



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA  
WIELKOPOLSKIEGO  
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY  
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



**Agata Kolecka-Bednarczyk**

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

## Ocena sygnałów molekularnych i komórkowych zależnych od nowotworu we krwi obwodowej pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca

Liczba zachorowań na choroby nowotworowe w Polsce rośnie i jest bardzo poważnym problemem medycznym. Rak płuca jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych u ludzi. Powoduje największą śmiertelność - rocznie jest przyczyną śmierci ponad jednego miliona ludzi na świecie, co stanowi 17% wszystkich zgonów spowodowanych nowotworami. Choroba ta dotyczy przede wszystkim mężczyzn, a w ostatnim czasie także wzrastającej liczby kobiet. Według programu SEER 5-letni okres przeżycia w Stanach Zjednoczonych określany jest na poziomie 15%. Średnie 5-letnie przeżycie w Europie wynosi ok. 10%. W Polsce zapada na tę chorobę około 24 tys. osób rocznie. Zarówno u kobiet jak i mężczyzn okres przeżycia jednego roku jak i 5 lat od postawienia diagnozy jest jednym z najkrótszych w Europie.

Pomimo wielu prowadzonych klinicznych programów- głównie chemioterapii, nowoczesnych metod diagnostycznych- głównie radiologicznych i poprawy leczenia wspomagającego prognoza w raku płuca nadal pozostaje niepomyślna, a przeżycie w ciągu ostatnich kilku dekad nie wzrosło w sposób zauważalny. Rak płuca ciągle pozostaje jednym z najgroźniejszych, obciążonych dużą śmiertelnością chorób nowotworowych. Wykrywany jest późno nie dając dużych szans choremu na przeżycie. W większości przypadków rak płuca ma długi okres rozwoju, a objawy kliniczne pojawiają się dopiero w zaawansowanych stadiach choroby. Uważa się, że proces karcynogenezy, który prowadzi do powstania klinicznie jawnego guza toczy się w nabłonku oskrzelowym co najmniej kilkanaście lat. Zatem przez bardzo długi okres jest on niedostępny dla żadnych metod wykrywania. W większości przypadków bardzo długo pozostaje asymptomatyczny, a objawy kliniczne pojawiają się dopiero w zaawansowanym stadium choroby.

Od wielu lat podejmowane są wysiłki zmierzające do rozpoznania choroby w jej

wczesnym, przedklinicznym stadium, w którym leczenie mogłoby okazać się bardziej skuteczne. W Polsce liczba zgonów spowodowana tym nowotworem jest prawie równa liczbie zachorowań. Jest to wynik późnego rozpoznania choroby i małej skuteczności leczenia. Wczesna detekcja choroby wydaje się być zatem kluczowa dla przedłużenia życia chorych na raka płuca.

Celem realizowanej pracy doktorskiej jest określenie nowych potencjalnych markerów wykrywania raka płuca, które mogłyby posłużyć jako narzędzie dla wczesnej, bezinwazyjnej diagnostyki niedrobnokomórkowego raka płuca. Wspólna ocena wykładników molekularnych pochodzenia nowotworowego, parametrów immunologicznych i danych klinicznych może stanowić narzędzie służące do specyficznej i czulej oceny stopnia obciążenia nowotworem indywidualnego pacjenta. Praca ta pozwala spojrzeć na chorobę nowotworową jako na chorobę układową dotyczącą całego organizmu.

Uważa się, że nowotwór nie jest zdolny do rozwoju jeśli układ immunologiczny jest w pełni sprawny. Nieprawidłowe działanie układu odpornościowego uważane jest za jeden z mechanizmów wykorzystywanych przez nowotwór do ucieczki spod nadzoru immunologicznego. Jednym z nich jest nieskuteczna prezentacja antygenów, dzięki zahamowaniu ekspresji HLA klasy I lub klasy II (*human leukocyte antigens*- HLA) na komórkach prezentujących antygen.

Komórki dendrytyczne (*dendritic cells*- DC) uznawane są za profesjonalne komórki prezentujące antygen rozmieszczone w większości tkanek organizmu. U chorych na raka komórki dendrytyczne pozostają niedojrzałe (szczególnie w mikrośrodowisku nowotworu), przez co są one niezdolne do efektywnej prezentacji antygenów i migracji do węzłów chłonnych. Receptory znajdujące się na powierzchni limfocytów T - wiążące antygen - określa się jako receptory limfocytów T (*T cell receptors*- TCR). Receptor TCR połączony jest w błonie limfocytów T z kompleksem CD3. Łańcuchy kompleksu CD3 ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  i  $\zeta$ ) pośredniczą w przekazywaniu sygnału z receptora TCR wiążącego antygen do wnętrza komórki, zapoczątkowując kaskadę sygnałową w limfocytach T. W przebiegu chorób nowotworowych obserwuje się niską ekspresję łańcucha  $\zeta$  lub jego brak w porównaniu z grupą kontrolną utworzoną ze zdrowych dawców. Podobnie niską ekspresję  $\zeta$  zaobserwowano wśród limfocytów naciekających guz i w krążących limfocytach T u chorych z różnymi typami raków. Sugeruje to, że nowotwór blokuje funkcje komórek układu immunologicznego poprzez zaburzenia w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki. Mechanizmy odpowiedzialne za utratę, czy spadek ekspresji  $\zeta$  nie są do końca wyjaśnione. Celem części immunologicznej badań jest oznaczenie liczby komórek dendrytycznych pochodzenia mieloidalnego i limfoidalnego oraz stopnia ich dojrzałości poprzez ocenę ekspresji cząsteczki HLA II- DR oraz ekspresji cząsteczki TCR-CD3  $\zeta$  u pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca.

Wśród badanych sygnałów molekularnych uwaga zostanie zwrócona przede wszystkim na poziom miRNA, mRNA i produktów białkowych wybranych genów. Analizie poddane będą miRNA, mRNA i białka wyizolowane z guza, a także te, które podlegają transferowi do fragmentów błon komórkowych i uwalniane są przez wszystkie komórki, w tym nowotworowe do krwi za pośrednictwem egzosomów/mikrociałek. Mikrociałka (*microvesicles*- MV) są to lipidowe, sferyczne pęcherzyki o wielkości 50-100 nm. Możemy je znaleźć między innymi w surowicy. Mogą zawierać białka sygnałowe, mRNA, miRNA i lipidy. Egzosomy wywodzące się z komórek nowotworowych (*tumor-derived exosomes*- TEX) niosą molekuly znajdujące się na powierzchni tych komórek, a także antygeny nowotworowe. W warunkach fizjologicznych miRNA i mRNA obecne w mikrofragmentach stanowią fizjologiczny nośnik sygnałów komórkowych u ludzi. W nowotworach stwierdza się ich ilościowy wzrost i zmiany jakościowe, które mogą stanowić podstawę pojawienia się wczesnych zmian nowotworowych.

Wykonana zostanie również molekularna charakterystyka guza, poprzez zastosowanie metody mikromacierzy. Analizie poddane zostaną zmiany pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism* -SNP) w ponad 400 genach zaangażowanych w proces nowotworzenia.

Analiza wyników prowadzonych badań pozwoli na wdrożenie nowych metod szybkiej diagnostyki i lepsze zrozumienie biologii nowotworów złośliwych, a także na monitorowanie efektów leczenia. Badania przeprowadzone w ramach realizowanej pracy doktorskiej, mogą przyczynić się również do rozwoju terapii personalizowanej, czyli dopasowanej indywidualnie do pacjenta, a nie do jednostki chorobowej. Praca ta pozwoli spojrzeć szerzej na chorobę nowotworową i zmiany toczące się w organizmie podczas rozwoju choroby. Może mieć wpływ na szybsze zdiagnozowanie i wdrożenia skutecznego leczenia. Wskazanie nowych, potencjalnych markerów wczesnego wykrywania niedrobnokomórkowego raka płuca pozwoli na wyodrębnienie grupy chorych ze zwiększoną predyspozycją do nowotworzenia, a tym samym grupy wymagającej szczególnego monitorowania i wczesnej interwencji terapeutycznej.