ewentualna toksyczność oraz interakcje z innymi przyjmowanymi substancjami. Określenie dawkowania badanej substancji (kilku ochotników). W przypadku badań nad lekami onkologicznymi fazę I badań łączy się z fazą II, by nie narażać zdrowych ochotników na działanie silnie toksycznych związków.
Faza II	Ocena, czy lek działa w określonej grupie chorych oraz czy jest dla nich bezpieczny, porównywanie działania nowego leku oraz placebo z działaniem leku powszechnie stosowanego w leczeniu danej choroby (kilkuset chorych na analizowaną chorobę). Przejście do fazy III następuje wtedy, gdy stosunek korzyści do ryzyka wynikających ze stosowania analizowanej substancji jest wyraźnie większy.
Faza III	Ostateczne potwierdzenie skuteczności badanej substancji w leczeniu danej choroby: ocena związku pomiędzy bezpieczeństwem stosowania leku a skutecznością podczas krótkotrwałego oraz długotrwałego stosowania (kilkaset chorych). Etap ten może trwać nawet kilka lat! Pozytywna ocena fazy III prowadzi do rejestracji i wprowadzenia leku do sprzedaży.
Faza IV	Dotyczy leków zarejestrowanych i dostępnych w sprzedaży: weryfikacja wyników uzyskanych w poprzednich fazach oraz analiza nowych wskazań.

metoda (*in vivo*) zakłada bezpośrednie dostarczenie preparatu do organizmu (np. do żyły wrotnej w celu transfekcji hepatocytów). Druga metoda (*ex vivo*) wymaga wcześniejszego pobrania komórek od pacjenta i prowadzenia ich hodowli *in vitro*. Po dokonaniu transfekcji selekcjonuje się komórki i podaje do organizmu pacjenta jedynie te, które zawierają transgen (np. komórki hematopoetyczne).

Z przykrością należy zauważyć, że do tej pory nauka nie zaobserwowała spektakularnych sukcesów genoterapii. Niewątpliwie zależy on od wielu czynników, m.in. pełnej charakterystyki zmutowanego genu i znajomości jego poprawnej sekwencji cDNA, dostępności komórek docelowych i odpowiedniego nośnika do ich zainfekowania, a także możliwości potwierdzenia skuteczności w badaniach klinicznych (Tab. 1). W przypadku bardzo dużych genów (np. w dystrofii mięśniowej Duchenne’a), gdy cDNA jest zbyt długie, by mogło zostać wklonowane do jakiegokolwiek wektora, konstrukt musi zawierać jedynie tę część genu, w której znajduje się defekt, próbując załatać „dziurę”. Z kolei po-

twierdzenie skuteczności leczenia w badaniach przedklinicznych (na liniach komórkowych, myszach) nie oznacza, że uda się zaobserwować identyczny efekt terapeutyczny w bardziej heterogenicznym organizmie człowieka.

Co z tą onkologią?

Twórca hipotezy Czerwonej Królowej, ewolucjonista Leigh Van Valen, wyjaśnił w swojej koncepcji odwieczny wyścig zbrojeń. Po bocznym obserwatorom może się wydawać, że onkologia posuwa się naprzód bardzo małymi krokami – nic bardziej błędnego. Wprawdzie końca wyścigu i mety wciąż nie widać na horyzoncie, jednak lekarze i naukowcy każdego dnia odkrywają nowe cząsteczki, metody, systemy sterujące ludzkimi genami. Nauka zaskakuje nawet badaczy, a to daje nadzieję na to, że ostatecznym zwycięzcą okaże się nie nowotwór, lecz człowiek. Pomimo mrozących krew w żyłach statystyk.

mgr Joanna Stojak
Zakład Genetyki i Ewolucji
Instytut Biologii Ssaków PAN
Białowieża

Redaguj z nami!
Wejdź na www.edupress.pl
i weź udział w Wielkiej Ankiecie Czytelniczej!