

W artykule zaprezentowano fakty oraz najbardziej prawdopodobny tok wydarzeń molekularnych i biologicznych, pojawiających się w komórkach raka piersi podczas 2 kolejnych etapów leczenia hormonalnego. Przedstawiony sposób rozumowania stanowi próbę współczesnej interpretacji, od dawna dobrze udokumentowanych faktów klinicznych związanych z przebiegiem leczenia hormonalnego, w oparciu o dostępne na obecnym etapie wiedzy wyniki intensywnie prowadzonych w ostatnich latach badań podstawowych. Szczególny nacisk położono na głębokie zmiany w biologii komórek raka piersi, mające charakter zmian adaptacyjnych, a wywołane estrogenową terapią ablacyjną. Procesy te bowiem w obliczu braku estrogenów zapoczątkowują uruchomienie potężnej maszyny zmian w komórce, prowadzących do przestawienia regulacji wzrostu komórek raka piersi z endo- i parakrynej na auto/intrakrynną, co w efekcie końcowym oznacza progresję fenotypu złośliwego. W artykule podjęto próbę szczegółowej analizy tego skomplikowanego procesu. Opiera się ona na kilku, stosunkowo niedawno poznanych faktach, które dość radykalnie zmieniły sposób rozumienia progresji raka piersi i dobrze tłumaczą niepowodzenia terapii hormonalnej.

Konstytucjonalna aktywacja transkrypcjonalna receptora estrogenowego przez peptydowe czynniki wzrostu pod nieobecność estrogenów jest jedną z najważniejszych zmian adaptacyjnych, leżącą u podstaw niepowodzenia terapii hormonalnej w raku piersi, prowadzącą do nasilenia proliferacji komórek. Towarzyszy jej wywołany antyestrogenami niesterydowymi, stosowanymi w antyestrogenowej terapii ablacyjnej, wzrost ekspresji genów HER2 i HER3, z następowym wzrostem w komórce liczby receptorów czynników wzrostu kodowanych przez te geny. Wzrost liczby tych receptorów w komórce jest wysoce onkogenny, wiąże się bowiem z wyjątkowo łatwym powstawaniem ich kompleksu heterodimerskiego, który jest jedną z najagresywniejszych onkoprotein i jest odpowiedzialny za wzrost intensywniej sygnalizacji mitogennej szlakiem ras-raf-MAPKs. Ta zintensyfikowana sygnalizacja, wywołująca wzrost aktywności MAPKs, jest bezpośrednią przyczyną progresji cyklu komórkowego i wzrostu dynamiki podziałów komórkowych. Z drugiej zaś strony, zwiększenie ekspresji receptorów HER2 i HER3 w komórce raka piersi oznacza wzrost wrażliwości tych ko-

Współczesna interpretacja niepowodzeń hormonoterapii raka piersi

Current interpretation of hormonal therapy failure in breast cancer

Wojciech Kozłowski, Ewa Szacikowska

Zakład Patomorfologii CSK WAM

WSTĘP

Zrozumienie procesów związanych z progresją raka piersi staje się stopniowo coraz bardziej możliwe dzięki ogromnemu postępowi wiedzy onkobiologicznej, jaki dokonał się w ciągu ostatnich 5 lat. Dzięki technikom biologii molekularnej, z pewnym zaskoczeniem i niedowierzaniem poznano nowe fakty, które gromadzone w coraz większej ilości doprowadziły do obalenia ustalonych od wielu lat dogmatów i rzuciły zupełnie nowe światło na zjawiska związane z progresją nowotworów pochodzenia nabłonkowego u ludzi, w tym również raka piersi.

W zakresie problemów związanych z rakiem piersi padł podstawowy dogmat, że związanie właściwego ligandu jest wymogiem absolutnym do aktywacji receptora estrogenowego. Dziś wiadomo, że ER, który jest jednocześnie czynnikiem transkrypcyjnym, może być aktywowany zarówno przez wiązanie właściwego ligandu, jak i bezpośrednio w wyniku działania innych zewnątrzkomórkowych sygnałów mitogennych, idących od peptydowych czynników wzrostu, wysyłających sygnały szlakiem ras-raf-MAPKS [1, 2]. Ta niezależna od sterydów aktywacja ER przy udziale czynników wzrostu i – jak wykazano – odbywająca się swobodnie pod nieobecność estrogenów, pokazała wyraźnie, że szlaki oddziaływania ER i peptydowych czynników wzrostu nie są, jak przez wiele lat sądzono, zupełnie odrębnymi szlakami biochemicznymi, lecz przeciwnie – są ze sobą silnie sprzężone. Wykazanie estrogenozależności genu HER2 i HER3 było kolejnym, bardzo mocnym potwierdzeniem istnienia tego sprzężenia [3]. Także wykrycie drugiego receptora estrogenowego – ER *beta* i poznanie sposobu jego sygnalizowania, idealnie wpasowało się w obecną interpretację progresji fenotypu złośliwego raka piersi w powiązaniu z terapią hormonalną [4–6].

Te nowe, niesłychanie ważne odkrycia kilku ostatnich lat spowodowały, że dziś zupełnie inaczej rozumie się procesy związane z progresją raka piersi, a także inaczej interpretuje się jego hormonooporność, do której prowadzi estrogenowa terapia ablacyjna. Stosowane w tej terapii antyestrogeny wywołują w komórkach raka

głębokie zmiany adaptacyjne, które powodują, że szybko zaczynają się one zmieniać w mitogeny i skutecznie zwiększają proliferację takich komórek. Ogromne znaczenie dla postępu wiedzy dotyczącej progresji raka piersi miały również intensywne badania podstawowe, prowadzone nad sposobem powstawania i działania w komórce nowotworowej pochodzenia nabłonkowego, w tym również raka piersi, heterodimerskiego kompleksu receptorów HER2 i HER3. Heterodimer ten, będący jedną z najagresywniejszych onkoprotein, współdziała w raku piersi ze zwiększoną w jego komórkach autokrynną produkcją heregulin. Najnowsze badania wykazują, że sprawne powstawanie tego heterodimeru, stymulowane z jednej strony zwiększoną produkcją autokrynnych heregulin, z drugiej zaś zwiększoną wrażliwością takich komórek na ich działanie, jest główną siłą napędową progresji fenotypu złośliwego komórek raka piersi. Tę zwiększoną wrażliwość komórek raka piersi na heregulinę stymulują również antyestrogeny niesterydowe, pobudzając ekspresję receptorów HER2 i HER3 w komórkach poddanych estrogenowej terapii ablacyjnej.

FAKTY KLINICZNE I ICH MODELE KOMÓRKOWE

Celem artykułu jest próba pokazania mechanizmów molekularnych i biologicznych, które mogłyby wyjaśnić dobrze udokumentowane fakty kliniczne, dotyczące hormonoterapii raka piersi. Zatem o jakie fakty kliniczne chodzi? Ogólnie znanym zjawiskiem jest fakt, że kobiety z hormonozależnym rakiem piersi odpowiadają regresją guza na kastrację farmakologiczną lub inną. Ta początkowa strategia terapeutyczna oparta jest najczęściej na blokowaniu receptorów estrogenowych przez niesterydowe antyestrogeny typu tamoksifen i pozwala uzyskać remisję trwającą 12–18 mies., po której często następuje nawrót choroby [7]. Wystąpienie oporności na niesterydowe antyestrogeny, np. TAM, nie oznacza jeszcze zaniku hormonoreaktywności guza. Często skuteczna okazuje się kolejna interwencja farmakologiczna, polegająca na bardziej kompletnym blokowaniu działania estrogenów i oparta na tzw. czystych antyestrogenach, czyli antyestrogenach sterydowych *Imperial Che-*

mórek na zwiększone w nich poziomy produkowanych autokrynnie peptydowych czynników wzrostu o charakterze heregulin – HRGs. W miarę pogłębiania się procesów adaptacyjnych w komórkach raka piersi, w odpowiedzi na pozbawienie ich dostępu do estradiolu, powstają coraz dogodniejsze warunki do sprawniejszego oddziaływania autokrynnych heregulin. Procesy te dodatkowo intensyfikują mitogenne sygnalizowanie, idące od heterodimeru HER2/HER3 szlakiem *ras-raf-MAPKs*, co jest kolejną przyczyną narastania dynamiki cyklu komórkowego i progresji fenotypu złośliwego.

Skróty: ER – receptor estrogenowy, MAPK – mitogen activated protein kinase, AR – receptor androgenowy, HER – human epidermal growth factor receptors family: HER1/EGFR, HER2/p185, HER3, HER4; TAM – tamoksifen.

Słowa kluczowe: rak piersi, hormonooporność komórek raka, HER, heregulin, cyklooksigenaza 2, Herceptyna.

In the paper the facts and the most probable course of molecular and biological changes are presented, occurring in breast cancer cells during two successive stages of hormone treatment. The presented way of thinking is an attempt at modern interpretation of clinical facts connected with hormonal treatment, well documented since a long time. The interpretation was based on the results, of widespread basic studies conducted in recent years and available at the present level of knowledge. Particular attention was paid to deep changes in the biology of breast cancer cells, being of adaptive character and caused by estrogen ablative therapy. These processes, in view of lacking estrogens, start the potent mechanism of changes in the cell leading to switching of breast cancer cell growth regulation from endocrine and paracrine to auto/intracrine which, finally, means the progression of malignant phenotype. In the paper an attempt has been made at detailed analysis of this complicated process. It is based on several relatively recently learned facts which have rather radically changed the way of understanding breast cancer progression and well explain the failures of hormonal therapy.

The constitutional transcriptional activation of estrogen receptor by peptide growth factors in the absence of

mical Industries (JCI) 182,780 lub 164,384 [7–9]. Jeżeli ta interwencja jest skuteczna, można uzyskać kolejną, 12–18-miesięczną remisję. Jednak również i w tym przypadku należy liczyć się z nawrotem choroby, co tym razem jednak oznacza już faktyczny, całkowity zanik hormonoreaktywności guza na oddziaływanie antyestrogenami [7]. Wobec tych klinicznych obserwacji pojawia się pytanie, co w czasie tych kolejnych 2 etapów leczenia zachodzi w komórce raka piersi?

Do przebadania tego problemu w wielu ośrodkach posłużono się systemami *in vitro* jako paradygmatem okoliczności zachodzących po ekspozycji na leczenie hormonalne [10–13]. Te modelowe systemy *in vitro* opierają się na badaniu dzikiego typu komórek raka piersi, które dla swego wzrostu wymagają obecności estradiolu, tak jak hormonozależne guzy piersi u pre- i postmenopauzalnych kobiet. W celu odtworzenia klinicznego wpływu pierwotnej terapii hormonalnej, hodowane komórki były pozbawiane estrogenów w medium, czemu towarzyszyło wybitne osłabienie zdolności proliferacyjnej, trwające ok. 3 mies. Po tym czasie obserwowano powrót do intensywnej aktywności proliferacyjnej komórek, bez podawania estrogenów z zewnątrz. Można zatem przyjąć, że obserwowane zjawiska dobrze naśladują nawrót choroby, obserwowany u pacjentek po podawaniu, np. TAM-u. Co więcej, w tym komórkowym modelu, podobnie jak u pacjentek, wzrost komórek guza można często ponownie zahamować stosując antyestrogeny sterydowe ICI [12]. Dzięki takim doświadczeniom można było lepiej zrozumieć mechanizmy nawrotu raka oraz powtórnej pozytywnej odpowiedzi u pacjentek na terapię hormonalną.

W opisywanych badaniach modelowych udowodniono występowanie mechanizmu adaptacyjnego w komórkach raka piersi, poddanych długotrwałemu pozbawieniu estradiolu. Polega on na zwiększeniu ekspresji ER i nasileniu transkrypcyjnej aktywacji genów docelowych dla tego hormonu, głównie *c-myc* i *c-myb* [12, 14]. Opisano 2–4-krotny wzrost ilości ER w komórkach raka piersi, hodowanych bez estradiolu. Wzrost ten dotyczył zarówno ekspresji samego białka receptorowego ER i jego matrycy mRNA, jak i poziomu wiązania ligandu oraz ekspresji mRNA genów docelowych dla ER [12]. Choć receptor ten nie był obsadzony ligandem w badanych warunkach modelowych, zachowywał się jednak tak, jak gdyby był zaktywowany ligandem fizjologicznym i maksymalnie aktywował geny docelowe wywołujące proliferację komórek. Należy podkreślić, że obserwowanej proliferacji nie można już było bardziej zintensyfikować przez podanie, np. egzogenne estradiolu [12]. Tak więc komórka raka piersi przy braku estradiolu zamienia umiarkowaną proliferację, wywołaną prawidłowym receptorem związanym przez estradiol, na proliferację maksymalną wywołaną przez niezligandowany ER, który w tej nowej sytuacji pojawia się w zwiększonej ilości i wpływa na nasilenie aktywności mitotycznej bez reagowania na własne ligandy – estrogeny lub antyestrogeny niesterydowe, np. TAM. Komórka wymyka się spod kontroli estrogenów i osiąga wyższy stopień złośliwości, będący bezpośrednią zapowiedzią hormonooporności.

Jednak opisane wyniki nie są zaskakujące. Wprost przeciwnie – wykazują ogromne podobieństwo do wyników uzyskanych w badaniach nad rakiem prostaty. Komórki raka prostaty, pozbawione androgenów w hodowli tkankowej, wykazują po pewnym czasie trwania takiego stanu co najmniej 10-krotny wzrost liczby receptorów androgenowych, zwiększoną szybkość wzrostu oraz zwiększoną ilość mRNA genu *c-myc* [15]. Obserwacje te sugerują, że sposób odpowiedzi na długotrwały brak hormonu, który jest fizjologicznym ligandem dla danego receptora, może być zjawiskiem wspólnym dla raka piersi i raka prostaty, i może uruchamiać podobne mechanizmy, prowadzące do nasilenia proliferacji, które są odpowiedzialne za odrost komórek raka. Omawiane zmiany adaptacyjne, wywołane brakiem ligandu natywnego dla odpowiedniego receptora, w obydwu omawianych typach raka przebiegają klinicznie z utratą odpowiedzi na stosowaną hormonalną terapię ablastyczną i progresją choroby nowotworowej.

Zarówno w badaniach na komórkach raka prostaty, jak i na komórkach raka piersi zwrócono uwagę na fakt, że w obydwu przypadkach wzrost aktywności proliferacyjnej badanych komórek, po usunięciu ligandu fizjologicznego i pauzie proliferacyjnej, był znacznie większy niż wynikałoby to ze wzrostu ilości odpowiedniego receptora [12, 15]. W przypadku komórek raka piersi obserwowano ok. 15-krotny wzrost aktywności genów docelowych po 2–4-krotnym wzroście ilości ER. Postuluje się więc udział dodatkowych mechanizmów występujących po usunięciu estradiolu z medium hodowlanego, które mogą odgrywać ważną rolę w nasilaniu proliferacji komórek raka piersi.

Jednym z mechanizmów, które – jak wynika z wielu prac [1, 2, 16] – mogą uczestniczyć w nasilaniu proliferacji wywołanej wzrostem ilości ER i zwiększaniu transkrypcyjnej aktywności genów *c-myc* i *c-myb*, może być specyficzne ufosforylowanie molekuł tego receptora w omawianych warunkach.

ZMIANY FUNKCJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO TOWARZĄCĄ ESTROGENOWEJ TERAPII ABLACYJNEJ

Receptory estrogenowe, jak inne jądrowe receptory hormonów kodowane przez geny Erb A, zmieniają wiele przejawów swego działania, w zależności od stopnia i sposobu ufosforylowania, na co ma wpływ aktywność szeregu kinaz proteinowych, w tym również MAPKs [1, 2, 13, 16]. Okazuje się, że wykazywanie przez receptory estrogenowe zdolności do transkrypcyjnej aktywacji genów pobudzających proliferację, zależy przede wszystkim od sposobu ich ufosforylowania, w dalszej zaś kolejności od wiązania fizjologicznego ligandu, czyli w tym przypadku estradiolu, co także wiąże się z odpowiednim ufosforylowaniem. Wykazano również występowanie silnie działającego mechanizmu, zupełnie niezależnego od estrogenów, który prowadzi do transkrypcyjnej aktywacji receptora estrogenowego *alfa*, poprzez fosforylację jego seryny w pozycji 118 [2]. Takiej fosforylacji dokonują MAPKs zaktwowane sygnałami mitogennymi (kaskadami fosforylacji), idącymi od

estrogens is one of the most important adaptative changes being the reason of hormonal treatment failure in breast cancer, leading to intensification of cell proliferation. This is accompanied by an increase of HER2 and HER3 gene expression, caused by non-steroid antiestrogens used in antiestrogen ablation therapy, with consecutive increase in the cell of the number of receptors of growth factors encoded by these genes. The increase of the number of these receptors in the cell is highly oncogenic, since it is connected with extremely easy formation of their heterodimer complex which is one of the most aggressive oncoproteins and is responsible for an increase of intense mitogenic signalling via the ras-raf-MAPKs pathway. This intensified signalling, causing MAPKs activity increase is the direct cause of cell cycle progression and increase of cell division rate. On the other hand, the increase of HER2 and HER3 receptor expression in breast cancer cell means susceptibility increase of these cells to increased levels in the cells of autocrine produced peptide growth factors of the character of heregulins – HRGs. With progression of adaptation processes in breast cancer cells in response to their deprivation of estradiol, ever better conditions develop to more efficient action of autocrine heregulins. These processes additionally intensify the mitogenic signals going to the HER2/HER3 heterodimer by the ras-raf-MAPKs pathway, which is another cause of increasing rate of cell cycle and progression of malignant phenotype.

Key words: breast cancer, hormonal resistance of cancer cells, HER, heregulins, cyclooxxygenase 2, Herceptin.

różnych mitogenów, w tym także nadekspresji receptorów czynników wzrostu (np. receptorów HER). Aktywacja MAPKs odbywa się przez fosforylację jej reszt treoninowych i tyrozynowych, w wyniku czego powstaje podwójnie ufosforylowana, bardzo aktywna biologicznie postać MAPKs [13, 17]. Zwiększenie aktywności tej fosfokinazy wiąże się zawsze z rozregulowaniem sygnałów kontrolujących wzrost i prowadzi dalej do aktywacji kaskad fosforylacji MAPKs, odgrywających zasadniczą rolę w progresji cyklu komórkowego [17]. Zaktywowane MAPKs włączają do tego procesu receptory estrogenowe *alfa*, poprzez ich fosforylację na krytycznej 118 serynie, dzięki czemu powstaje taka strukturalna i konformacyjna forma ER *alfa*, która jest zaktywowana konstytucjonalnie i pobudza znamienne i niespecyficzenie proliferację komórek – niezależnie od obecności właściwych dla tego receptora ligandów – estrogenów czy antyestrogenów. Zatem komórka pozyskuje cechy wzrostu wynikające z hormononiezależnej aktywacji ER [1, 2, 13]. Związany z tym wzrost komórek staje się intensywniejszy. Ma w tym również udział podwyższona w komórkach raka piersi aktywność MAPKs. Są to procesy niesłychanie ważne z klinicznego punktu widzenia, ponieważ zjawiska te leżą u podstaw niepowodzenia terapii hormonalnej raka piersi.

Warto w tym miejscu podkreślić dalszą zbieżność ewolucji raka piersi z procesami zachodzącymi w raku prostaty. Niezwykle sugestywnym faktem jest, że również w raku prostaty wykazano, iż receptor androgenowy, może pod nieobecność androgenów ulegać hormononiezależnej aktywacji w rezultacie działania peptydowych czynników wzrostu [18–20]. Tak zaktywowany receptor indukuje ekspresję genów AR-zależnych – m.in. *c-myc*, prowadząc do nasilenia proliferacji komórek raka prostaty. Podobnie jak w raku piersi towarzyszy temu wzrost aktywności MAPKs, świadczący o rozregulowaniu sygnałów kontrolujących wzrost, czyli o wzmożonej sygnalizacji mitogennej idącej szlakiem receptorów HER.

Podwyższone poziomy ekspresji i aktywności MAPKs i ich związek z fenotypem złośliwym, zostały wykazane w pierwotnym raku piersi w porównaniu z tkanką prawidłową sutka i wzrostem łagodnym [21]. Dotyczy to również raka prostaty [22]. Jak już wcześniej wspomniano, w badaniach na modelach komórkowych raka piersi wykazano, że aktywność ta znamienne wzrasta przy braku estradiolu w medium hodowlanym. Komórki w czasie tej swoistej przerwy proliferacyjnej, wywołanej brakiem tego hormonu, przygotowują się do rozrostu i wzmożonych podziałów przez nasilenie mechanizmów prowadzących do wzrostu ekspresji receptorów estrogenowych *alfa* i wzrostu aktywności MAPKs [12]. W czasie selektywnej presji estrogenowej terapii ablacyjnej powstają w komórce dogodne warunki mikrośrodowiskowe do tego, aby peptydowe czynniki wzrostu mogły przez podwyższone poziomy MAPKs aktywować niespecyficzenie zwiększone ilości ERs. W ten sposób peptydowe czynniki wzrostu ułatwiają komórkom raka piersi przejście do stopniowego i systematycznego przestawiania się z hormonalnej i parakrynej na autokrynną regulację wzrostu. Stop-

niowo wzrasta ekspresja genów *c-myc* i *c-myb*. Komórka ponownie zaczyna proliferować. W tej sytuacji korzystne może się okazać podanie czystych antyestrogenów sterydowych ICI, gdyż one właśnie wyhamowują ekspresję ER oraz genów *c-myc* i *c-myb* i mogą przejściowo zmniejszyć proliferację komórek, zmniejszając oddziaływanie tych genów i ER na pobudzanie aktywności MAPKs [12, 13]. Pomimo tego aktywność MAPKs będzie jednak nadal systematycznie wzrastać. Coraz więcej danych wskazuje bowiem na to, że pozbawienie komórek raka piersi kontaktu z estrogenami powoduje wytworzenie zwiększającej się systematycznie wrażliwości takich komórek na czynniki wzrostu, również autokrynnie, co w konsekwencji prowadzi do nasilenia sygnałów mitogennych, idących przez receptory tych czynników oraz MAPKs. Jak już wyżej wspomniano, procesy te prowadzą do dalszego narastania proliferacji komórkowej.

WZROST WRAŻLIWOŚCI KOMÓREK RAKA PIERSI NA PEPTYDOWE CZYNNIKI WZROSTU W ODPOWIEDZI NA ESTROGENOWĄ TERAPIĘ ABLACYJNĄ

Jak wiadomo, wzrost wrażliwości komórek nowotworowych na czynniki wzrostu bezpośrednio wiąże się z nadprodukcją właściwych dla tych czynników receptorów (np. kiedy w grę wchodzi amplifikacja lub nadekspresja genu HER2). Jednocześnie na modelach komórkowych raka piersi wykazano, że podawanie TAM lub pozbawianie hodowanych komórek dostępu do estradiolu pobudza ekspresję genu HER2 kodującego transmembranowy receptor czynników wzrostu HER2, czyli białko p185, przez co zwiększa liczbę tych receptorów w komórce. Fakt ten, dostrzeżony w licznych badaniach na modelach komórkowych już na początku lat 90. [23–26], został w 1997 r. potwierdzony w kompleksowych badaniach genu HER2, wykonanych technikami biologii molekularnej [3]. Jak wykazano, mechanizm tego procesu opiera się na działaniu sekwencji wzmacniającej DNA (*enhancera*), leżącej w pierwszym intronie genu HER2, a oddziałującej w sposób zależny od ER na promotory genów HER2 i HER3. Działanie tego *enhancera* w obecności estradiolu, wycisza ekspresję obydwu wymienionych genów, zaś brak tego hormonu lub podanie antyestrogenów niesterydowych, np. TAM-u, wyraźnie wzmacnia ich ekspresję, czego konsekwencją jest wzrost liczby receptorów HER2 i HER3 w komórce [3]. Wykrycie mechanizmu kierującego zależnością, w której gen HER2 i HER3 wykazują wzmożoną ekspresję w obecności antyestrogenów niesterydowych lub braku estrogenów, jest ogromnie ważne z klinicznego punktu widzenia. Uważa się bowiem, że już względnie niska ekspresja tych 2 genów działa silniej jako onkogenny czynnik stymulujący proliferację komórki, aniżeli drastyczna nawet nadekspresja samego tylko genu *HER2*, np. w związku z jego amplifikacją [3, 27]. Wynika to z faktu, że receptory HER2 i HER3 z ogromną łatwością tworzą bardzo trwałe heterodimer HER2/HER3, będący jedną z najo- gresywniejszych onkoprotein, która jest kon-

stytucjonalnie zaktywowana i wysyła silne fałszywe mitogenne pobudzenia szlakami receptorów HER do MAPKs [28–30]. Dalsze systematyczne nasilenie sygnałów mitogennych idących tym szlakiem, a związanych ze wzrostem ekspresji wymienionych receptorów, znosi po pewnym czasie hamujące działanie antyestrogenów sterydowych ICI, gdyż komórka ulegając narastającej presji zwiększonej aktywności fosfokinaz MAP na progresję cyklu komórkowego zaczyna gwałtownie proliferować [17]. Mamy zatem do czynienia z kolejną wznową i kolejnym przejściem komórki na wyższy stopień złośliwości. Tym razem jednak towarzyszy temu ostateczna i całkowita utrata hormonoreaktywności takich komórek, rozumiana jako możliwość hamowania ich wzrostu przez antyestrogeny.

Od tego momentu strumień sygnalizacji mitogennej, prowadzący przez MAPKs, staje się główną i potężną siłą wywierającą coraz intensywniejszy wpływ na dynamikę cyklu komórkowego. Właśnie dlatego wpływ antyestrogenów ICI na hamowanie proliferacji komórkowej z natury rzeczy może być jedynie przejściowy, gdyż komórka w sposób coraz bardziej zdecydowany przestawia się na nasilenie autonomicznej sygnalizacji mitogennej, przebiegającej z pobudzeniem szlaku prowadzącego do MAPKs. Badania kilku ostatnich lat pokazały, jak bardzo wiąże się to z autokrynną produkcją w komórkach raka piersi, peptydowego czynnika wzrostu, heregulin i stałym stymulowaniem przez nie szlaku sygnalizacji mitogennej, prowadzącej przez receptory HER do MAPKs [28, 30–34].

ROLA HEREGULIN W PRZECHODZENIU KOMÓREK RAKA PIERSI NA AUTO/INTRAKRYNNĄ REGULACJĘ WZROSTU

Wiadomo, że nabłonkowe komórki gruczołu piersiowego wykazują po transformacji nowotworowej zwiększoną ekspresję mRNA dla HRGs i immunoreaktywnych izoform tego peptydowego czynnika wzrostu [33]. Równie istotnym faktem badawczym było sklonowanie w jednej z linii komórkowej raka piersi nowej izoformy heregulin – *gamma* HRG, która nie ulega ekspresji w prawidłowym nabłonku, pojawia się dopiero po transformacji nowotworowej i jak wykazano, włączana jest w autokrynną mechanizm wzrostu nowotworowego [34]. Z wcześniejszych prac [35] również wiadomo, że HRGs prowadzą do aktywacji receptora HER2 i pobudzają wzrost komórek raka piersi pod nieobecność estrogenów. Cytowane prace pokazują wyraźnie, że w komórkach raka piersi dochodzi do intensyfikacji oddziaływania peptydowych czynników wzrostu HRG w związku z transformacją nowotworową. Wzrost autokrynną produkcją czynników wzrostu HRG wydaje się odgrywać niesłychanie ważną rolę we wzroście komórek raka piersi. Jak wskazują na to wyniki badań ostatnich kilku lat, autokrynną ekspresją tego czynnika wzrostu w komórkach raka stanowi bowiem główny mechanizm prowadzący do powstawania w komórce jednej z najagresywniejszych onkoprotein, jaką jest heterodimer receptorów HER2/HER3 [28,

30–33, 36]. Tworzenie się tego heterodimeru w komórkach raka piersi odpowiedzialne jest za obserwowany w badaniach modelowych i klinicznych stopniowy wzrost aktywności MAPKs podczas paazy proliferacyjnej, następującej po odcięciu komórek raka piersi od dostępu do estradiolu oraz systematycznie dalej w okresie późniejszym przy przechodzeniu komórek raka do stanu bardziej zaawansowanego [21]. Z drugiej zaś strony systematyczne zwiększanie ekspresji receptorów HER2 i HER3 stymulowane brakiem tego hormonu, prowadzi do wzrostu wrażliwości komórek raka piersi na autokrynną heregulinę. To one właśnie specyficznie aktywują receptory HER3, w sposób spontaniczny i preferencyjny dimeryzują z receptorem HER2, silnie go aktywując. W komórce dochodzi do stałego stymulowania mitogennej sygnalizacji idącej szlakiem HER do MAPKs, w związku z coraz sprawniejszym powstawaniem heterodimeru HER2/HER3. Nasilenie w komórce sygnalizacji tym szlakiem prowadzi do autoregulacyjnego obniżenia ekspresji ERs [35]. Wystymulowana wysoko przez antyestrogeny niesterydowe, np. tamoksifen, ekspresja ER w pierwszej fazie leczenia hormonalnego [12], zostaje najpierw obniżona przez podawanie antyestrogenów sterydowych ICI [12] w drugiej fazie leczenia hormonalnego, po czym ulega dalszemu obniżaniu autoregulacyjnemu w miarę nasilenia sygnalizacji szlakiem ras-raf-MAPKs [27, 35, 37]. Wobec tego prowadzi to do odwróconej korelacji między ER i receptorami HER2 w rakach inwazyjnych, co jest dobrze znanym faktem klinicznym [27, 38–41]. W rezultacie komórki raka piersi, które początkowo były hormonoreaktywne i ER-pozytywne i w trakcie hormonalnej terapii ablastycznej rozpoczęły długotrwały proces przestawiania regulacji wzrostu z endo- i parakrynnego na auto/intrakrynną, w końcowej fazie tego procesu przypominają komórki raka z amplifikacją genu HER2 i jak one stają się hormonooporne i ER-negatywne (lub wykazują niskie poziomy ER) [27]. Podobnie jak one wykazują bowiem również stałe intensywne pobudzenie szlaku receptorów HER, prowadzące od heterodimeru HER2/HER3 do MAPKs, dlatego na tym etapie klinicznie rokują już równie źle. W obydwu przypadkach decyduje o tym sprawne powstawanie dimerycznego kompleksu receptorów HER2/HER3, intensywnie aktywowanego autokrynnymi heregulinami, choć w przypadku raka z amplifikacją genu HER2 ilość tego heterodimeru jest znacznie większa, a sygnalizacja mitogenna bardziej nasiloną i w związku z tym również znacznie bardziej złośliwy fenotyp raka.

Ostatnio wykazano [22, 42], że również w raku prostaty przejście do bardziej zaawansowanego stanu i hormonooporności komórek raka wiąże się bezpośrednio ze wzrostem ekspresji i aktywacji MAPKs, co jest wywołane stałą stymulacją szlaku ras-raf-MAPKs przez nasiloną auto/intrakrynną produkcję peptydowych czynników wzrostu typu EGF i ich receptorów z rodziny HER. Podobnie jak w raku piersi, wykazujące hormononiezależność sublinię raka prostaty odznaczają się niższym poziomem receptorów androgenowych i wyższym poziomem receptorowego białka HER2, aniżeli ich odpowiedniki androgenozależne [43].

ROLA RECEPTORÓW HER W PROGRESJI RAKA I REGULOWANIU EKSPRESJI CYKLOOKSYGENAZY 2

Przedstawione w artykule fakty oraz zaprezentowana kolejność i zależność zdarzeń pojawiających się w komórkach raka piersi podczas 2 kolejnych etapów leczenia hormonalnego można przyjąć jako podstawowy schemat zachodzących zjawisk, pozwalający na obecnym etapie wiedzy tak właśnie rozumieć niepowodzenia tego typu terapii. Należy jednak pamiętać o tym, że w tle omawianych zmian odbywa się ogromna liczba innych wydarzeń, typowych dla postępującego procesu nowotworowego, a związanych z narastającą niestabilnością genomu komórek raka. Ten proces charakteryzuje się wzrastającą liczbą mutacji w każdej kolejnej komórce potomnej. Mutacje te wywołują heterogenność populacji komórek guza, prowadząc do jego poliklonalności. Powoduje to w konsekwencji zróżnicowanie we wrażliwości obecnych w guzie linii komórkowych, zarówno na pojawiające się w nich onkoproteiny i peptydowe czynniki wzrostu szczególnie autokrynną, jak i na środki terapeutyczne. Warunkuje to przyspieszenie lub spowolnienie narastania zmian w raku gruczołu piersiowego, o których mowa w artykule. Jest to również źródłem zróżnicowanego obrazu klinicznego w badanych grupach pacjentek. Jednak nie zmienia to podstawowych założeń wyżej przedstawionego schematu rozumowania. Podstawowym trzonem tego rozumowania jest bowiem pogląd, dobrze już dziś udokumentowany doświadczalnie, że estrogeny i peptydowe czynniki wzrostu, jako główne mitogeny promujące proliferację komórek gruczołu piersiowego, rozwijają działalność nie przez oddzielne szlaki biochemiczne, jak przez wiele lat sądzono, lecz przez silnie sprzężony spłot tych szlaków. Tak rozumiane działanie tych 2 podstawowych typów mitogenów gruczołu piersiowego, musi przyjąć założenie, że każda ingerencja w działanie jednego z nich wywołuje głębokie zmiany w kompleksie reakcji komórki na drugi z tych mitogenów. Najnowsze badania doświadczalne właśnie to potwierdzają [27]. Najlepszym przykładem, a również i dowodem na słuszność przedstawionego w artykule rozumowania było ostateczne potwierdzenie w 1997 r. faktu estrogenozależności genu HER2 [3] oraz wyniki szczegółowego przebadania mechanizmu tego zjawiska w latach późniejszych [43, 44]. Ostatnie kilka lat badań podstawowych, dotyczących tego zagadnienia, przyniosły wyniki, które wykazują dużą zgodność z obserwacjami klinicznymi poczynionymi wiele lat wcześniej, choć początkowo błędnie interpretowanymi. Dobrze znany jest np. efekt odpowiedzi na wycofanie tamoksifenu u pacjentek z rakiem piersi, które po podawaniu tego antyestrogenu znalazły się w stadium progresji choroby. Po odstawieniu tamoksifenu u 10–30 proc. z nich osiągnięto częściową remisję [45]. Nawiązując do analogii z rakiem prostaty należy przypomnieć, że pacjenci z rakiem prostaty wykazującym przerzuty, którzy początkowo pozytywnie odpowiadali na terapię antyandrogenową i następnie weszli w okres progresji choroby, uzyskiwali kolejną remisję po usunięciu antyandrogenów [46, 47].

Powrót do nasilonej proliferacji i wznowa, pojawiające się pod koniec hormonalnej terapii ablacyjnej, po ewidentnej początkowej pozytywnej odpowiedzi na ten typ leczenia, pokazują wyraźnie, że konstytucjonalnie zaktywowane ERs (również receptory androgenowe), w sposób niezależny od jakichkolwiek ligandów znajdują inny niż klasyczny szlak intensywnego pobudzenia proliferacji. Wobec tego dla komórki nowotworowej oznacza to, że podawane anty hormony stają się mitogenami i pobudzają ich wzrost. Co więcej, odstawienie antyhormonów może dać pozytywny efekt terapeutyczny, chociaż jedynie krótkotrwały. Dzieje się tak, bowiem na tym etapie w komórkach raka zaszły już zaawansowane przemiany prowadzące do zmiany regulacji wzrostu tych komórek z endo- i parakrynej na auto/intrakryną. W obliczu braku estrogenów komórka raka piersi uruchamia potężną maszynę zmian, prowadzących m.in. do zwiększenia wrażliwości na auto/intrakryne peptydowe czynniki wzrostu. Zwiększona w raku piersi autokryna produkcja HRGs, zaczyna w trakcie estrogenuj terapii ablacyjnej oddziaływać coraz intensywniej, gdyż przybywa w komórce receptorów, przez które peptydy te wywierają wpływ na proliferację komórki. To właśnie odcięcie komórek raka piersi od estradiolu wzmacnia ekspresję genów HER2 i HER3. Wynikająca z tego zwiększająca się liczba receptorów HER2 i HER3 uczula takie komórki na produkowane przez nie w zwiększonej ilości heregulinę.

Za tym, że sygnalizacją mitogenną pobudzają heregulinami, idącą szlakiem receptorów HER odgrywa faktycznie istotną rolę w progresji raka piersi, przemawiają 2 podstawowe fakty. Po pierwsze wykazano, że stosując monoklonalne przeciwciała anti-HER2 można wyhamować *in vitro* wzrost komórek raka piersi pobudzany heregulinami [34], a ten sam efekt można również uzyskać stosując monoklonalne przeciwciała anti-HER3 [36]. Po drugie dowiedziono, że przeciwciała anti-HER2 wpływa równocześnie istotnie na obniżenie aktywności MAPKs, a tym samym zmniejsza dynamikę podziałów komórkowych [30, 48]. W publikacjach poświęconych badaniom podstawowym, dotyczącym tego zagadnienia bardzo mocno podkreśla się, że obydwa wymienione fakty są niepodważalnym dowodem udziału sprawnego powstawania dimerycznego kompleksu receptorów HER2 i HER3 w komórkach raka piersi, jako procesu warunkującego progresję tego raka do stanu bardziej zaawansowanego [30, 33, 34, 36, 49]. Na tym bardziej zaawansowanym etapie przypadki te znacznie przypominają raka piersi z amplifikacją/nadekspresją genu *HER2*, gdzie o ich wysoce złośliwym fenotypie decyduje sprawnie i w znacznych ilościach powstający heterodimer receptorów HER2/HER3. Wzrost ilości tego heterodimeru w komórkach raka jest z klinicznego punktu widzenia niepożądany i groźny, zawsze bowiem prowadzi do wzrostu ekspresji i aktywności MAPKs, co bezpośrednio przekłada się na progresję cyklu komórkowego i zdolności przerzutowania [37, 49]. Właśnie dlatego estrogenowa terapia ablacyjna pobudzająca ekspresję genów HER2 i HER3 prowadzi do szczególnie intensywnego nasilenia proliferacji guzów z amplifikacją/nadekspresją genu *HER2*, co powoduje wzrost agresywności takich raków. Właśnie taki, szkodliwy wpływ estrogenowej te-

rapii ablacyjnej z zastosowaniem tamoksifenu został wykazany klinicznie u pacjentek z rakiem piersi o cechach nadekspresji receptora HER2, czyli białka p185, w związku z nadekspresją i/lub amplifikacją genu *HER2* [40, 50, 51]. Cytowane wyniki tych obserwacji klinicznych wyprzedziły jednak badania podstawowe dotyczące roli heterodimeru receptorów HER2/HER3 i heregulin w raku piersi, i zapewne w związku z tym nie zostały w pełni docenione w momencie ich opublikowania. Rola heterodimeru receptorów HER2/HER3 i autokrynych heregulin lub innych peptydowych czynników wzrostu, produkowanych autokrynie, a będących ligandami dla receptorów z rodziny HER – wykracza daleko poza problemy raka piersi, wiąże się bowiem ze sprawą progresji również i innych nowotworów pochodzenia nabłonkowego u ludzi, czemu poświęca się ostatnio coraz więcej uwagi [36, 43]. Wiele wyników doświadczeń wskazuje na to, że endogenne HRGs lub inne peptydowe czynniki wzrostu, w połączeniu ze zwiększoną ekspresją receptorów z rodziny HER, mogą działać jako potencjalny, komórkowy czynnik, który kontroluje poziom ekspresji białka COX2 [36, 52, 53]. Białko to ma silny onkogenny charakter, m.in. w związku z tym, że blokuje apoptozę [54, 55] i promuje angiogenezę [56]. Zebrano już wiele danych na to, że nadekspresja COX2 jest niezbędna w ogóle dla przemiany nowotworowej komórek nabłonkowych, o czym świadczą m.in. fakt powszechnego występowania wysokiej ekspresji COX2 w komórkach transformowanych i różnych typach nowotworów pochodzenia nabłonkowego u ludzi [57–62]. Najnowsze prace wykazują zależność konstytucjonalnej aktywacji genu COX2 od występowania w komórce nowotworowej aktywacji receptorów z rodziny HER i ekspresji endogennych heregulin (lub innych peptydowych czynników wzrostu ligandujących receptory HER) [36, 52, 53, 63]. Fakt ten umacnia pogląd, że współdziałanie i wzajemne regulowanie się tych 3 typów onkoprotein (heterodimeru receptorów HER2/HER3, autokrynie produkowanych czynników wzrostu i białka COX2) odgrywa podstawową rolę w zaburzeniach wzrostu nowotworowych komórek pochodzenia nabłonkowego i progresji raka u ludzi. Dodatkowym umocnieniem dla poglądu mówiącego o wzajemnym regulowaniu tych 3 podstawowych dla progresji raka białek było wykazanie, że specyficzne inhibitory białka enzymatycznego COX2 niwelują biologiczne pobudzenie receptorów HER, związane z heregulinami [36].

W świetle tych faktów interesująco prezentuje się analiza działania ludzkiego monoklonalnego przeciwciała anti-HER2 (Herceptyny). Przeciwciała to, jak wiadomo, doprowadza do dysocjacji heterodimeru receptorów HER2/HER3 i uniemożliwia komórkom raka tworzenie nowych kompleksów tego rodzaju [48]. Receptor HER2 jest bowiem unieczynniany przez Herceptynę, tracąc zdolność do asocjacji i oddziaływania z innymi receptorami HER oraz ulegając zwiększonej degradacji endocytarnej [48]. Prowadzi to do szybkiego, drastycznego zmniejszenia liczby heterodimerów HER2/HER3 w komórce, przez co niweluje również skutki zwiększonej ekspresji receptora HER3 oraz skutki działania autokrynie produkowanych heregulin (lub innych czynników wzrostu), gdyż zaktywowane nimi recep-

tery HER3 (lub inne receptory HER) i tak nie mogą utworzyć heterodimeru HER2/HER3 (lub innych onkogennych heterodimerów z udziałem receptora HER2) [27, 64]. Jak wykazała Vacllamudi i wsp. (1999), zmniejszenie w komórkach ilości heterodimeru HER2/HER3 prowadzi równoległe do autoregulacyjnego zmniejszenia ekspresji białka COX2, dzięki czemu wzrasta apoptoza takich komórek raka.

Z innych prac wiadomo [65, 66], że stosowanie przeciwciała anti-p185 (anti-HER2) stwarza warunki do wybiórczego podawania leku chemicznego na tarć molekularną w ramach strategii receptor – *enhanced chemosensitivity* (REC) i uzyskanie maksymalnego niszczenia komórek raka, w których dochodzi do tworzenia onkogennych heterodimerów z udziałem receptora HER2 [49]. Wielka zaleta wybiórczego podawania leku chemicznego wyłącznie do komórek raka o zwiększonej ekspresji białka p185, czyli receptora HER2 w ramach strategii REC, łączy się z zaletą synergistycznego oddziaływania stosowanego przeciwciała ze stosowanym lekiem chemicznym, co znacznie podnosi skuteczność tej wybiórczej strategii terapeutycznej i pozwala uzyskać dobre wyniki leczenia przy obniżonych dawkach obydwo tych preparatów leczniczych w stosunku do sytuacji, kiedy każdy z nich stosowany jest jako lek pojedynczy.

Wprowadzie strategia REC została pierwotnie pomyślana jako obiecujący sposób leczenia raka piersi z nadekspresją i/lub amplifikacją genu HER2 i jako taka przeszła już pozytywne próby kliniczne [67, 68], jednak najnowsze dane eksperymentalne pozwalają ich autorom sugerować skuteczność działania przeciwciała anti-HER2 również w przypadkach umiarkowanej nadekspresji lub wręcz braku nadekspresji genu *HER2* w hormonozależnych rakach piersi [37, 69]. Wiele również wskazuje na to, że łączenie przeciwciała anti-HER2 ze specyficznymi inhibitorami MAPKs [37, 69] lub ze specyficznymi inhibitorami COX2 [36, 70], może być obiecującym podejściem terapeutycznym. Należy oczekiwać, że strategia REC przyniesie w nowoczesnych modyfikacjach swoisty przełom w leczeniu wszystkich nowotworów pochodzenia nabłonkowego, połączonych z nasiloną sygnalizacją mitogenną, wychodzącą z receptorów HER, szlakiem ras-raf-MAPKs.

PIŚMIENNICTWO

1. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase*. Science 1995; 270: 1491-4.
2. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, et al. *Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation*. EMBO J 1996; 15: 2174-83.
3. Bates NP, Hurst HC. *An intron 1 enhancer element mediates oestrogen-induced suppression of ERBB2 expression*. Oncogene 1997; 15: 473-81.
4. Masselman S, Polman J, Dijkema R. *ER- β : identification and characterisation of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett 1996; 392: 42-53.
5. Paeck K, Webb P, Kuiper GGJM, et al. *Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites*. Science 1997; 277: 1508-10.
6. Speirs V, Malone C, Walton DS, et al. *Increased expression of estrogen receptor β mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients*. Cancer Res 1999; 59: 5421-4.
7. Parczyk K, Schneider MR. *The future of antihormone the-*

- rapy: innovations based on an established principle. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 383-96.
8. Howell A, DeFriend D, Robertson J, et al. Response to a specific antiestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* 1995; 345: 29-30.
 9. Osborne CK, Ester B, Coronado-Heinsohn, et al. Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 746-50.
 10. Daly RJ, Darbre PD. Cellular and molecular events in loss of estrogen sensitivity in ZR-75-1 and T-47-D human breast cancer cells. *Cancer Res* 1990; 50: 5868-75.
 11. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res* 1997; 57: 3071-8.
 12. Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, et al. Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology* 1998; 139: 4164-74.
 13. Coutts AS, Murphy LC. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4071-4.
 14. Br nner N, Boulay V, Fojo A, et al. Acquisition of hormone-independent growth in MCF-7 cells is accompanied by increased expression of estrogen-regulated genes but without detectable DNA amplifications. *Cancer Res* 1993; 53: 283-90.
 15. Kokontis J, Takakura K, Hay N, et al. Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation. *Cancer Res* 1994; 54: 1566-73.
 16. Joel PB, Traish AM, Lannigan DA. Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/44 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 13317-23.
 17. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.
 18. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994; 54: 5474-8.
 19. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, et al. Activation of the androgen receptor by polypeptide growth factors and cellular regulators. *World J Urol* 1995; 13: 285-9.
 20. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, et al. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* 1996; 28: 392-405.
 21. Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, et al. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 99: 1478-83.
 22. Gioeli D, Mandell JW, Petroni GR, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 1999; 59: 279-84.
 23. Dati C, Antoniotti S, Taverna D, et al. Inhibition of c-erb B-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. *Oncogene* 1990; 5: 1001-6.
 24. Read LD, Keith D, Slamon DJ, et al. Hormonal modulation of HER-2/neu protooncogene messenger ribonucleic acid and p 185 protein expression in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50: 3947-51.
 25. Antoniotti S, Maggiora P, Dati C, et al. Tamoxifen upregulates c-erb B-2 expression in estrogen-responsive breast cancer cells in vitro. *Eur J Cancer* 1992; 28: 318-21.
 26. Russel KS, Hung MC. Transcriptional repression of the neu protooncogene by estrogen stimulated estrogen receptor. *Cancer Res* 1992; 52: 6624-9.
 27. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying Erb B2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000; 19: 6102-14.
 28. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al. Erb B-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996; 15: 254-64.
 29. Alroy I, Yarden Y. The Erb B signaling network in embryogenesis: signal diversification through combination ligand-receptor interaction. *FEBS Lett* 1997; 410: 83-6.
 30. Amundadottir LT, Leder P. Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes. *Oncogene* 1998; 16: 737-46.
 31. Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Glathe S, et al. A new differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations. *J Biol Chem* 1996; 271: 19029-32.
 32. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al. Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 1996; 15: 2452-67.
 33. Mincione G, Bianco C, Kannan S, et al. Enhanced expression of heregulin in c-erb B2 and c-Ha-ras transformed mouse and human mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* 1996; 60: 437-46.
 34. Schaefer G, Fitzpatrick DV, Sliwkowski MX. γ Heregulin: a novel heregulin isoform that is an autocrine growth factor for human breast cancer cell line MDA-MB 175. *Oncogene* 1997; 5: 1385-94.
 35. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10: 2435-46.
 36. Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER-2 receptor. *Oncogene* 1999; 18: 305-31.
 37. Kurokawa H, Lenferink AEG, Simpson JF, et al. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5887-94.
 38. Battaglia F, Polizzi G, Scambia G, et al. Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in human breast cancer. *Oncology* 1988; 45: 424-7.
 39. Roux-Dosseto M, Romain S, Dussault N, et al. Correlation of erbB-2 gene amplification with low levels of estrogen and/or progesterone receptors in primary breast cancer: do erbB-2 products delineate hormone-independent tumors? *Biomed Pharmacother* 1989; 43: 641-9.
 40. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, et al. ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Letters* 1994; 81: 137-44.
 41. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, et al. Overexpression of c-erb B2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1220-6.
 42. Chen T, Cho RW, Stark PJS, et al. Elevation of cyclin adenosine 3'5'-monophosphate potentiates activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59: 213-18.
 43. Craft N, Shostak Y, Carey M, et al. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 1999; 5: 280-5.
 44. Newman SP, Bates NP, Vernimmen, et al. Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene* 2000; 19: 490-7.
 45. Perissi V, Menini N, Cottone E, et al. AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogen. *Oncogene* 2000; 19: 280-8.
 46. DeFriend DJ, Howell A. Tamoxifen withdrawal responses-chance observations or clinical clues to antiestrogen resistance? *Breast* 1994; 3: 199-201.
 47. Scher HJ, Kelly WK. The flutamide withdrawal syndrome: its impact on clinical trials in hormone-refractory prostatic cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1566-72.
 48. Nieh PT. Withdrawal phenomenon with the antiandrogen casodex. *J Urol* 1995; 153: 1070-3.
 49. Klapper LN, Vaisman N, Hurwitz E, et al. A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to Erb B-2/HER 2 blocks crosstalk with growth factor receptors. *Oncogene* 1997; 14: 2099-109.
 50. Yu D, Hung MC. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 2000; 19: 6115-21.
 51. Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer* 1994; 73: 2359-65.
 52. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, et al. C-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2702-8.
 53. Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, et al. EGF receptor activation induces nuclear targeting of COX-2, basalolateral release of prostaglandins and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 657-62.
 54. Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, et al. Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2890-5.
 55. Sheng H, Shao J, Morrow JD, et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362-6.
 56. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell* 1995; 83: 493-501.
 57. Tsujii M, Kowano S, Tsujii S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-16.
 58. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 987-90.
 59. Chan G, Boyle JO, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59: 991-4.
 60. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 3761-4.
 61. Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, et al. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4424-9.
 62. Sheng H, Shao J, Krikland SC, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99: 2254-9.
 63. Tsujii M, Kowano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3336-40.
 64. DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, et al. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1994; 266: G822-G827.
 65. Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, et al. HER 2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene* 2000; 19: 6093-101.
 66. Pegram M, Hsu S, Lewis G, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancer. *Oncogene* 1999; 18: 2241-51.
 67. Baselga J, Norton L, Albanell J, et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998; 58: 2825-31.
 68. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p 185 HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2659-71.
 69. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2639-48.
 70. Kunitake H, Kurebayashi J, Otsuki T, et al. Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER 2. *Br J Cancer* 2000; 82: 46-51.
 71. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, et al. Chemopreventive activity of Celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409-12.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr hab. n. med. **Wojciech Kozłowski**
Zakład Patomorfologii
CSK WAM
ul. Szaserów 128
00-909 Warszawa
tel./fax (022) 810 38 92