

Rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma* – HCC) jest piątym w kolejności najczęściej występującym nowotworem złośliwym na świecie i stanowi trzecią przyczynę zgonów z powodu nowotworów. Jest oporny na działanie standardowych terapii systemowych, a rokowanie dla chorych na HCC jest złe. Identyfikacja szlaków transdukcji sygnału odpowiedzialnych za wzrost i progresję HCC, takich jak RAS/RAF/MEK/ERK, czy też PI3K/AKT/mTOR wyznaczyła cele molekularne, których zahamowanie przez nowoczesne terapie może poprawić rezultaty leczenia. W 2007 r. w oparciu o wyniki badania klinicznego III fazy, sorafenib został zarejestrowany do leczenia chorych na zaawansowanego HCC. Inne leki molekularnie ukierunkowane: przeciwciała monoklonalne (bewacizumab, cetuksymab), inhibitory kinazy tyrozynowej (sunitinib, erlotinib, briwanib) i inhibitory kinazy serynowo-treoninowej (temsirolimus, everolimus) zostały przebadane w badaniach klinicznych II fazy u chorych na HCC. Obecnie trwają badania III fazy oceniające skuteczność tych preparatów. Celem niniejszego artykułu jest przegląd mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój i progresję HCC, a także roli i skuteczności nowych terapii celowanych w leczeniu tego nowotworu.

Słowa kluczowe: rak wątrobowokomórkowy, inhibitory kinazy tyrozynowej, sorafenib, chemioterapia.

Współczesne możliwości leczenia zaawansowanego raka wątrobowokomórkowego

Novel systemic approaches to treatment of HCC

Joanna Załuska¹, Wojciech Melerowicz², Ewa Prochowska¹, Piotr J. Wysocki^{1,2}

¹Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

²Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wstęp

Rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma* – HCC) jest piątym najczęściej występującym nowotworem złośliwym na świecie i stanowi trzecią przyczynę zgonów z powodu nowotworów. W 2000 r. stanowił 7,5% wszystkich nowotworów u mężczyzn i 3,5% u kobiet. W pewnych regionach Azji i Afryki występowanie HCC jest 40 razy częstsze niż w pozostałej części świata, co jest związane z endemicznym występowaniem wirusowego zapalenia wątroby typu B [1–3]. Częstość występowania HCC zwiększa się na całym świecie, ale największy wzrost zaobserwowano w krajach zachodnich, zwłaszcza ze względu na częste występowanie wirusowego zapalenia wątroby typu C [4]. W krajach tych 30–40% przypadków HCC jest rozpoznawanych we wczesnym stadium, co stwarza możliwość całkowitego wyleczenia po zastosowaniu leczenia miejscowego (resekcje chirurgiczne, zabiegi termoablacji). Około 70% chorych na HCC rozpoznanego we wczesnym stadium zaawansowania przeżywa 5 lat. Niestety, miejscowo zaawansowany lub nawrotowy (po leczeniu miejscowym) HCC ma złe rokowanie, wynikające z niewielkiej efektywności leczenia systemowego i współistniejących zaburzeń funkcji wątroby. Tradycyjna chemioterapia nie umożliwiła wydłużenia czasu przeżycia całkowitego (OS) u osób z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym HCC. Postęp wiedzy w zakresie biologii i biotechnologii HCC umożliwił jednak stworzenie nowoczesnych terapii ukierunkowanych molekularnie do leczenia HCC. Celem niniejszego artykułu jest omówienie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój i progresję HCC, a także przedstawienie terapii celowanych stosowanych w leczeniu tego nowotworu.

Rozwój raka wątrobowokomórkowego

Kancerogeneza raka wątrobowokomórkowego jest wieloetapowym procesem inicjowanym przez zewnętrzny czynnik (lub czynniki), który indukuje genetyczne zmiany w hepatocytach lub komórkach macierzystych hepatocytów, w wyniku czego prowadzi do zahamowania apoptozy, pobudzenia proliferacji, dysplazji oraz angiogenezy [5–7]. Czynniki ryzyka rozwoju HCC to infekcje wirusowe (wirusowe zapalenie wątroby typu B i C), ekspozycja na aflatoksynę B, przewlekłe nadużywanie alkoholu oraz marskość wątroby. Prawie 80% przypadków HCC rozwija się na podłożu marskiej wątroby [5, 6]. Większość przypadków HCC wiąże się z przewlekłą infekcją wirusową wątroby. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za indukcję rozwoju nowotworu są odmienne w przypadku wirusów WZW B i C. DNA wirusa WZW B łączy się z genomem zainfekowanego hepatocytu, powodując niestabilność chromosomów [8, 9] oraz insercje, które mogą uaktywnić szereg onkogenów, takich jak np. cyklina A [10, 11]. Replikacja WZW B wymaga ekspresji różnych

Hepatocellular cancer (HCC) is the fifth most common malignancy worldwide and the third leading cause of cancer death. HCC is highly resistant to conventional systemic therapies and prognosis for advanced HCC patients remains poor. Identification of signalling pathways responsible for HCC growth and progression such as RAS/RAF/MEK/ERK or PI3K/AKT/mTOR has determined molecular targets whose inhibition by novel agents may improve patients' outcome. Based on a phase III clinical trial demonstrating a significant impact on overall survival, sorafenib has been approved for treatment of advanced HCC. Many other targeted agents – monoclonal antibodies, tyrosine kinase inhibitors and serine-threonine kinase inhibitors – have been tested in phase II clinical trials and have recently entered phase III studies. The aim of this article is to review molecular mechanisms responsible for development and progression of HCC, and the role of targeted therapies in the treatment of HCC which may soon be introduced into clinical practice.

Key words: hepatocellular cancer, tyrosine kinase inhibitors, sorafenib, chemotherapy.

białek wirusowych, a w szczególności białka X (HBx) [12], które działając jak aktywator transkrypcji, kontroluje wiele onkogenów, takich jak c-myc i c-jun [13, 14] oraz czynniki transkrypcyjne, takie jak NF- κ B czy AP-2 [15, 16]. Dodatkowo, HBx aktywuje promotory genów kodujących IL-8, TNF, TGF- β i EGFR [17]. Białko HBx obecne w cytoplazmie może aktywować wiele ścieżek przekazywanych, m.in. ścieżkę JAK/STAT [18], ścieżkę RAS/RAF/MAPK [19] i ścieżkę Wnt/ β -katenina [20]. Ponadto, HBx może zaburzyć szereg funkcji białka p53 [21] oraz stymulować produkcję czynników angiogennych, takich jak VEGF przez komórki HCC [22]. Genom WZW C (RNA) nie integruje się z genomem gospodarza, dlatego też główną rolę w kancerogenezie w przypadku wirusowego zapalenia wątroby typu C odgrywają białka wirusowe – białko rdzenia, NS3 i NS5A. Białko rdzenia HCV może powodować apoptozę lub proliferację komórek poprzez interakcję z p53 [23] lub poprzez regulację Wnt-1 na poziomie transkrypcji [24]. Białka NS4A i NS4B pośredniczą w hamowaniu translacji oraz degradacji różnych białek komórkowych [25].

Aflatoksyna B, będąca toksyną grzybiczą, która występuje w zanieczyszczonych orzeszkach ziemnych, okazała się być bardzo silnym mutagenem, reagującym z guaniną w DNA i prowadzącym do mutacji. Endemiczne narażenie na aflatoksynę B, powszechne w niektórych krajach Afryki i Azji, jest związane z bardzo częstym występowaniem HCC oraz mutacjami w kodonie 249 białka p53 [26].

Marskość wątroby jest rozpoznawana w ok. 80–90% przypadków HCC i stanowi najważniejszy czynnik ryzyka rozwoju tego nowotworu. Wysokość ryzyka powstania nowotworu w marskiej wątrobie zależy od przyczyny marskości. Najwyższe, 5-letnie ryzyko, stwierdza się w przypadku marskości spowodowanej zakażeniem WZW C (17–30%), następnie w hemochromatozie (21%), WZW B (10–15%), marskości alkoholowej (8%) i marskości żółciowej (4%) [4]. W marskiej wątrobie zmiany w metabolizmie tłuszczów, powodujące aktywację adipocytopodobnych szlaków transdukcji sygnału, są prawdopodobnie związane z transformacją nowotworową [27, 28]. Dodatkowo, stłuszczenie czy stłuszczeniowe zapalenie wątroby i związany z nimi stres oksydacyjny są również ważnymi czynnikami w rozwoju HCC [29].

Receptory i kaskady sygnałowe w raku wątrobowokomórkowym – potencjalne cele molekularne

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu

Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) znajduje się na powierzchni hepatocytów i odgrywa rolę w regeneracji wątroby po jej uszkodzeniu lub częściowej hepatektomii [30]. Hepatokancerogeneza i proliferacja HCC zależy od pobudzenia EGFR przez jego ligandy – TGF- α lub EGF [31–33]. Aktywacja EGFR uruchamia dwie ścieżki przekazywanych: RAS/RAF/MEK/ERK i PI3K/AKT/mTOR, które odgrywają kluczową rolę w biologii HCC [7]. Istnieją dwie strategie hamowania funkcji EGFR – zastosowanie przeciwciał monoklonalnych neutralizujących domenę zewnątrzkomórkową EGFR (cetuksymab i panitumumab) oraz zastosowanie inhibitorów kinazy tyrozynowej (erlotinib, gefitinib i lapatinib, który dodatkowo hamuje receptor HER2). Przeciwciała monoklonalne wiążą się z zewnątrzkomórkową domeną EGFR i blokują homodimeryzację lub heterodimeryzację receptora indukowaną ligandem, natomiast inhibitory kinazy tyrozynowej blokują wewnątrzkomórkowo aktywację kaskady sygnałowej. W warunkach *in vitro* obie metody wydajnie hamowały proliferację linii komórkowych HCC [34, 35]. Kliniczna skuteczność erlotinibu w leczeniu HCC została udowodniona w dwóch badaniach klinicznych II fazy. W badaniu Philip i wsp. 38 pacjentów z nieresekcyjnym lub przerzutowym HCC otrzymywało 150 mg erlotinibu dziennie [36]. Nadekspresję EGFR w guzie nowotworowym stwierdzono u 88% pacjentów. Obiektywne odpowiedzi kliniczne obserwowano u 3 chorych. Stabilizację choroby przez 6 miesięcy zaobserwowano u 32%, a mediana przeżycia całkowitego (*overall survival* – OS) wynosiła 13 miesięcy. W analogicznym badaniu obejmującym 40 chorych nie zaobserwowano

ani jednej obiektywnej odpowiedzi klinicznej [37]. Po 4 miesiącach leczenia u 43% chorych stwierdzono stabilizację procesu chorobowego, a mediana OS wynosiła 10,75 miesiąca. W innym badaniu II fazy oceniano skuteczność lapatinibu w leczeniu 40 pacjentów z zaawansowanym HCC. Odsetek odpowiedzi obiektywnych wyniósł 5%. Mediana czasu wolnego od progresji (PFS) i OS wyniosły odpowiednio 2,3 i 6,2 miesiąca [38]. W podobnym badaniu w grupie 31 chorych, gefitinib spowodował 3% obiektywnych odpowiedzi klinicznych i stabilizację choroby u dalszych 22,6% pacjentów. Mediana PFS i OS wyniosły odpowiednio 2,8 i 6,8 miesiąca [39].

W kolejnym badaniu II fazy 30 osób z zaawansowanym lub przerzutowym HCC otrzymywało cetuksymab. W tym badaniu nie zaobserwowano ani jednej obiektywnej odpowiedzi klinicznej, a stabilizację choroby stwierdzono u 17% chorych. Mediana PFS i OS wyniosły odpowiednio 1,4 i 9,6 miesiąca [40]. W podobnym badaniu 27 pacjentów z zaawansowanym HCC również otrzymywało cetuksymab. Stabilizację choroby stwierdzono u 44,4% chorych, ale nie obserwowano odpowiedzi obiektywnych. Mediana PFS wynosiła 1,8 miesiąca [41]. Kliniczna skuteczność cetuksymabu w połączeniu ze standardową chemioterapią była analizowana w wieloośrodkowym badaniu II fazy, które objęło 43 wcześniej nieleczonych chorych na zaawansowanego HCC. Pacjenci otrzymywali cetuksymab i chemioterapię (gemcytabina + oksaliplatyna) w odstępach dwutygodniowych. Odsetek odpowiedzi obiektywnych wyniósł 23%, a u 65% chorych uzyskano stabilizację choroby. W oryginalnej publikacji nie przedstawiono danych dotyczących takich parametrów przeżycia, jak PFS czy OS [42].

Receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu

W 20% HCC można stwierdzić nieprawidłową aktywację szlaku transdukcji sygnału związanego z receptorem dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (*insuline-like growth factor receptor* – IGF-1R). Ponadto, u 12–44% chorych na HCC występuje nadekspresja IGF-2 [43]. W modelu zwierzęcym ludzkiego HCC przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko IGF-1R opóźniło wzrost guza i poprawiało przeżycie badanych zwierząt [44]. W badaniu klinicznym I fazy 1 osoba z wcześniej leczonym HCC osiągnęła ponaddziesięciomiesięczną stabilizację choroby po otrzymaniu przeciwciała monoklonalnego IMC-A12 [45]. Niedawno rozpoczęto się badanie II fazy oceniające skuteczność IMC-A12 u chorych na zaawansowanego HCC.

Szlak PI3K/AKT/mTOR

Kaskada protein kinazy 3'fosfatydilinozytolu jest jedną z najważniejszych ścieżek przekazywanych związanych z receptorowymi kinazami tyrozynowymi (RTKs), która została zidentyfikowana w komórkach nowotworowych [46]. Drugim ważnym szlakiem w HCC jest kaskada RAS/RAF/MAPK [47]. Różne receptory związane z kinazami tyrozynowymi (RTKs) ulegające ekspresji w komórkach nowotworowych, np. VEGFR-1 [48], PDGFR- α [49], EGFR [50] lub c-MET [51], wykorzystują szlak przekazywany PI3K/Akt/mTOR, by modulować fenotyp i funkcje komórek rakowych. Aktywacja RTKs prowadzi do aktywacji PI3K, któ-

ra może być również aktywowana pośrednio przez kinazę RAS. Funkcja PI3K jest negatywnie kontrolowana przez fosfatazę i homolog tensyny (PTEN). W guzach HCC często (> 55%) występuje utrata funkcji PTEN [52], chociaż częstość występowania mutacji PTEN jest dużo niższa niż w innych nowotworach złośliwych (0–11%) [53]. Aktywowany PI3K zwiększa ekspresję genów zależnych od NF- κ B, takich jak Bcl-X_L [54]. PI3K poprzez PI3-zależną kinazę białkową 1 (PDK1) aktywuje AKT [55]. AKT jest kinazą serynowo-treoninową, która fosforyluje i inaktywuje szereg białek proapoptotycznych, takich jak Bad i kaspaza 9. Jednym z bardzo ważnych elementów transdukcji sygnału poniżej AKT jest mTOR. Przewlekła aktywacja szlaku PI3K/AKT/mTOR wiąże się ze złym rokowaniem u chorych na HCC [56]. Fosforylację mTOR i jego kluczowego celu – kinazy S6K1 stwierdza się odpowiednio w 15 i 45% przypadków HCC [57]. Aktywowany mTOR poprzez swoje kluczowe efekторы reguluje wiele procesów komórkowych, takich jak inicjacja transkrypcji mRNA i translacji białek. mTOR reguluje kluczowe szlaki transdukcji sygnałów i jest punktem przełącznikowym konwertującym sygnały od czynników wzrostu na sygnały pobudzające cykl komórkowy [58].

Fosforylacja mTOR prowadzi do regulacji na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego czynników α zależnych od hipoksji (HIF-1 α i HIF-2 α). Transkrypcyjne cele czynników HIF są ściśle związane m.in. z przerzutowaniem. Białko CXCR4 to receptor chemokinowy, będący prawdopodobnie jednym z najważniejszych mediatorów przerzutowania. Jego ekspresja w HCC jest ściśle kontrolowana przez czynniki HIF [59, 60]. Co więcej, hipoksja nasila ekspresję metaloproteinaz (MMPs) 2 i 9 [61], a HIF reguluje oksydazę lizylową, która ułatwia inwazję i przerzutowanie poprzez degradację zewnątrzkomórkowych składników macierzy, takich jak elastyna i kolagen [62]. Jednym z celów HIF-2 α jest Oct4, gen kodujący czynnik transkrypcji domeny POU, która jest kluczowym regulatorem komórek macierzystych. Prawdopodobnie Oct4 moduluje biologię guza przez promocję wzrostu nowotworowych komórek macierzystych, które wydają się odgrywać kluczową rolę w procesie samoodnawiania się guza i oporności na chemioterapię [63]. Czynniki HIF są bezpośrednio związane ze złośliwym fenotypem komórek nowotworowych, regulując nie tylko fenotyp komórek guza, ale także indukując angiogenezę przez indukcję ekspresji VEGF lub PDGF [64]. HIF są także odpowiedzialne za chemiooporność guzów HCC. Płytkowopochodny czynnik wzrostu B (*platelet-derived growth factor B* – PDGF-B) produkowany pod wpływem czynników HIF nie tylko stabilizuje nowe naczynia, ale także zmniejsza penetrację leków antynowotworowych poprzez zwiększanie ciśnienia śródmiąższowego [65]. Innym mechanizmem chemiooporności uwarunkowanej funkcją czynników HIF jest wzrost ekspresji genu MDR1 [66].

Szlak PI3K/AKT/mTOR może być zahamowany na różnych poziomach. Inhibitory PI3K, takie jak wortmanina i LY294002, wykazały pewną skuteczność w modelach zwierzęcych HCC [67]. Inny inhibitor – FTY720 – indukował apoptozę w liniach komórkowych HCC oraz hamował wzrost ludzkich guzów HCC w modelach zwierzęcych [68]. Aktywacja AKT może być zahamowana również przez perifosy-

nę (alkilofosfolipid), który został poddany badaniom klinicznym I fazy [69, 70]. Innym obiecującym celem terapeutycznym są czynniki HIF. W mysim modelu HCC podawanie antysensownego RNA HIF-1 α zmniejszyło wewnątrzkomórkowe poziomy HIF-1 α i VEGF oraz zwiększyło terapeutyczną skuteczność doksorubicyny [71]. Obecnie najbardziej obiecującym celem w szlaku PI3K/AKT/mTOR wydaje się kinaza mTOR. Inhibitory mTOR są obecnie stosowane jako leki immunosupresyjne u chorych po przeszczepach narządów. Efektywność analogów rapamycyny jako broków mTOR testowano w licznych modelach przedklinicznych HCC [53]. Rapamycyna powodowała zahamowanie proliferacji komórek HCC *in vitro* oraz wzrost guzów HCC w modelach zwierzęcych [72]. Everolimus (RAD001) skutecznie hamował wzrost HCC *in vitro* i *in vivo* oraz znacząco wzmacniał efekt cytotoksyczny cisplatyny w liniach komórkowych HCC [73, 74]. Inny inhibitor mTOR, sirolimus, został oceniony na grupie 21 pacjentów z zaawansowanym HCC [75]. U 1 chorego uzyskano częściową odpowiedź, natomiast u 5 chorych stwierdzono stabilizację choroby utrzymującą się przez 3 miesiące. Mediana OS wynosiła 6,5 miesiąca. Niedawno zainicjowano badanie I/II fazy, oceniające kliniczną skuteczność inhibitora mTOR – ewerolimusu (RAD001) w zaawansowanym HCC.

Szlak RAS/RAF/MAPK

Oprócz PI3K/AKT/mTOR szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK) odgrywa znaczącą rolę w rozwoju HCC. Szlak MAPK to kaskada fosforylacji, angażująca takie kinazy, jak RAS, RAF, MEK i kinazę regulowaną sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK). Szlak MAPK może być aktywowany przez RTKs, takie jak EGFR, HER2, IGF-R1 lub c-MET, poprzez receptory integrynowe lub poprzez sygnały z kanałów jonowych [76]. Aktywacja szlaku MAPK powoduje proliferację komórek, migrację i hamowanie apoptozy [77]. Szlak MAPK ulega często nieprawidłowej aktywacji w HCC [78, 79]. Istnieje kilka mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za tę aktywację. Białko rdzeniowe HCV może bezpośrednio aktywować kaskadę Raf/MEK/ERK [80]. Wykazano bowiem, że utrata naturalnego inhibitora kinazy RAF może stymulować HCC do proliferacji i migracji [81]. Nadekspresja RAS była także obserwowana w guzach HCC [82]. Podobnie jak w przypadku PI3K/AKT/mTOR, szlak RAS/RAF/MEK/ERK może być terapeutycznie zahamowany na kilku poziomach.

Inicjacja transdukcji sygnału zależna od RAS wymaga potranslacyjnej modyfikacji tej kinazy polegającej na inkorporacji reszt prenylowych (farnezylowa i geranylogeranilowa). Do dzisiaj zsyntetyzowano kilka inhibitorów transferazy farnezylu zapobiegających prenylacji białek RAS. Spośród nich, ABT-100 zapobiega rozwojowi chemicznie indukowanego HCC u szczurów [83]. Hamowanie funkcji kinazy MEK również zapobiega rozwojowi HCC i wymaga apoptozę w guzach HCC u myszy [84]. Efekt ten wydaje się proporcjonalny do zastosowanej dawki [85]. Farmakologiczne hamowanie funkcji kinazy RAF jest obecnie najbardziej obiecującą strategią u chorych na HCC. Sorafenib, inhibitor kinazy tyrozynowej, wykazał znaczącą skuteczność kliniczną w badaniu rejestracyjnym III fazy (SHARP) [86].

Sorafenib tozylanu jest pochodną dwuarylową mocznika, był pierwotnie zsyntetyzowany jako wybiórczy inhibitor białka RAF-1 *in vitro*. Jednakże w dalszych badaniach wykazano, że sorafenib hamuje również aktywność kinaz tyrozynowych receptorów VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-B, FLT-3 i c-KIT. W badaniu III fazy 602 chorych na zaawansowanego, nieleczonego HCC zostało losowo zakwalifikowanych do ramienia badanego otrzymującego 400 mg sorafenibu dwa razy dziennie lub do ramienia kontrolnego otrzymującego placebo [86]. Pacjenci kwalifikowani do badania musieli mieć prawidłową funkcję wątroby – klasa A wg klasyfikacji Childa-Pugha. W badaniu SHARP sorafenib znacząco poprawił medianę PFS i OS w porównaniu z placebo – odpowiednio 5,5 vs 2,8 miesiąca oraz 10,7 vs 7,9 miesiąca. Współczynnik ryzyka wystąpienia zgonu w grupie otrzymującej sorafenib został znacząco zredukowany – 0,69 (95% CI 0,55–0,87; $p < 0,001$). Odsetek objektywnych odpowiedzi klinicznych był podobnie niski w obydwu ramionach – 2% odpowiedzi częściowych i 71% stabilizacji w ramieniu z sorafenibem, natomiast w ramieniu kontrolnym 1% odpowiedzi częściowych i 67% stabilizacji choroby. Kontrola choroby była zdecydowanie lepsza w ramieniu z sorafenibem – 43 vs 32%; $p = 0,002$. Toksyczność sorafenibu była akceptowalna, najczęściej obserwowano biegunkę, utratę masy ciała, zespół ręka–stopa i hipofosfatemię. Skuteczność sorafenibu u chorych na zaawansowanego HCC została także wykazana w innym badaniu III fazy, które objęło 207 chorych z regionu Azji i Pacyfiku [87]. W tym badaniu sorafenib znacząco wydłużył medianę OS w porównaniu z placebo (6,5 vs 4,2 miesiąca). Redukcja współczynnika ryzyka dla przeżycia w ramieniu z sorafenibem (0,68; 95% CI 0,50–0,93; $p = 0,014$) była porównywalna z uzyskaną w badaniu SHARP. Na podstawie badań klinicznych III fazy, sorafenib został zarejestrowany w leczeniu chorych na zaawansowanego HCC z prawidłową funkcją wątroby (klasa A wg skali Childa-Pugha).

Angiogeneza w raku wątrobowokomórkowym – kolejne cele molekularne

Tak jak w przypadku innych nowotworów, angiogeneza jest kluczowa w rozwoju i progresji HCC. Wiele badań udowodniło, że intensywność angiogenezy w HCC (ocenianej jako liczba mikronaczyń w określonej objętości guza) jest związana z ryzykiem wystąpienia inwazji naczyń, przerzutowania i ze złym rokowaniem [88, 89]. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) typu A jest jednym z najsilniejszych czynników proangiogennych. Działa poprzez 2 receptory – VEGFR 1 (Flt-1) i VEGFR-2 (KDR), przy czym VEGFR-2 uczestniczy we wszystkich znanych odpowiedziach komórkowych na VEGF, natomiast VEGFR-1 jest odpowiedzialny za modulowanie ludzkich HCC wzrost guza był kontrolowany przez poziom ekspresji VEGF [90]. Ekspresja VEGF wzmacnia rozwój HCC [91]. Analiza ilościowa wykazała, że 64% HCC mających torebkę i 78% bez torebki (bardziej złośliwych) wykazywało ekspresję VEGF [92]. W innym badaniu ekspresja VEGF została wykryta w 89% HCC [93]. Ekspresja VEGF i innych czynników angiogennych, takich jak bFGF lub angiopoety-

na 2, koreluje z liczbą naczyń, inwazją i zdolnością przerzutowania HCC [94, 95]. Ponadto, wykazano ekspresję receptorów VEGF w liniach komórkowych HCC, co może być związane z autokrynową stymulacją wzrostu guza zależną od VEGF [96]. Ścieżki VEGF mogą być atakowane na dwa sposoby, za pomocą monoklonalnych przeciwciał przeciwko VEGF lub poprzez inhibitory receptorów kinazy tyrozynowej związanej z VEGFR.

Neutralizacja naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu

Bewacizumab jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, które neutralizuje wszystkie izoformy VEGF. Obecnie lek ten w połączeniu z chemioterapią jest zarejestrowany przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*Food and Drugs Administration* – FDA) do leczenia raka jelita grubego, piersi i niedrobnokomórkowego raka płuca. W mysich modelach ludzkiego HCC bewacizumab zdecydowanie zmniejsza liczbę i gęstość naczyń oraz wydłuża czas do progresji [97]. W badaniu klinicznym II fazy 46 chorych na miejscowo zaawansowanego HCC otrzymywało bewacizumab w dawce 5 mg/kg lub 10 mg/kg dożylnie, co 2 tyg. [98]. Obiektywne odpowiedzi kliniczne obserwowano u 13% chorych, a stabilizację choroby trwającą co najmniej 6 miesięcy u 65% chorych. Mediana PFS wynosiła 6,9 miesiąca. Wskaźnik przeżycia całkowitego wynosił 53% w pierwszym roku, 28% w drugim roku i 23% w trzecim roku. W innym badaniu II fazy obejmującym 38 chorych na zaawansowanego HCC, bewacizumab indukował odpowiedzi częściowe u 16%, a stabilizację u 47% pacjentów [99]. W kolejnym badaniu II fazy oceniano skuteczność bewacizumabu skojarzonego z erlotinibem (inhibitor kinazy tyrozynowej EGFR) u 40 chorych fazy HCC. Odsetek odpowiedzi częściowych wynosił 25%, mediana PFS 9 miesięcy, a mediana OS 15,65 miesiąca. Ten schemat leczenia będzie dalej badany w badaniu III fazy [100]. Kilka badań klinicznych oceniało różne kombinacje bewacizumabu z chemioterapią. Skuteczność bewacizumabu z gemcytabiną i oksaliplatyną w zaawansowanym HCC była oceniana w badaniu II fazy [101]. W grupie 30 chorych odsetek odpowiedzi obiektywnych i stabilizacji choroby wynosił odpowiednio 20 i 27%. Mediana OS i PFS wynosiły odpowiednio 9,6 i 5,3 miesiąca. Inne badanie oceniało skuteczność bewacizumabu w połączeniu z kapecytabiną i oksaliplatyną u 30 osób z zaawansowanym HCC [102]. W badanej populacji chorych odsetek odpowiedzi częściowych i stabilizacji wynosił odpowiednio 11 i 78%. Mediana PFS wynosiła 5,4 miesiąca. Bewacizumab w połączeniu z kapecytabiną był oceniany równoległe w innym badaniu II fazy. Spośród 45 chorych na zaawansowanego lub przerzutowego HCC odsetek obiektywnych odpowiedzi wynosił 16%, a stabilizację choroby stwierdzono u 44% badanych. Mediana OS i PFS wynosiła odpowiednio 4,1 i 10,7 miesiąca [103].

Hamowanie aktywacji receptorów naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu

Wyjaśnienie kluczowej roli kinaz tyrozynowych związanych z receptorami w procesie angiogenezy nowotworowej wskazało nowe, obiecujące cele terapeutyczne.

Wprowadzenie do leczenia raka nerkwokomórkowego inhibitorów kinaz tyrozynowych, takich jak sunitinib czy sorafenib, znacząco poprawiło efektywność leczenia [104]. Pierwszy zarejestrowany do leczenia raka wątrobowokomórkowego inhibitor wielokinazowy – sorafenib – wykazuje efekt nie tylko przeciwko komórkom guza poprzez hamowanie kinazy RAF, ale również przeciwko komórkom śródbłonka i pericytom poprzez hamowanie aktywności VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 i PDGFR- β , co w konsekwencji oznacza zablokowanie angiogenezy zależnej od VEGF i PDGF. Sunitinib jest kolejnym doustnym inhibitorem wielokinazowym, który działa na kinazy tyrozynowe receptorów VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α , PDGFR- β , FLT-3 i c-KIT. W europejskim badaniu II fazy, które objęło 45 osób z nieresekcyjnym HCC, sunitinib indukował 2% obiektywnych odpowiedzi (w tym 1 odpowiedź całkowitą) i 40% stabilizacji choroby [105]. Mediana OS wyniosła 9,3 miesiąca, a PFS 2,8 miesiąca. W innym badaniu II fazy przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych, wśród 34 chorych leczonych sunitinibem zaobserwowano 2,9% odpowiedzi częściowych i 50% odsetek stabilizacji choroby. Mediana OS i PFS wyniosły odpowiednio 9,8 i 3,9 miesiąca [106]. Briwanib jest doustnym dwukinazowym inhibitorem kinaz tyrozynowych VEGFR i FGFR. W badaniu klinicznym II fazy chorzy na HCC, nieleczeni lub poddawani wcześniej terapii inhibitorami angiogenezy (sorafenibem lub talidomidem) otrzymali briwanib. Briwanib wykazał pewną skuteczność kliniczną w leczeniu pierwszego i drugiego rzutu. Mediana OS chorych wcześniej nieleczonych wyniosła 10 miesięcy [107]. Obecnie sunitinib i briwanib są poddawane analizie w ramach badań III fazy, a inne antyangiogenne inhibitory wielokinazowe, takie jak pazopanib, wandeetanib czy cediranib, znajdują się na etapie wczesnych faz badań klinicznych.

Podsumowanie

Badania kliniczne oceniające skuteczność sorafenibu pokazały, że terapie celowane mogą zdecydowanie poprawić wyniki kliniczne i przedłużyć życie chorych na zaawansowanego HCC. Jednakże to dopiero początek ery terapii celowanych w leczeniu HCC, a wiele nowych obiecujących leków jest obecnie dopiero w fazie badań klinicznych. Cytostatyczny mechanizm działania leków ukierunkowanych molekularnie praktycznie uniemożliwia całkowite wyleczenie chorych, ale w odpowiednich warunkach klinicznych może indukować długotrwałe odpowiedzi i stabilizację choroby. Dlatego też stosując terapie oparte na lekach ukierunkowanych molekularnie, należy pamiętać, że muszą się one charakteryzować niską toksycznością, umożliwiającą przewlekłe leczenie choroby nowotworowej. Wiele pytań wiąże się nadal ze stosowaniem nowoczesnych terapii celowanych w leczeniu HCC. Nowoczesne leki o działaniu cytostatycznym wymagają nowych biomarkerów. Pomimo oczywistej skuteczności klinicznej sorafenibu, wielu chorych okazuje się opornych na leczenie. Indywidualizacja terapii celowanych zależy właśnie od biomarkerów, które pomagają przewidzieć odpowiedź i monitorować skuteczność leczenia. W przypadku sorafenibu fosforylowany ERK wydaje się obiecującym biomarkerem. Badanie II fazy oceniające skuteczność sorafenibu ujawniło, że chorzy ze zwiększonym

stężeniem aktywnej (fosforylowanej) kinazy ERK (fosfo-ERK) w komórkach guza HCC uzyskiwali zdecydowanie dłuższy czas wolny od progresji w porównaniu z osobami z małym stężeniem fosfo-ERK [108]. W przypadku innych leków celowanych stosowanych od kilku lat w leczeniu wielu nowotworów, które mogą również okazać się skuteczne w terapii HCC, takich jak bewacizumab, sunitinib, erlotinib czy temsirolimus, nadal jednak brakuje obiektywnych, zwalidowanych biomarkerów.

Skuteczność sorafenibu została wykazana głównie u chorych z adekwatną (praktycznie prawidłową) funkcją wątroby (klasa A wg skali Childa-Pugha). Wynikało to z kryteriów włączania chorych do badania klinicznego. Jednakże pacjenci z dobrą funkcją wątroby stanowią mniejszość chorych na HCC. Dlatego też konieczne jest przeprowadzenie prospektywnego badania klinicznego oceniającego skuteczność sorafenibu u chorych na HCC z funkcją wątroby gorszą niż klasa A wg skali Childa-Pugha. Niedawna retrospektywna analiza podgrup chorych uczestniczących w badaniu SHARP (prezentowana na 44. dorocznym Spotkaniu Europejskiego Towarzystwa Badań nad Wątrobą – EASL) wykazała, że sorafenib miał podobną skuteczność u chorych w pośrednim i późnym stadium HCC (Barcelona Clinic Liver Cancer stadium B i C).

Innym aspektem, który powinien być poddany analizie, jest skuteczność terapii celowanych w leczeniu adiuwantowym. Nawrót HCC po operacji lub chemoembolizacji przetętnicznej jest związany z szybką angiogenezą, dlatego też terapie antyangiogenne mogą okazać się efektywne w redukowaniu ryzyka wystąpienia nawrotu choroby. Niedawno Strebel i Dufour oceniali celowość łączenia miejscowych terapii (przecewnikowej embolizacji tętnicznej lub chemoembolizacji) z systemowymi terapiami celowanymi [109]. Badania nad identyfikacją szlaków molekularnych odpowiedzialnych za rozwój i progresję HCC wykazały, że istnieją połączenia pomiędzy poszczególnymi poziomami różnych szlaków przekazywania sygnałów. Wiedza ta może pomóc w identyfikacji nowych mechanizmów oporności na leki celowane i określić dodatkowe cele molekularne w równoległych szlakach, które muszą być równocześnie hamowane.

Sorafenib jest pierwszym lekiem stosowanym systemowo, który zniżył wydatki na czas przeżycia chorych na nieresekcyjnego HCC. Do dziś sorafenib pozostaje jedynym zarejestrowanym lekiem celowanym w systemowym leczeniu HCC. Pomimo wielu wątpliwości związanych z doborem chorych i monitorowaniem przebiegu leczenia, największym problemem pozostaje dostęp do terapii tym preparatem. Obecnie tylko najbogatsze kraje mogą sobie pozwolić na zapewnienie nowoczesnych terapii wszystkim chorym na nowotwory. Niestety, bardzo wysoki wskaźnik zachorowalności na HCC jest obserwowany przede wszystkim w biednych krajach, w których występują endemiczne zakażenia WZW B. Dlatego też powszechne stosowanie nowoczesnych terapii celowanych wymaga kompromisu pomiędzy rządami, systemami opieki zdrowotnej i koncernami farmaceutycznymi.

Piśmiennictwo

- Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127 (5 Suppl 1): S5-S16.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-6.
- Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002; 97: 72-81.
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127 (5 Suppl 1): S35-50.
- Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 674-87.
- Thorgerirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-46.
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76.
- Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1980; 286: 533-5.
- Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanou T, Bréchet C, Paterlini-Bréchet P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 2005; 54: 1162-8.
- Minami M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, Okanou T. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 4340-8.
- Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Brechet C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990; 343: 555-7.
- Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997; 150: 1141-57.
- Balsano C, Avantiaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 985-92.
- Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 1993; 192: 346-50.
- Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G. Hepatitis B virus pX activates NF-kappa B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996; 70: 641-6.
- Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990; 344: 72-4.
- Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int J Oncol* 1999; 15: 373-9.
- Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 25510-5.
- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10350-4.
- Cha MY, Kim CM, Park YM, Ryu WS. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology* 2004; 39: 1683-93.
- Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, et al. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet* 1995; 9: 41-7.
- Lee SW, Lee YM, Bae SK, Murakami S, Yun Y, Kim KW. Human hepatitis B virus X protein is a possible mediator of hypoxia-induced angiogenesis in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 456-61.
- Yamanaka T, Kodama T, Doi T. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 528-34.
- Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, Wands JR, Li J. Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology* 2005; 41: 1096-105.
- Florese RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, Hidajat R, Hotta H. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res* 2002; 90: 119-31.

26. Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991; 338: 1356-9.
27. Terasaki S, Kaneko S, Kobayashi K, Nonomura A, Nakanuma Y. Histological features predicting malignant transformation of nonmalignant hepatocellular nodules: a prospective study. *Gastroenterology* 1998; 115: 1216-22.
28. Watanabe S, Horie Y, Kataoka E, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S96-S100.
29. Caldwell S, Park SH. The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology. *J Gastroenterol* 2009; 44 Suppl 19: 96-101.
30. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 836-47.
31. Harada K, Shiota G, Kawasaki H. Transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver* 1999; 19: 318-25.
32. Hisaka T, Yano H, Haramaki M, Utsunomiya I, Kojiro M. Expressions of epidermal growth factor family and its receptor in hepatocellular carcinoma cell lines: relationship to cell proliferation. *Int J Oncol* 1999; 14: 453-60.
33. Ito Y, Takeda T, Higashiyama S, et al. Expression of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Oncol Rep* 2001; 8: 903-7.
34. Huether A, Hopfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherubl H. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1568-78.
35. Hopfner M, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherubl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41: 1008-16.
36. Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, et al. Phase II Study of Erlotinib (OSI-774) in Patients With Advanced Hepatocellular Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6657-63.
37. Thomas MB, Chadha R, Glover K, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 1059-67.
38. Ramanathan RK, Belani CP, Singh DA, et al. A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 777-83.
39. O'Dwyer PJ, Giantonio BJ, Levy DE, Kauh JS, Fitzgerald DB, Benson AB, III. Gefitinib in advanced unresectable hepatocellular carcinoma: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group's Study E1203. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2006; 24: 4143.
40. Zhu AX, Stuart K, Blaszkowsky LS, et al. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 581-9.
41. Gruenewald V, Wilkens L, Gebel M, et al. A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma: Final results. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 4598.
42. Louafi S, Hebbar M, Rosmorduc O, et al. Gemcitabine, oxaliplatin (GEMOX) and cetuximab for treatment of hepatocellular carcinoma (HCC): Results of the phase II study ERGO. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 4594.
43. Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3787-800.
44. Rowinsky EK, Youssoufian H, Tonra JR, Solomon P, Burtrum D, Ludwig DL. IMC-A12, a human IgG1 monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5549s-55s.
45. Higano CS, Yu EY, Whiting SH, et al. A phase I, first in man study of weekly IMC-A12, a fully human insulin like growth factor-I receptor IgG1 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 3505.
46. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501.
47. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6: 322-7.
48. Giannelli G, Sgarra C, Porcelli L, Azzariti A, Antonaci S, Paradiso A. EGFR and VEGFR as potential target for biological therapies in HCC cells. *Cancer Lett* 2008; 262: 257-64.
49. Oseini AM, Roberts LR. PDGFR α : a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma? *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 443-54.
50. Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13092-7.
51. Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 247-52.
52. Wang L, Wang WL, Zhang Y, Guo SP, Zhang J, Li QL. Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2007; 37: 389-96.
53. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; 135: 1972-83, 83 e1-11.
54. Rogers R, Ouellet G, Brown C, Moyer B, Rasoulpour T, Hixon M. Cross-talk between the Akt and NF- κ B signaling pathways inhibits MEHP-induced germ cell apoptosis. *Toxicol Sci* 2008; 106: 497-508.
55. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 1998; 17: 313-25.
56. Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, et al. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2008; 48: 83-90.
57. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8421-5.
58. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 671-88.
59. Liu H, Pan Z, Li A, Fu S, Lei Y, Sun H, Wu M, Zhou W. Roles of chemokine receptor 4 (CXCR4) and chemokine ligand 12 (CXCL12) in metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell Mol Immunol* 2008; 5: 373-8.
60. Xiang ZL, Zeng ZC, Tang ZY, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in hepatocellular carcinoma patients increases the risk of bone metastases and poor survival. *BMC Cancer* 2009; 9: 176.
61. Leuffgen H, Bihl MP, Rudiger JJ, et al. Collagenase expression and activity is modulated by the interaction of collagen types, hypoxia, and nutrition in human lung cells. *J Cell Physiol* 2005; 204: 146-54.
62. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440: 1222-6.
63. Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006; 20: 557-70.
64. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 71-7.
65. Levitzki A. PDGF receptor kinase inhibitors for the treatment of PDGF driven diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 229-35.
66. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.
67. Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest* 2005; 115: 2618-24.
68. Lee TK, Man K, Ho JW, et al. FTY720 induces apoptosis of human hepatoma cell lines through PI3-K-mediated Akt dephosphorylation. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2397-405.
69. Crul M, Rosing H, de Klerk GJ, et al. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1615-21.
70. Van Ummersen L, Binger K, Volkman J, et al. A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7450-6.

71. Liu F, Wang P, Jiang X, et al. Antisense hypoxia-inducible factor 1alpha gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 2055-61.
72. Semela D, Piguuet AC, Kolev M, et al. Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2007; 46: 840-8.
73. Huynh H, Chow KH, Soo KC, et al. RAD001 (everolimus) inhibits tumour growth in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 1371-80.
74. Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology* 2007; 72 Suppl 1: 30-44.
75. Rizell M, Andersson M, Cahlin C, Hafstrom L, Olausson M, Lindner P. Effects of the mTOR inhibitor sirolimus in patients with hepatocellular and cholangiocellular cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13: 66-70.
76. Lev S, Moreno H, Martinez R, et al. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995; 376: 737-45.
77. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3279-90.
78. McKillop IH, Schmidt CM, Cahill PA, Sitzmann JV. Altered expression of mitogen-activated protein kinases in a rat model of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 26: 1484-91.
79. Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 54-8.
80. Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/Erk pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the Hepatitis C Virus (HCV) core protein. *Oncogene* 2001; 20: 2606-10.
81. Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR, Kim M. Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology* 2006; 131: 1208-17.
82. Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 2003; 3: 573-88.
83. Carloni V, Vizzutti F, Pantaleo P. Farnesyltransferase inhibitor, ABT-100, is a potent liver cancer chemopreventive agent. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4266-74.
84. Wentz SC, Wu H, Yip-Schneider MT, et al. Targeting MEK is effective chemoprevention of hepatocellular carcinoma in TGF-alpha-transgenic mice. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 30-7.
85. Huynh H, Soo KC, Chow PK, Tran E. Targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 138-46.
86. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-90.
87. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25-34.
88. Poon RT, Ng IO, Lau C, et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1775-85.
89. Yao DF, Wu XH, Zhu Y, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 220-6.
90. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Vascular endothelial growth factor tightly regulates in vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 1998; 28: 1489-96.
91. Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1061-5.
92. Zhao J, Hu J, Cai J, Yang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factor expression in serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 772-6.
93. Huang GW, Yang LY, Lu WQ. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1705-8.
94. Imura S, Miyake H, Izumi K, Tashiro S, Uehara H. Correlation of vascular endothelial cell proliferation with microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in hepatocellular carcinoma. *J Med Invest* 2004; 51: 202-9.
95. Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003; 16: 552-7.
96. Liu Y, Poon RT, Li Q, Kok TW, Lau C, Fan ST. Both antiangiogenesis- and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res* 2005; 65: 3691-9.
97. Finn RS, Bentley G, Britten CD, Amado R, Busuttill RW. Targeting vascular endothelial growth factor with the monoclonal antibody bevacizumab inhibits human hepatocellular carcinoma cells growing in an orthotopic mouse model. *Liver Int* 2009; 29: 284-90.
98. Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2992-8.
99. Boige V, Baey C, Dromain C, et al. Circulating endothelial cells (CEC) and angiogenic proteins monitoring in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) treated with bevacizumab. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2009; 27: 4597.
100. Thomas MB, Morris JS, Chadha R, et al. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 843-50.
101. Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, et al. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1898-903.
102. Sun W, Haller DG, Mykulowycz K, et al. Combination of capecitabine, oxaliplatin with bevacizumab in treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC): A phase II study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 4574.
103. Hsu C, Yang T, Toh H, Epstein RJ, Hsiao L, Cheng A. Modified-dose capecitabine + bevacizumab for the treatment of advanced/metastatic hepatocellular carcinoma (HCC): A phase II, single-arm study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 15190.
104. Wsocki PJ, Zolnierek J, Szczylik C, Mackiewicz A. Targeted therapy of renal cell cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 570-5.
105. Koeberle D, Montemurro M, Samaras P, et al. Continuous sunitinib treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC): A multicenter phase II trial (SAKK 77/06 and SASL 23). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2009; 27: 4591.
106. Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, et al. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3027-35.
107. Raoul JL, Finn RS, Kang YK, et al. An open-label phase II study of first- and second-line treatment with brivanib in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2009; 27: 4577.
108. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4293-300.
109. Strelbel BM, Dufour JF. Combined approach to hepatocellular carcinoma: a new treatment concept for nonresectable disease. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 1743-9.

Adres do korespondencji

dr hab. med. **Piotr J. Wsocki**
Wielkopolskie Centrum Onkologii
ul. Garbary 15
61-866 Poznań