

objawów ogniskowych pod postacią niedowładu prawych kończyn i nierówności źrenic. W trybie pilnym wykonano tomografię komputerową mózgu, która wykazała obecność krwiaka podtwardówkowego nad lewą półkulą mózgu. Po natychmiastowej konsultacji neurochirurgicznej chorego zakwalifikowano do leczenia

operacyjnego, polegającego na trepanacji czołowo-ciemieniowej i ewakuacji krwiaka. Po operacji chory wybudził się, w kolejnym dniu został spionizowany, nie miał niedowładów, zaburzeń mowy ani zaburzeń widzenia. Po tygodniu został wypisany do domu w stanie dobrym, chodzący i bez zaburzeń świadomości.

Od czasu hospitalizacji pan Zygmunt mieszka na stałe z opiekunką, która interesuje się nowymi trendami w motoryzacji. Dzięki temu mężczyzna nie tylko ma wdzięczną słuchaczkę, ale także każdego dnia zdobywa nową wiedzę o samochodach. ■

Opracowanie: dr n. med. Katarzyna Broczek

ONKOLOGIA

Nowy model komórkowy do badań nad rakiem jajnika

Naukowcy z Centrum Onkologii w Gliwicach stworzyli nowy model do badań przedklinicznych najgroźniejszego typu raka jajnika. Chodzi o stabilną linię komórkową niskorzóżnicowanego raka jajnika surowiczego (ang. *high grade serous ovarian carcinoma*). To właśnie ten typ raka jajnika jest diagnozowany u kobiet najczęściej (ok. 70 proc. wszystkich przypadków), a ponadto ma najgorsze rokowanie. Aby skutecznie walczyć z tym nowotworem, potrzebne są badania, które pozwolą lepiej zrozumieć jego biologię i słabe punkty. W tym celu naukowcy wykorzystują pozyskane z guza nowotworowego ulegające podziałom hodowle, tworzące linie komórkowe.

Pierwsze hodowle komórek nowotworowych otrzymano już w latach 50. ubiegłego wieku w laboratoriach w USA. Przykładem może być słynna linia Hela, wywodząca się z komórek raka szyjki macicy pobranych od 31-letniej Afroamerykanki Henrietty Lacks i przekazanych ówczesnemu dyrektorowi centrum badań nad kulturami tkankowymi na Uniwersytecie

Johnsa Hopkinsa. Chora ta zmarła w 1951 roku, a komórki Hela żyją i są do dzisiaj powszechnie wykorzystywane w badaniach. Wiele innych, dostępnych dziś nowotworowych linii komórkowych, które naukowcy mogą pozyskać z repozytoriów takich jak European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), było wyprowadzonych wiele lat temu.

Linie te są w większości słabo opisane, jeżeli chodzi o ich pochodzenie histologiczne, gdyż w tamtych czasach nie było jeszcze świadomości, jak ważna jest heterogenia nowotworów i że każdy typ histologiczny raka wymaga odrębnego, dobrze scharakteryzowanego modelu. Problem ten jest szczególnie wyraźny w przypadku badań nad rakiem jajnika.



Zespół Centrum Onkologii w Gliwicach: od lewej – dr Magdalena Olbryt, mgr Katarzyna Kujawa, mgr Patrycja Tudrej (pierwszy autor publikacji), prof. Katarzyna Lisowska, mgr Alexander Cortez.

– Rak jajnika to dosyć tajemnicza choroba – mówi dr hab. Katarzyna Lisowska, profesor Centrum Onkologii w Gliwicach. Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat naukowcy zaczęli kojarzyć różne wcześniej pojawiające się sygnały i doszli do wniosku, że nowotwór ten nie stanowi jednolitej jednostki chorobowej. Najlepiej ujęła to Corine Beaufort[1], pisząc, że rak jajnika to w rzeczywistości zbiorcza nazwa dla różnych inwazyjnych raków zlokalizowanych w obrębie miednicy, które wywodzą się z różnych tkanek i są całkowicie odrębne pod względem histologicznym i epidemiologicznym. I faktycznie, dzisiaj mamy coraz więcej dowodów, że to, co nazywamy rakiem jajnika, wywodzi się nie tylko – jak początkowo sądzono – z nabłonka pokrywającego jajnik. Niskozróżnicowany rak surowiczny wywodzi się w większości przypadków z nabłonka jajowodu, a raki endometrioidalne i jasnokomórkowe z endometrium, którego fragmenty podczas menstruacji mogą się przedostawać w górę jajowodu i implantować na powierzchni jajnika, gdzie później, pod wpływem stymulacji hormonalnej i czynników wzrostu ulegają zezłośliwieniu. To zaskakujące dane każą całkowicie zrewidować wcześniejsze pojmowanie choroby określanej jako rak jajnika. I pokazują, jak bardzo potrzebne są ściśle zdefiniowane modele komórkowe do badań nad każdym typem histologicznym tego nowotworu.

Pacjentka, od której gliwiccy naukowcy pozyskali komórki nowotworowe, zmarła w 2011 roku.

W zaawansowanych stadiach raka jajnika często pojawia się wodobrzusze, czyli płyn wysiękowy w jamie otrzewnowej, który powoduje znaczny dyskomfort i wymaga odbarczenia. W płynie tym pływają żywe komórki nowotworowe złuszczone z powierzchni guza. – U naszej pacjentki w jamie otrzewnowej zebrało się

ponad 10 litrów płynu, który został usunięty, a 1 liter został przekazany do działu naukowego. Z tego materiału wyprowadziliśmy stabilną linię komórek nowotworowych, którą nazwaliśmy OVPA8 – opisuje dalej prof. Lisowska.

Pozyskany płyn naukowcy odwirowali, otrzymując w osadzie krwinki czerwone, białe, komórki mezotelialne i komórki nowotworowe. Po wykonaniu rozmazu i wybarwieniu hematoksyliną i eozyną mogliśmy zaobserwować dużą liczbę komórek nowotworowych. Charakteryzują się one obecnością wielkich jąder komórkowych i małą ilością cytoplazmy, tworzą też charakterystyczne skupiska. Już po samym wyglądzie patolog potrafi je zidentyfikować. – Później podaliśmy komórkom pożywkę hodowlaną, specjalnie zmodyfikowaną – zamiast surowicy bydlęcej, którą stosuje się w standardowej hodowli komórkowej, użyliśmy autologicznego płynu wysiękowego pozostałego po odwirowaniu komórek. Wszystko po to, aby komórki po przeniesieniu do inkubatora czuły się jak w swoim naturalnym środowisku – opisuje prof. Lisowska i dodaje: – Mieliśmy materiał komórkowy od ośmiu pacjentek, ale tylko w tym jednym przypadku udało nam się wyprowadzić stabilną linię komórkową, która mnoży się i żyje do dzisiaj. Kiedy linia była już ustalona, rozpoczęliśmy badania genetyczne. Od razu podejrzewałam, że ta pacjentka musiała mieć dziedziczną mutację w genie *BRCA1*. Zachorowała w wieku 41 lat, czyli bardzo młodo, co jest ewidentnym sygnałem, że mamy do czynienia z podłożem dziedzicznym. W pierwszej fazie próbowaliśmy zbadać prostym testem PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) te mutacje, które najczęściej występują w polskiej populacji, ale otrzymaliśmy wynik negatywny. Na szczęście w naszym instytucie od jakiegoś czasu dysponujemy techniką

sekwencjonowania nowej generacji (NGS), wdrożoną właśnie w celu oznaczenia mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*, w celu kwalifikacji pacjentek do terapii celowanej olaparybem. Po wykonaniu sekwencjonowania NGS okazało się, że pacjentka jednak miała mutację w genie *BRCA1*, tylko w nietypowym miejscu, a dodatkowo wykryliśmy, że komórki mają utratę funkcji genu *BRCA2*.

Cechą charakterystyczną niskozróżnicowanego raka surowicznego jajnika jest obecność mutacji w genie *TP53*. Przeprowadziliśmy sekwencjonowanie i znaleźliśmy mutację. Widząc te zaburzenia w genach *BRCA* i *TP53*, uzyskałam dodatkowe potwierdzenie, że mamy do czynienia z niskozróżnicowanym rakiem surowicznym jajnika.

Następnie, przy współpracy z Oddziałem Hematologii i Transplantacji Szpiku Samodzielnego Szpitala Klinicznego w Katowicach wykonano analizę cytogenetyczną – przy zastosowaniu kolchicyny zatruto komórki, żeby pod mikroskopem ocenić liczbę i budowę chromosomów. Potwierdziło się to, co wiadomo o tego typu rakach – bardzo poważne aberracje chromosomowe – delecje, duplikacje itp. Przykładowo, w dużej części komórek nowotworowych obecne były po cztery kopie chromosomu 12, a chromosomu 10 nie było w ogóle! Na tym etapie choroby pacjentka nie reagowała już na leczenie pochodnymi platyny. Potwierdzono to w testach *in vitro* – komórki OVPA8 wykazywały oporność na wysokie stężenia cisplatyny.

W publikacji, która ukazała się w lipcu w „International Journal of Molecular Sciences”[2] prof. Lisowska omawia problemy związane z liniami modelowymi raka jajnika. Najczęściej używane, dawno wyprowadzone linie komórkowe – SKOV3 i A2780 nie są modelem dla niskozróżnicowanego raka surowicznego.

Większość współcześnie prowadzonych badań, które mają na celu sprecyzowanie typu histologicznego guza, z którego te linie zostały kiedyś pozyskane, wskazuje, że SKOV3 odpowiadają rakowi jasnokomórkowemu, a A2780 – endometrioidalnemu. – Wyprowadzona przez nas linia OVPA8 ma tę zaletę, że pochodzi od pacjentki z histopatologicznie rozpoznany niskozróżnicowanym rakiem surowiczym, a nasze badania genetyczne i molekularne dodatkowo potwierdziły to rozpoznanie. Ponadto linia ta jest już przez nas dobrze scharakteryzowana za pomocą testów funkcjonalnych *in vitro*, oceniających ruchliwość, adhezję, proliferację, inwazyjność czy wrażliwość na różne leki cytostatyczne. Testowaliśmy na tej linii m.in. nową substancję otrzymaną przez polską firmę farmaceutyczną Celonpharma z Łomianek – potencjalny inhibitor receptora

dla czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR). Polski inhibitor wykazywał większą aktywność przeciwnowotworową w odniesieniu do komórek raka jajnika niż używany przez nas jako kontrolny inhibitor zagranicznej firmy. Badania te były prowadzone w ramach projektu CELONKO finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (grant przyznany w konkursie Strategmed II) – tłumaczy prof. Lisowska.

Obecnie zespół z Gliwic przygotowuje zamrożone komórki OVPA8 do przekazania do europejskiej kolekcji kultur komórkowych ECACC. Będą one dostępne dla całej społeczności naukowej pracującej nad rakiem jajnika. ■

Wojciech Skowroński

Konsultacja medyczna:
prof. Katarzyna Lisowska

Piśmiennictwo

1. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, Hoogstraal M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, Murtaza M, van IJcken WF, Heine AA, Smid M, Koudijs MJ, Brenton JD, Berns EM, Helleman J. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One*. 2014 Sep 17;9(9):e103988. doi:10.1371/journal.pone.0103988
2. Tudrej P, Olbryt M, Zembala-Nożyńska E, Kujawa KA, Cortez AJ, Fiszer-Kierzkowska A, Pigłowski W, Nikiel B, Głowala-Kosińska M, Bartkowska-Chrobok A, Smagur A, Fidyk W, Lisowska KM. Establishment and Characterization of the Novel High-Grade Serous Ovarian Cancer Cell Line OVPA8. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 17;19(7). doi: 10.3390/ijms19072080

Zdjęcie: archiwum Centrum Onkologii w Gliwicach