

W artykule przedstawiono wyniki najnowszych badań podstawowych dotyczących przyczyn chemooporności komórek raka piersi z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2*. Badania te, prowadzone na modelach komórkowych i zwierzęcych wykazały, że gwałtowna proliferacja komórek nowotworowych, towarzysząca nadprodukcji białka p185 (produktu genu *HER-2*) poprzez procesy klonalnej i adaptacyjnej selekcji opornych komórek guza prowadzi do chemooporności nabytej. Tak więc w tych przypadkach jest to raczej wtórna, a nie pierwotnie związana z amplifikacją genu *HER-2* oporność na leki chemiczne. Oznaczać to może również, że bardziej agresywne leczenie chemiczne może przynieść poprawę odpowiedzi klinicznej.

Zaprezentowano zarówno najnowsze prace kliniczne, jak i te sprzed lat, które zgodne są z wynikami dotychczasowych badań podstawowych, a analizowane razem, właściwie naświetlają problemy terapeutyczne raka gruczołu piersiowego.

W artykule przedstawiono również najnowsze sposoby chemicznego leczenia nowotworów nabłonkowych z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2*, polegające na specyficznym podawaniu leku na tarczę molekularną, oparte na strategii REC (receptor enhancement chemosensitivity).

Słowa kluczowe: rak piersi, chemooporność, gen *HER-2*.

Podłoże chemooporności raka piersi z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2*

Background of chemoresistance of breast cancer with HER-2/gene amplification and/or overexpression

Ewa Szacikowska, Wojciech Kozłowski

Zakład Patomorfologii Klinicznej Centralnego Szpitala Klinicznego Wojskowej Akademii Medycznej w Warszawie

WSTĘP

W 1997 r. ukazała się w *Journal of Chemotherapy* praca poglądowa na temat braku korzyści z leczenia chemicznego, stosowanego w różnych konwencjonalnych schematach w przypadkach raka piersi z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2*. Omówiono w niej próby wprowadzenia antracyklin do tych schematów oraz próby stosowania wyższych dawek leków chemicznych, jak i rezultaty terapii swoistymi przeciwciałami blokującymi produkt genu *HER-2* – białko p185. Autorzy wyrażają również pogląd, że trudności z doborem odpowiedniego leczenia chemicznego u pacjentek z tą postacią nowotworu, wynikają głównie z tego, że nie rozumiemy, na czym polega oporność na leczenie chemiczne, towarzysząca amplifikacji genu *HER-2*. Zdaniem autorów jest wysoce prawdopodobne, że amplifikacja genu *HER-2* może być jedynie markerem takiej oporności, natomiast sama oporność rozwija się na drodze jakiegoś nieznanego mechanizmu.

CHARAKTERYSTYKA RAKA PIERSI Z AMPLIFIKACJĄ I/LUB NADEKSPRESJĄ GENU *HER-2*

Amplifikacja genu *HER-2* należy do stałych zjawisk biologicznych obserwowanych zarówno w raku piersi i jajnika, jak i płuc czy przewodu pokarmowego, w przypadku których 10-30 proc. guzów wykazuje taką zmianę genetyczną. Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że amplifikacja i/lub nadekspresja genu *HER-2* pojawia się w 10-40 proc. pierwotnych raków piersi. W przewodowych rakach piersi *in situ* (DCIS) jest powszechna i występuje w 60-85 proc. przypadków, zaś w inwazyjnych rakach piersi (IDC) w około 30 proc. Wielu autorów podaje, że taka amplifikacja i/lub nadekspresja związana jest ze złym prognozowaniem, ponieważ istnieje duża dynamika procesu nowotworowego. Z wielu prac wynika również, że adjuwantowa terapia tamoksifenem/antyestrogenami w przypadku raka piersi z amplifikacją genu *HER-2* powinna być odrzucona, jako że prowadzi ona do wzrostu agresywności takiego guza, zaś

obecność receptorów estrogenowych współwystępująca z amplifikacją genu *HER-2* oznacza szczególnie złośliwy typ nowotworu, który jest najintensywniej stymulowany przez antyestrogeny w kierunku agresywności. Z tego powodu nie należy podawać antyestrogenów pacjentkom z amplifikacją genu *HER-2* zarówno w przypadkach współwystępowania receptorów estrogenowych, jak i wtedy, kiedy receptory te są ujemne (temu problemowi poświęcono odrębny artykuł we *Współczesnej Onkologii* nr 3/99, omawiający mechanizm działania antyestrogenów w przypadku raka piersi z amplifikacją genu *HER-2*).

Przypadki raka piersi z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2* również słabo poddają się chemioterapii, szczególnie alkaloidami *vinca rosea* (vinblastina, vincristina, kolchicina), ale również konwencjonalnymi dawkami cyklofosfamid, metotreksatu i fluorouracylu (CMF), jak również adriamycyny. Jest to zatem występowanie oporności na leczenie chemiczne, które jak wiadomo wykazuje znaczną skuteczność w przypadku raka piersi bez amplifikacji genu *HER-2*. Wiele klinicznych zespołów badało problemy chemo- i hormonooporności przypadków raka piersi z amplifikacją genu *HER-2*. Dostarczają one danych, które wyraźnie określają trzy podstawowe cechy obrazu klinicznego przypadków raka piersi z amplifikacją genu *HER-2*. Do cech tych należą:

- ▶ duża dynamika procesu nowotworowego;
- ▶ szkodliwość terapii antyestrogenowej bez względu na stan receptorów ER i PgR w guzie;
- ▶ chemooporność na leczenie konwencjonalnymi dawkami leków cytostatycznych stosowanych skutecznie w raku piersi bez amplifikacji genu *HER-2*.

Te trzy charakterystyczne cechy kliniczne pokazują, że korzystne jest wyodrębnianie dwu podgrup klinicznych o zupełnie odmiennej biologii guza i wymagających radykalnie odmiennego leczenia uzupełniającego.

CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA p185kDA (PRODUKTU GENU *HER-2*)

Gen *HER-2* ulega powszechnie ekspresji w komórkach nabłonkowych ludzkich płodów

Results of the most recent basic studies on the cause of chemoresistance of breast cancer epithelial cells with HER-2 gene amplification and/or overexpression are presented. These studies, conducted in cell and animal models, demonstrate that dramatic proliferation of cells accompanying p185 protein (HER-2 gene product) overproduction leads, via the processes of clonal and adaptive selection of resistant tumour cells, to acquired chemoresistance. Therefore, in these cases, this resistance to chemotherapeutics is rather secondary, than connected primarily with HER-2 gene amplification. This can also mean that more aggressive chemotherapy can improve clinical response.

Both the newest and some older clinical papers are presented, which agree with the results of the basic studies as yet, and, analysed together, illustrate adequately the therapeutic problems in breast cancer.

In the paper, most recent methods are also presented of chemotherapy of epithelial tumours with HER-2 gene amplification and/or overexpression, including specific drug administration on molecular target, based on the REC (receptor enhancement chemosensitivity) strategy.

Key words: breast cancer, chemoresistance, HER-2 gene.

i w tkankach dorosłych, włączając w to komórki nabłonkowe gruczołu piersiowego. Zatem produkt tego genu wykrywany jest w pewnym zakresie wartości w prawidłowych komórkach nabłonkowych. Onkogenna aktywacja genu *HER-2* pojawia się w guzach nowotworowych w wyniku amplifikacji i/lub nadekspresji tego genu. Towarzyszy temu wzrost ilości mRNA genu *HER-2* oraz zwiększona w komórkach guza ilość białka p185, produkowanego na tej matrycy. Wzrost ilości białka p185 w komórce nowotworowej jest brzemienny w skutki, zmienia bowiem biologię komórek takiego klonu i w sposób istotny wpływa na dalszy przebieg choroby. Nadprodukcja białka p185 jest jednym z mechanizmów, poprzez który nowotworowe komórki nabłonkowe mogą pozyskać selektywne pobudzenie wzrostu. Wiele guzów nabłonkowych nabywa zdolność do gwałtownej proliferacji w wyniku amplifikacji i/lub nadekspresji genu *HER-2*. Amplifikacja i/lub nadekspresja genu *HER-2*, połączona z nadprodukcją białka p185, była wielokrotnie opisywana w szeregu ludzkich nowotworów nabłonkowych, w tym w raku piersi i jajnika, jak i płuc czy przewodu pokarmowego.

Niezwykle ważna w nowotworowej nabłonkowej komórce gruczołu piersiowego, rola białka p185, wynika z jego struktury i funkcji regulowania wzrostu komórek nabłonkowych w odpowiedzi na peptydowe czynniki wzrostu. Jednak, jak wiadomo, gen *HER-2* pozostaje pod kontrolą estrogenów. Badania *in vitro* na liniach komórkowych ludzkiego raka piersi wykazały, że receptor estrogenowy (ER) stymulowany estradiolem obniża transkrypcję genu *HER-2*, zaś tamoksifen odwraca ten efekt, prowadząc do wzrostu ekspresji tego genu i wzrostu poziomu białka p185 w komórkach.

Białko p185 kodowane przez gen *HER-2* jest glikoproteiną o charakterze transmembranowego receptora czynników wzrostu. Jego wewnątrzkomórkowa domena ma właściwości kinazy tyrozynowej, zaś zewnątrzkomórkowa domena ma charakter chwytnika ligandów i uwalniana jest do krwi w wyniku częściowej powierzchniowej proteolizy białek. Ponieważ uwalnianie to jest proporcjonalne do zawartości p185 w błonach komórkowych, pomiar zewnątrzkomórkowej domeny (ECD) białka p185 we krwi jest dobrym wskaźnikiem stanu genu *HER-2* i pozwala na wykrywanie amplifikacji tego genu w guzach. Pomiar ten ma szerokie zastosowanie diagnostyczne i służy do wyodrębniania podgrupy klinicznej raka piersi z amplifikacją genu *HER-2*, celem stosowania odmiennej terapii adjuwantowej pacjentkom z tej podgrupy.

Badano różne białka będące markerami hormonoreaktywności guzów, takie jak: bc12, ER, PgR oraz białka związane z hormonopornością guzów, takie jak: EGFR, białko p185, Ki-67 czy TGF alfa, pod kątem ich diagnostycznej użyteczności w raku piersi. Stwierdzono, że poziom ECD we krwi jest najważniejszym markerem raka piersi, który najpełniej odzwierciedla biologię tego guza.

Białko p185 (receptor *HER-2*) należy wraz z receptorem *HER-1* (EGFR) oraz receptorami *HER-3* i *HER-4* do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych *HER/ErbB*. Zmiany eks-

presji tych receptorów związane są z różnymi aspektami raka piersi, przy czym zmiany w ekspresji receptora *HER-2* są najczęściej łączone z kancerogenezą nowotworów nabłonkowych, w tym z rakiem piersi. W czasie ostatnich 10 lat wykazano, że onkogeny kodujące czynniki wzrostu, takie jak EGF, TGF alfa czy IGF lub kodujące receptory czynników wzrostu EGFR i białko p185 odgrywają istotną rolę w patogenezie szeregu ludzkich nowotworów nabłonkowych. Gen *HER-2* wydaje się odgrywać tu rolę szczególnie ważną ze względu na jego częstą amplifikację i/lub nadekspresję w nowotworach nabłonkowych.

Receptory rodziny *HER/ErbB* odgrywają ważną rolę w przenoszeniu zewnątrzkomórkowych sygnałów mitogennych lub indukujących różnicowanie, poprzez wzbudzenie wtórnych cytoplazmatycznych sygnałów mitogennych lub indukujących różnicowanie. Sygnały te wzbudzone pierwotnie przez przyłączenie się ligandu do zewnątrzkomórkowej domeny receptora p185, dają sygnał wtórny do wnętrza komórki, będący kaskadą fosforylacji. Uważa się, że receptor *HER-2* (białko p185), dzięki działaniu wewnątrzkomórkowej domeny o charakterze kinazy tyrozynowej, pobudza przeniesienie sygnału wzdłuż specyficznych kaskad fosforylacji z wykorzystaniem białka ras i innych szlaków sygnalizowania, prowadzących do jądra komórkowego.

Warto w tym miejscu podkreślić, że fosforylacja ER na resztach serynowych i tyrozynowych stanowi ważne połączenie szlaków wzbudzanych przez ER ze szlakami wzbudzanych przez czynniki wzrostu za pośrednictwem kinaz.

Mechanizmy regulujące wzrost zwykle wiążą się z przyłączeniem czynnika wzrostu do specyficznego receptora na powierzchni komórki, który następnie poprzez wewnątrzkomórkową biochemiczną kaskadę prowadzi do podziału komórki. Białko p185 jest przykładem takiego receptora. Przyjęto, że nadekspresja receptorów czynników wzrostu podwyższa „wrażliwość” komórek guza na normalne poziomy czynniki wzrostu, które wiążą się z receptorem. Prowadzi to do wzbudzenia dodatkowych sygnałów mitogennych. Te sygnały, pomimo iż są fałszywe, prowadzą do nasilenia proliferacji komórek. Przyjmuje się również istnienie mechanizmu alternatywnego, polegającego na tym, że zwiększenie ilości receptora na skutek amplifikacji genu prowadzi do powstania formy konstytucjonalnie aktywującej kaskady fosforylacji w kierunku jądra komórkowego nawet pod nieobecność czynników wzrostu. W rezultacie wzbudzone są dodatkowe fałszywe sygnały mitogenne. Uważa się, że obydwa te mechanizmy biorą udział w selektywnym wyzwalaniu intensywnej proliferacji komórek guza ze zwiększoną ilością receptora czynników wzrostu, co w konsekwencji prowadzi do selektywnie zwiększonego wzrostu komórek takiego klonu.

CHEMOOPORNOŚĆ KOMÓREK RAKA PIERSI Z AMPLIFIKACJĄ GENU *HER-2*

Wyniki badań klinicznych, dotyczących związku między amplifikacją genu *HER-2* i odpowiedzią na terapię są często niejednoznaczne, czasem sprzeczne i bardzo trudne do in-

interpretacji. Można to wytłumaczyć m.in. różnicą w metodach stosowanych do oceny poziomu białka p185 w guzie, wiekiem pacjentek, badaną populacją nowotworów (*in situ versus* choroba uogólniona z przerzutami), wysokością dawki oraz typem stosowanych leków cytotoksycznych, wreszcie ze stosowaniem lub nie stosowaniem hormonoterapii we wdrożonym schemacie leczenia, jak i kolejnością stosowanego leczenia, np.: hormonoterapia przed chemioterapią lub inaczej. Dane pochodzące z różnych prac klinicznych są często sprzeczne i nie definiują jaką rolę, jeżeli w ogóle, spełnia amplifikacja genu *HER-2* w odpowiedzi raka na zastosowane leczenie chemiczne. Protokoły leczenia różnią się, natomiast grupy pacjentów nie mogą być porównywane. Koekspresja innych typów kinaz z rodziny receptorów *HER* w komórkach nowotworowych, jak i kontekst mutacji innych onkogenów może wpływać na różnice w chemowrażliwości między poszczególnymi pacjentami, co powoduje, że badane grupy kliniczne są niejednorodne. Pomimo tych rozlicznych trudności interpretacyjnych, większość danych klinicznych dotyczących tego zagadnienia wskazuje na to, że amplifikacja i/lub nadekspresja genu *HER-2* może być zapowiedzią słabej reakcji na co najmniej niektóre powszechnie stosowane schematy chemicznego leczenia adjuwantowego. Jednak w świetle tych badań rola nadekspresji białka p185 w adjuwantowej chemioterapii pozostaje niejasna. Z wielu badań wynika, że amplifikacja i/lub nadekspresja genu *HER-2* związana jest z opornością na konwencjonalne dawki cyklofosfamid, metotreksatu i fluorouracylu (schemat CMF), co wykazano w dużych randomizowanych badaniach takiego leczenia adjuwantowego. W innej, bardzo interesującej i powszechnie cytowanej pracy, Muss i współpracownicy w 1994 roku wykazali, że występuje zależny od dawki wpływ adjuwantowej polichemioterapii opartej na cyklofosfamidzie, doxorubicynie i fluorouracylu (schemat CAF), w przypadku pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi i z amplifikacją genu *HER-2*, podczas gdy efektu zależnego od dawki nie obserwuje się u pacjentek bez amplifikacji genu *HER-2*. Była to jedna z pierwszych prac, która wykazała skuteczność antracyklin i podwyższenia dawek leku cytotoksycznego w przypadku raka piersi z amplifikacją genu *HER-2*. Bardzo znamienne są również wyniki pracy Tetu i Brison'a z tego samego roku, które pokazują, że amplifikacja genu *HER-2* nie wpływa w istotny sposób na czas wolny od wznowy (DFS) lub całkowity czas przeżycia (OAS) u pacjentek z zajętymi węzłami chłonnymi, jeżeli pacjentki te nie były poddane chemicznej lub hormonalnej terapii adjuwantowej. Amplifikacja tego genu staje się jednak przyczyną szybkiej wznowy i skróconego czasu przeżycia z chwilą wdrożenia któregoś z wymienionych sposobów leczenia adjuwantowego. Najnowsze dane wykazały, że w grupie kobiet z rakiem piersi bez zajęcia węzłów chłonnych, amplifikacja genu *HER-2* jest wskaźnikiem złej prognozy i pomimo stosowania konwencjonalnego leczenia chemicznego, według standardowego schematu CMF, jest to nadal grupa zwiększonego ryzyka nawrotu choroby. Wnioskiem z tej pracy jest propozycja zastosowania bardziej agresywnej terapii adjuwantowej zamiast ma-

ło skutecznego standardowego schematu CMF. Tak więc najnowsze prace potwierdzają niektóre spostrzeżenia kliniczne sprzed sześciu lat. Allred i współpracownicy byli jednymi z tych klinicystów, którzy już w 1992 r. wykazali, że grupa pacjentek z rakiem piersi bez zajęcia węzłów chłonnych, u których stwierdzono amplifikację genu *HER-2*, stanowi grupę o złej prognozie ze względu na brak skuteczności adjuwantowej terapii opartej na schemacie CMF. Wyniki te pozostają również w zgodzie z obserwacjami, w których stwierdzono, że pacjentki z amplifikacją genu *HER-2* i przerzutami do węzłów chłonnych mogą odnosić korzyści z wyższych dawek leków chemicznych stosowanych w schemacie CAF lub antracyklin z taksanami.

W połowie lat 80. można było spotkać prace, w których wykazano, że w przypadku wielu guzów nowotworowych, oporność na chemioterapię związana była z amplifikacją pewnych genów. Fojo i współpracownicy byli wśród pierwszych autorów, którzy w 1985 r. stwierdzili obecność zamplifikowanych sekwencji w czterech nowotworowych liniach komórkowych, wykazujących oporność na vinblastinę, kolchicynę i adriamycynę. W innej pracy wykazano znaczny wzrost ekspresji EGFR w kilku innych typach komórek opornych na naturalne leki przeciwnowotworowe, takie jak dokсорubicyna, vinblastina i actinomycyna D. W ostatnich latach podjęto wiele prób wyjaśnienia problemu chemooporności związanej z amplifikacją genu *HER-2*, prowadząc intensywne badania na ludzkich liniach komórek nowotworowych *in vitro* i modelach zwierzęcych *in vivo*. Stosując 20 linii komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC), wyprowadzonych z guzów pacjentów przed rozpoczęciem leczenia, Tsai i współpracownicy wykazali w kilku kolejnych publikacjach związek między poziomem ekspresji genu *HER-2* i istotną wielolekową opornością na sześć różnych leków chemicznych.

Autorzy sugerowali, że związek między ekspresją genu *HER-2*, proliferacją komórek i chemoopornością jest w badanych liniach komórkowych bardzo ścisły lecz wymaga dalszych badań. Ta sama grupa badała również zmiany w chemowrażliwości po transfekcji genu *HER-2*, w przypadku linii komórkowej NSCLC, oznakowanej jako NCI-H460 i charakteryzującej się bardzo niską ekspresją białka p185. Wzrost ekspresji tego białka po transfekcji DNA genu *HER-2* do badanych komórek, wiązał się ze zwiększeniem oporności transfekowanych klonów na cztery badane leki chemiczne dowodząc, że wzrost ilości białka p185 wiąże się z wielolekową opornością. Wzrost aktywności kinazy tyrozynowej białka p185 powoduje istotne skutki w transdukcji sygnałów mitogenicznych szlakiem uruchamianym przez receptor *HER-2* (białko p185). Wydaje się wobec tego możliwe, że zwiększenie chemooporności przy nadekspresji białka p185, może być konsekwencją zwiększonej fosforylacji tyrozyny w klonach transfekowanych DNA *HER-2*. Mechanizm, który wywołuje ścisły związek między ekspresją p185 i chemoopornością może regulować czynność specyficznych punktów cyklu komórkowego. Te konsekwencje zaś mogą być odpowiedzialne za wzrost chemooporności. Inni autorzy zaprezentowali pracę, w której komórki

MDA-MB-435 transfekowane genem *HER-2* wykazywały po transfekcji oporność na paklitaxel. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w pracy tej wykazano, iż obserwowana oporność powstaje na drodze mechanizmu innego aniżeli aktywność genu *mdr-1*.

W 1997 r. ukazała się ogromna publikacja prezentująca wyniki będące rezultatem współpracy dwu badawczych ośrodków amerykańskich, które postawiły sobie za cel wyjaśnienie mechanizmu wpływu nadekspresji białka p185 na chemoreaktywność komórek nowotworowych. Szeroko zakrojone badania prowadzone były *in vitro* na czterech różnych liniach komórkowych ludzkiego raka piersi i dwu różnych liniach ludzkiego raka jajnika. Aby określić wpływ nadekspresji genu *HER-2* na chemoreaktywność badanych komórek, pełna długość cDNA ludzkiego genu *HER-2* została wprowadzona do pewnej ilości komórek potomnych, po czym sprawdzono czy komórki macierzyste i potomne różnią się wyłącznie tym, że potomne mają jedną kopię genu *HER-2* więcej niż rodzicielskie. W ten sposób wykluczono pojawienie się zmiany genetycznej, która jako dziedziczna w dalszych komórkach potomnych mogłaby wpływać na wrażliwość tych komórek na badane leki. Na wszystkich tych transfekowanych i sprawdzonych liniach komórkowych przebadano *in vitro* zależność efektu cytotoksycznego od dawki dla siedmiu różnych klas chemoterapeutyków, po wyznaczeniu zakresu dawek efektywnych dokonano porównania otrzymanych efektów w przypadku klonów transfekowanych z efektami dla klonów kontrolnych fałszywie transfekowanych. Chemoreaktywność była również testowana *in vivo* na bezgrasicznych myszach dla transfekowanych przeszczepów ludzkiego raka piersi i jajnika i dla przeszczepów kontrolnych. Badania te wykazały, że nadekspresja białka p185 jest niewystarczająca, aby wywołać związaną z tym białkiem oporność wielolekową. W badaniach *in vitro* zmiany w profilu chemoreaktywności obserwowane w klonach transfekowanych wykazywały specyficzność związaną z linią komórkową. Badania *in vivo* wykazały, że wszystkie transfekowane przeszczepy z nadekspresją białka p185 odpowiadały na badane klasy leków cytotoksycznych w sposób, który nie wykazywał znamiennej różnicy statystycznej w porównaniu z nietransfekowanymi przeszczepami kontrolnymi. Można więc powiedzieć, że badane i kontrolne przeszczepy wykazywały chemoreaktywność zbliżoną. Zwrócono jednak w tych badaniach uwagę na to, że przeszczepy transfekowane wykazywały systematycznie gwałtowny odrost po początkowej odpowiedzi na podawane leki. W przeszczepach nietransfekowanych zjawisko to występowało w bardzo wolnym tempie. Autorzy sugerują, że raczej intensywna proliferacja komórek guza aniżeli związana z białkiem p185 domniemana chemooporność jest przyczyną złej prognozy w przypadku raka z amplifikacją genu *HER-2*. Gwałtowna proliferacja pozwala ujawnić się chemooporności pozyskanej poprzez procesy klonalnej i adaptacyjnej selekcji opornych komórek guza. Tak więc jest to raczej pozyskana aniżeli związana *de novo* z amplifikacją genu *HER-2* oporność na leki chemiczne. Oznacza to, że wyższe dawki bardziej agresywnych leków mogą

przynosić poprawę odpowiedzi klinicznej. Tak przedstawiona przez autorów hipoteza wydaje się być w pełni zgodna z najnowszymi badaniami klinicznymi opublikowanymi przez Andrulis'a i współpracowników i Gerson'a i współpracowników oraz z wcześniejsze publikowanymi danymi klinicznymi Muss'a i współpracowników, jak i badaniami późniejszymi, gdzie wyższe dawki leków chemicznych polecane są przez autorów tych prac w oparciu o ich własne wyniki i spostrzeżenia. Także niektóre, znacznie wcześniejsze publikacje z 1992 r. wykazały, że adjuwantowa chemioterapia w schemacie CMF jest nieskuteczna zarówno u pacjentek z rakiem piersi z zajętejmi, jak i wolnymi węzłami chłonnyymi. Te wyniki wskazują wyraźnie, że oznaczanie stanu genu *HER-2* (prawidłowy czy zamplifikowany) w komórkach guza raka piersi jest niezbędne dla doboru właściwego schematu leczenia indywidualnych pacjentów.

Wyniki badań prowadzonych na modelach komórkowych i zwierzęcych wykazały, że wzrost aktywności kinazy tyrozynowej receptora *HER-2* (białka p185) nie tylko zwiększa intensywność proliferacji, ale także nasila złośliwość fenotypu, przez promowanie inwazji kolejnych etapów zdarzeń prowadzących do przerzutowania. Rola białka p185 w tworzeniu przerzutów w przypadku ludzkich komórek NSCLC badana była przez Yu i współpracowników. Autorzy porównywali zdolność do przerzutowania między linią komórkową NCI-H460, ludzkiego NSCLC wykazującego niską ekspresję białka p185, z transfektantem *HER-2* tej linii, wykazującym podwyższony poziom produktu tego genu. W porównaniu z komórkami rodzicielskimi, transfektanty wytwarzały znacznie więcej guzów przerzutowych u nagich myszy. Zmianom potencjału przerzutowania wykazanym eksperymentalnie *in vivo*, towarzyszył wzrost inwazyjności obserwowany *in vitro*. Ważne etapy w inwazji procesów przerzutowania, takie jak wydzielanie enzymów degradujących i migracja komórek były obserwowane w przypadku transfektantów z nadekspresją białka p185. Znakomitym potwierdzeniem udziału kinazy tyrozynowej w tych procesach jest praca Zhang'a i wsp. z 1998 r., w której stwierdzono, że inhibitory kinazy tyrozynowej mogą cofać indukowaną podwyższonym poziomem białka p185, transformację komórkową i cofać związane z tym białkiem zdolności do przerzutowania.

UCZULANIE KOMÓREK Z NADEKSPRESJĄ BIAŁKA p185 NA CHEMOTERAPEUTYKI

Badania na liniach komórek nowotworowych oraz na modelach zwierzęcych wykazały, że wzrost aktywności kinazy tyrozynowej białka p185 zwiększa ekspresję fenotypu złośliwego oraz indukuje wielolekową oporność w komórkach NSCLC. Wyniki te sugerują, że podwyższenie aktywności kinazy tyrozynowej, wywołane przez nadekspresję genu *HER-2*, może odgrywać podstawową rolę w rozwoju ludzkich nowotworów nabłonkowych. Związek nadekspresji genu *HER-2* w komórkach raka z agresywniejszym fenotypem i chemoopornością dostarcza wiarygodnych danych dla złego prognozowania w przypadku pacjentów

z guzami wykazującymi nadekspresję białka p185. W związku z tym można by oczekiwać, że inhibitor aktywności kinazy tyrozynowej receptora *HER-2* (białka p185) może być zdolnym do cofania transformacji komórki poprzez zmniejszenie aktywności kinazy tyrozynowej. W 1995 r. Zhang i współpracownicy stwierdzili, że emodin, inhibitor kinazy tyrozynowej, zmniejsza aktywność kinazy tyrozynowej receptora *HER-2* w komórkach z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2* w komórkach raka piersi oraz wybiórczo zmniejsza proliferację tych komórek, jak i indukuje ich różnicowanie. Na tej podstawie autorzy pracy zbudowali hipotezę, że zwiększona aktywność kinazy tyrozynowej białka p185 jest elementem istotnym w wystąpieniu chemooporności towarzyszącej nowotworom z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2*. Emodin zmniejsza więc tę chemooporność, czyli może uczulać takie komórki na leki chemiczne. Autorzy sprawdzili swoją hipotezę na komórkach NSCLC z nadekspresją genu *HER-2* i opublikowali wyniki w 1996 r. Z pracy tej wynika, że emodin obniża fosforylację reszt tyrozynowych w białku p185 i wybiórczo zmniejsza proliferację komórek NSCLC z nadekspresją genu *HER-2*. W pracy tej stwierdzono ponadto, że kombinacja niskich dawek emodin z doxorubiciną lub cisplatiną synergistycznie hamuje proliferację komórek NSCLC z nadekspresją genu *HER-2*, podczas gdy niskie dawki emodin lub któregoś z tych leków, podawane pojedynczo, wykazują minimalny efekt antyproliferacyjny na badane komórki. Wyniki te mają ogromne znaczenie kliniczne dla chemioterapii nowotworów z nadekspresją genu *HER-2*. Szlaki sygnalizacyjne receptorów czynników wzrostu są wobec tego bardzo ważnymi celami dla specyficznej terapii przeciwnowotworowej, w której lek podaje się na tarczę molekularną. Hamowaniem szlaków sygnalizowania receptora *HER-2*, bardzo zainteresowany jest National Cancer Institute (GB). W celu zidentyfikowania nowych substancji, które wybiórczo hamują szlaki receptora *HER-2*, nakładem dużych sił i środków przebadano 49 tysięcy substancji, które mogą być potencjalnymi inhibitorami tych szlaków. W tym celu określono interakcję danej substancji przeciwnowotworowej ze specyficznym „tarczowaniem” molekularnym, przez korelowanie poziomu ekspresji tarczy (kinazy tyrozynowej) ze skutkiem cytotoksycznym. Specjalnie przygotowany program komputerowy wykorzystano do analizy wyników. Rezultatem tej ogromnej pracy było wytypowanie 25 substancji o wysokim współczynniku korelacji dla cytotoksyczności i poziomu tarczy, mierzonym jako ilość mRNA dla p185. Spośród tych substancji, po dalszych badaniach wytypowano ostatecznie 14, które okazały się być wysoce skutecznymi inhibitorami szlaków sygnalizowania uruchamianych przez białko p185 i znajdując zastosowanie w badaniach klinicznych.

Inną klinicznie skuteczną metodą uczulania komórek guza z amplifikacją i/lub nadekspresją genu *HER-2* na leki przeciwnowotworowe jest stosowanie ludzkich monoklonalnych przeciwciał anty p185. Badania ludzkich komórek raka piersi i jajnika, przeprowadzono na dużą skalę celem sprawdzenia wpływu tych przeciwciał podanych pojedynczo i w kombinacji z cis-diaminodichloroplatiną

(CDDP). Badania przeprowadzone zarówno na liniach komórkowych *in vitro*, jak i *in vivo* na bezgranicznych myszach, wykazały, że wpływ monoklonalnych przeciwciał specyficznych dla zewnątrzkomórkowego epitopu białka p185, stosowanych pojedynczo daje efekt cytostaticzny, a w kombinacji ze stosowanym lekiem – cytotoksyczny, podnosząc znacznie skuteczność działania leku. Wpływ połączenia leku i przeciwciała okazał się specyficzny dla komórek wykazujących nadprodukcję białka p185 i był obserwowany przy bardzo niskim stężeniu przeciwciała, przy którym po podaniu wyłącznie przeciwciała, nie obserwowano efektu w ogóle. Stosowanie połączenia przeciwciała z lekiem nie prowadziło do wzrostu toksyczności ogólnej u myszy i dawało całkowitą remisję przeszczepów guzów raka piersi. Obserwowany synergizm związany jest z wewnątrzkomórkowym blokowaniem zdolności naprawczych DNA przez stosowane przeciwciała. W wyniku takiego działania, uszkodzenia DNA przez leki są większe i większa ilość komórek guza uruchamia mechanizm zaprogramowanej śmierci komórki. Ta zaobserwowana synergistyczna aktywność została nazwana REC (*receptor enhancement chemosensitivity*) i ma ogromne potencjalne perspektywy zastosowania klinicznego ze względu na wysoką specyficzną aktywność wobec komórek z nadekspresją białka p185 oraz ze względu na statystycznie znamienne zwiększenie potencjału zabijania komórek. Ukazała się już pierwsza praca kliniczna, w której opisano zastosowanie tej strategii włączającej kombinację CDDP i monoklonalnych przeciwciał u pacjentek z rakiem piersi z amplifikacją genu *HER-2*, opornych na chemoterapię. Wyniki przedstawione w tej pracy są niezwykle zachęcające i są zapowiedzią dalszych prób klinicznych w najbliższej przyszłości, przeprowadzanych z zastosowaniem innych leków przeciwnowotworowych (np. antracyklin), które uzyskały bardzo dobre wyniki w badaniach przedklinicznych. Te przedkliniczne badania wykazały addytywny lub synergistyczny sposób działania badanych leków w połączeniu ze specyficznymi monoklonalnymi przeciwciałami anty p185. Wydaje się, że strategia REC przyniesie istotny przełom w chemicznym leczeniu nabłonkowych nowotworów z amplifikacją genu *HER-2*. Podstawowym problemem na dziś wydaje się zatem być konieczność powszechnego wdrożenia dobrej metody diagnostycznej umożliwiającej prawidłowe wyodrębnianie subpopulacji pacjentów z amplifikacją genu *HER-2*. Jest to potrzebne nie tylko ze względu na dobór odpowiedniego leczenia chemicznego dla tych pacjentów, ale również ze względu na ochronę pacjentek z rakiem piersi i amplifikacją genu *HER-2* (bez względu na stan receptorów estrogenowych) przed terapią tamoksifenem/antyestrogenami, która jest dla nich zdecydowanie szkodliwa.

PIŚMIENNICTWO W REDAKCJI

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. przyr. Ewa Szackiowska
Zakład Patomorfologii Klinicznej Centralnego Szpitala Klinicznego WAM
ul. Szaserów 128
00-909 Warszawa