

Poszukiwanie nowych metod terapii nowotworów na modelach mysich, ze szczególnym uwzględnieniem łączenia immuno- i chemioterapii z terapią antyangiogenną i fotodynamiczną

Prof. dr hab. n. med. Marek Jakóbisiak, Zakład Immunologii Akademii Medycznej, Warszawa

W okresie otrzymywania subsydium zespół nasz opublikował około 50 prac. Gdyby poniższy tekst miał zawierać komentarz do każdej z tych prac byłby mało czytelny. Odnosiłby się zarówno do prac bardzo wartościowych jak i tych, które nie wniosły wiele do nauk medycznych. Dlatego w niniejszym sprawozdaniu skoncentrowałem się tylko na wybranych wątkach badawczych. Niektóre z nich zainicjowane zostały w naszym zespole jeszcze przed otrzymaniem subsydium i kontynuowane są po jego zakończeniu. W poniższym sprawozdaniu odnoszę się również do badań, które tylko częściowo pokrywają się z okresem otrzymywania subsydium.

Statyny są kompetywnymi inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3-metylglutarylkoenzymu A. Hamują one syntezę kwasu mewalonowego, który jest prekursorem związków izoprenoidowych, takich jak cholesterol, dolichol i ubichinon. Biologiczne znaczenie tych związków jest olbrzymie. Cholesterol jest istotnym składnikiem błon komórkowych, ubichinon uczestniczy w transporcie elektronów w mitochondriach, a dolichol bierze udział jako cząsteczka nośnikowa w syntezie glikoprotein. Jednak znaczenie kwasu mewalonowego jest nawet większe, niż wynikałoby to z udziału jego pochodnych w wyżej wymienionych procesach. Powstałe bowiem z przemian kwasu mewalonowego grupy prenylowe łączą się z około 1% wszystkich białek komórkowych. Są one niezbędne dla ich prawidłowej lokalizacji w komórce, a także dla ich funkcji. Białka te są farnesylowane i/lub geranylowane. Przedstawicielami tej grupy białek są między innymi: białka Ras i Rho.

Z powodu zdolności do obniżania poziomu cholesterolu we krwi statyny znalazły powszechne zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu zmian miażdżycowych i należą do najczęściej stosowanych leków w krajach rozwiniętych. Regularnie przyjmuje je około 20 milionów ludzi, choć oblicza się, że powinny być stosowane u około 200 milionów ludzi. Oprócz zdolności do obniżania poziomu cholesterolu, statyny wpływają na wiele istotnych funkcji komórkowych takich jak proliferacja,

różnicowanie i przeżycie. Uczestniczą także w regulacji kształtu i ruchu komórek.

Ponieważ statyny interferują z wieloma ważnymi procesami komórkowymi, efekty ich działania są bardzo różnorodne i obejmują również aktywność przeciwnowotworową. Hamują one proliferację komórek nowotworowych, indukują ich śmierć w wyniku apoptozy, a także hamują ich ruchliwość, zdolność do naciekania tkanek prawidłowych i tworzenia przerzutów. Zaobserwowano również, że statyny hamują powstawanie naczyń w obrębie nowotworu. Przeciwnowotworowe działanie statyn zaobserwowano przy użyciu modeli zwierzęcych, między innymi w przypadku czerniaka, raka piersi, raka trzustki, raka okrężnicy, mięsaka, chłoniaka, glejaka i neuroblastoma. Obserwacje te próbuje się już wykorzystać w badaniach klinicznych. Pojawiają się również doniesienia, że statyny stosowane w celu zapobiegania i leczenia zmian miażdżycowych zmniejszają ryzyko powstania nowotworów u przyjmujących je pacjentów.

Statyny stosowane są najczęściej u ludzi starszych, u których właśnie z powodu podeszłego wieku częściej występują nowotwory. Dlatego też ich aktywność przeciwnowotworowa wydaje się szczególnie interesująca. Choć statyny wykazują relatywnie słabe działanie przeciwnowotworowe, to pomyśleliśmy, że należałoby poszukać takich kombinacji statyn z lekami przeciwnowotworowymi, w których statyny mogłyby zwiększyć efektywność przeciwnowotworową leków. Spełniałyby wtedy podwójnie pożyteczną rolę – wzmacniałyby skutecznie działanie terapii nowotworowej, jednocześnie działając przeciwmiażdżycowo. W kilku kombinacjach leków, badając nowotwory mysie, wykazaliśmy skuteczność takiego podejścia terapeutycznego. Najciekawszy wynik otrzymaliśmy jednak stosując kombinację lowastatyny i doksorubicyny, która jest jednym z częściej stosowanych leków przeciwnowotworowych. Ograniczeniem jednak w stosowaniu doksorubicyny jest jej wysoka toksyczność, szczególnie kardiotoxycznosc, czyli toksyczne oddziaływanie na mięsień sercowy. Z wcześniejszych badań wiedzieliśmy, że leki obniżające poziom lipidów mogą zmniejszać kardiotoxycznosc doksorubicyny. Dlatego postanowiliśmy sprawdzić, czy nie uda się uzyskać dwa rzadko osiągalne przy łączeniu leków cele, to znaczy uzyskać zwiększenie efektywności przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności. Łącząc lowastatynę z doksorubicyną w badaniu trzech różnych nowotworów mysich uzyskaliśmy rzeczywiście wzmocnienie działania przeciwnowotworowego doksorubicyny i zmniejszenie jej kardiotoxycznosci (1).

Immunoterapia jest jedną z form terapii nowotworów, która zyskuje coraz większe znaczenie w onkologii. W przyjętych powszechnie standardach terapeutycznych z tej dziedziny mieści się między innymi immunoterapia bierna, swoista z użyciem przeciwciał monoklonalnych i terapia wykorzystująca cytokiny (np. interleukinę 2 i interferon alfa), które nieswoiście aktywują niektóre mechanizmy obrony przeciwnowotworowej.

Stosunkowo dynamicznie rozwijającą się ostatnio formą immunoterapii nowotworów, na razie na etapie prób klinicznych, jest terapia tzw. szczepionkami przeciwnowotworowymi. Olbrzymie zainteresowanie nimi wynika z fascynacji skutecznością szczepionek w zapobieganiu chorobom zakaźnym – wyeliminowaniu z naszej planety ospy prawdziwej i zbliżającemu się wyeliminowaniu choroby Heinego i Medina. Przez analogię do szczepionek stosowanych w profilaktyce chorób zakaźnych, ma ona na celu indukowanie swoistych mechanizmów zwalczania nowotworu. Różnicą – w porównaniu do chorób zakaźnych - jest jej użycie u osób już chorych. Do indukcji swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej (immunizacji) wykorzystywane mogą być odpowiednio przygotowane komórki nowotworowe, ich fragmenty lub antygeny nowotworowe. Ponieważ komórki nowotworowe pacjenta nie pobudzają efektywnie odpowiedzi immunologicznej przeciw sobie (gdyby pobudzały nie byłoby nowotworu), dlatego po pobraniu ich od pacjenta i przed posłużeniem się nimi jako szczepionką przygotowuje się je, by skutecznie aktywowały limfocyty pacjenta i inicjowały odpowiedź przeciwnowotworową. W tym celu stosuje się różne strategie. Na przykład, wprowadza się do komórek nowotworowych geny dla cytokin mających właściwości pobudzania odpowiedzi przeciwnowotworowej, podaje się je razem z tymi cytokinami lub z tak zwanymi adiuwantami. Te ostatnie mają właściwości zwiększania odpowiedzi immunologicznej przeciw podawanym łącznie z nimi antygenom.

W jednym z badań prowadzonych w naszym zespole uzyskaliśmy bardzo wyraźny efekt terapeutyczny, używając czerniaka mysiego jako modelu w naszych badaniach. Immunizowaliśmy myszy z czerniakiem, komórkami nowotworowymi z wprowadzonym genem dla czynnika martwicy nowotworu (TNF), podawanymi łącznie z interleukiną 12, która podobnie do TNF, również wykazuje silne działanie przeciwnowotworowe. W grupie myszy otrzymujących szczepionkę i interleukinę 12 połowa myszy została całkowicie wyleczona z tego bardzo złośliwego nowotworu (3).

Wcześniejsze, nasze obserwacje wskazujące na synergizm w działaniu

przeciwnowotworowym TNF i interleukiny 12 skłoniły nas do łącznego zastosowania interleukiny 12 wraz ze szczepionką z komórek nowotworowych wydzielających TNF.

Inne badania dotyczyły szczepionki opartej na komórkach czerniaka z wprowadzonym genem dla interleukiny 12 (IL-12). Zastosowanie tej szczepionki u myszy, które miały nowotwory we wczesnym etapie rozwoju nie powodowało jednak istotnego wpływu na rozwój guzów. Dlatego podjęto decyzję o podawaniu tej szczepionki łącznie z adiuwantem ODN 1826. Substancja ta należy do nowej generacji adiuwantów – imituje kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) mikroorganizmów, który dzięki pewnym różnicom w porównaniu z DNA organizmów wyższych jest rozpoznawany jako obcy i silnie aktywuje układ opornościowy.

Dołączenie ODN 1826 do szczepionki przeciwnowotworowej wydzielającej IL-12 spowodowało znaczne spowolnienie rozwoju guzów. Zastosowanie dwóch czynników łącznie dało efekt synergistyczny – nie tylko spowolnienie rozwoju guzów, ale także pełne wyleczenie u połowy zwierząt (8).

Terapia fotodynamiczna (PDT) jest jedną z najnowocześniejszych metod leczenia nowotworów. Składa się ona z dwóch etapów. Najpierw choremu podawany jest lek fotouczulający, który w miarę selektywnie gromadzi się w komórkach nowotworowych, a następnie nowotwór naświetlany jest światłem o ściśle określonej, aktywującej fotouczulacz, długości fali. Najbardziej przydatne dla celów PDT jest światło laserowe, które można doprowadzić przy użyciu cienkich światłowodów nawet do położonych w głębi ciała nowotworów, takich jak raki oskrzela, przełyku, pęcherza moczowego lub nawet mózgu. Światło laserowe, aktywując fotouczulacz doprowadza, w wyniku złożonych reakcji fotochemicznych, do wytworzenia w naświetlonych komórkach wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Te pochodne tlenowe są bezpośrednio toksyczne dla komórek nowotworowych i od nich, w głównej mierze, zależy ostateczny efekt przeciwnowotworowy.

Terapia fotodynamiczna znajduje zastosowanie głównie w leczeniu stanów przedrakowych i wczesnych zmian nowotworowych. Jej atutami są: stosunkowo wysoka skuteczność, dobre efekty kosmetyczne (po terapii nie pozostają blizny), oraz mała inwazyjność w stosunku do głębiej położonych struktur. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem PDT u tych pacjentów, u których wyczerpano już inne znane metody terapeutyczne. Należy podkreślić, że w zaawansowanych nowotworach terapia fotodynamiczna jest stosowana głównie jako metoda paliatywna, ale w odróżnieniu od innych tego typu zastosowań jest najmniej

okaleczającą i umożliwia zachowanie prawidłowej funkcji narządów. Obecnie wprowadzana jest również do leczenia raka płuc we wczesnych etapach jego rozwoju.

Terapia fotodynamiczna ma jednak szereg ograniczeń. Z jednej strony nie można choremu podać zbyt dużej dawki leków fotouczulających, a z drugiej - absorbowane i rozpraszane, w trakcie przenikania przez nowotwór, światło laserowe traci swoją moc i nie w pełni aktywuje fotouczulacz w głębszych warstwach nowotworu. Ograniczenia te są przyczyną poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych, dzięki którym możliwe byłoby potęgowanie przeciwnowotworowego działania PDT.

Ponieważ, jak już wspomniano, terapia fotodynamiczna prowadzi do niszczenia guza w oparciu o reaktywne pochodne tlenu, postanowiliśmy zatem wykorzystać to zjawisko w celu usprawnienia skuteczności tej terapii.

W naszym projekcie wykazaliśmy, że zablokowanie w komórkach nowotworowych jednego z najważniejszych enzymów „wymiatających” reaktywne formy tlenu – dysmutazy ponadtlenkowej, prowadzi do spotęgowania skuteczności terapii fotodynamicznej. Efekt ten był bardzo silny w warunkach hodowli komórek nowotworowych oraz u zwierząt doświadczalnych, u których terapia łącząca naświetlanie i podawanie inhibitora doprowadziła do całkowitego wyleczenia kilkudziesięciu procent myszy oraz wyraźnego wydłużenia życia pozostałym (5).

Ponad połowa chorych cierpiących z powodu nowotworów ma niedokrwistość. Ponieważ u chorych tych można spodziewać się upośledzonej dostawy tlenu do tkanek (w tym do guza nowotworowego), postanowiliśmy sprawdzić czy niedokrwistość indukowana u zwierząt laboratoryjnych może obniżyć skuteczność terapii fotodynamicznej, która przecież wykorzystuje w zabijaniu komórek nowotworowych pochodne tlenu. Okazało się, że niedokrwistość indukowana u myszy przez podawanie chemioterapeutyku zdecydowanie osłabia skuteczność terapii fotodynamicznej. Co więcej, wykazaliśmy jak w prosty sposób można usprawnić tę terapię. Podawanie rekombinowanej erytropoetyny – substancji wzmagającej wytwarzanie krwinek czerwonych w szpiku – przed naświetleniem guza całkowicie przywraca skuteczność terapii fotodynamicznej (4).

Poszukując mechanizmów obrony komórek nowotworowych przed działaniem PDT wykonaliśmy analizę ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy DNA. Zaobserwowaliśmy, że pod wpływem tej terapii dochodzi do indukcji ekspresji wielu

genów, w tym genu kodującego enzym - cyklooksygenazę 2 (COX-2). Rzeczywiście, zablokowanie tego enzymu lekami ogólnie dostępnymi w aptekach, będącymi pochodnymi aspiryny zwiększało przeciwnowotworowe działanie terapii fotodynamicznej u myszy (6). Innym enzymem, którego ekspresja zwiększa się pod wpływem terapii fotodynamicznej jest oksygenaza hemowa (HO-1), która rozkłada związki hemowe. Efektem tego rozkładu jest wytworzenie w komórkach bilirubiny – substancji, która niezwykle sprawnie usuwa z organizmu reaktywne formy tlenu. W przebiegu dalszych badań wykazaliśmy, że HO-1 pojawia się w naświetlonych komórkach nowotworowych, aby bronić je przed konsekwencjami stresu oksydacyjnego, wynikającego z działania reaktywnych form tlenu. Blokując ten enzym lub wyłączając jego ekspresję w komórkach nowotworowych uzyskaliśmy znacznie silniejszy efekt przeciwnowotworowy terapii fotodynamicznej (praca w przygotowaniu).

Efekt przeciwnowotworowy terapii fotodynamicznej jest zjawiskiem złożonym, na który składa się zarówno bezpośrednio niszczenie komórek nowotworowych przez wspomniane już reaktywne formy tlenu, jak również efekt pośredni wynikający ze zniszczenia naczyń krwionośnych odżywiających guz oraz aktywacji odpowiedzi zapalnej. Każdy z tych mechanizmów może wywierać wpływ na pozostałe, tworząc dość skomplikowaną sieć wzajemnych zależności. Ich suma zwiększa szansę na utrzymanie długotrwałego działania przeciwnowotworowego, indukowanego przez PDT. Naświetlenie guza prowadzi do zniszczenia części komórek nowotworowych, które rozpadają się i podobnie jak mechaniczne uszkodzenie tkanek, indukują nieswoisty proces zapalny. Podczas przebiegu procesu zapalnego uwalniane są liczne mediatory, przyciągające do siebie komórki układu odpornościowego. Zaobserwowano, że usunięcie granulocytów z organizmu zwierząt laboratoryjnych znacznie ogranicza skuteczność terapii fotodynamicznej. Wskazywałoby to na ważną rolę komórek układu odpornościowego w destrukcji guza. My postanowiliśmy sprawdzić, czy poprzez pobudzenie szpiku do wytwarzania większej liczby granulocytów uda się spotęgować działanie przeciwnowotworowe tej terapii. Podając specjalny czynnik stymulujący wzrost granulocytów w szpiku wykazaliśmy, że tuż po naświetleniu, liczba tych komórek w guzie wyraźnie zwiększa się i efekt ten koreluje ze wzmożonym efektem przeciwnowotworowym (2).

Rozwój nieswoistej odpowiedzi immunologicznej jest niezbędny do aktywacji opieszale rozwijających się, ale niezwykle skutecznych swoistych mechanizmów

obronnych. Łącznikiem pomiędzy tymi dwoma mechanizmami wydają się być komórki prezentujące antygen – głównie komórki dendrytyczne. Komórki te pochłaniają, a następnie prezentują limfocytom T antygeny znajdujące się w ich otoczeniu. Wśród antygenów znajdują się również antygeny z rozpadłych komórek nowotworowych. Jeśli w trakcie pochłaniania antygenów komórki dendrytyczne wykryją obecność specjalnych białek szoku cieplnego (białka te wytwarzane są pod wpływem różnego rodzaju stresów i mają za zadanie naprawianie uszkodzeń, np. pod wpływem stresu oksydacyjnego), wówczas ulegają one niezwykle silnemu pobudzeniu. Również w wyniku terapii fotodynamicznej dochodzi do wytwarzania w naświetlonych komórkach nowotworowych dużych ilości białek szoku cieplnego. Postanowiliśmy zatem sprawdzić, czy ten naturalny mechanizm obronny komórek nowotworowych (indukcja białek szoku cieplnego) można wykorzystać do pobudzenia silnej i skutecznej odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym, pozostałym przy życiu po terapii fotodynamicznej, albo drzemiącym w ogniskach przerzutów. Wkrótce po terapii fotodynamicznej, podawaliśmy doguzowo komórki dendrytyczne izolowane ze szpiku i hodowane w warunkach laboratoryjnych. Taka łączona terapia okazała się skuteczna w indukowaniu ogólnoustrojowej odporności, wykraczającej zasięgiem swojego działania poza naświetlany guz (7).

Referencje

1. Feleszko W., Młynarczyk I., Bałkowiec-Iskra E. Z., Czajka A., Świtaj T., Stokłosa T., Giermasz A., **Jakóbiński M.**: Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. **Clin. Cancer Res.**, 6: 2044-2052, 2000.
2. Gołąb J., Wilczyński G., Zagożdżon R., Stokłosa T., Dąbrowska A., Rybczyńska J., Wąsik M., Machaj E., Ołdak T., Kozar K., Kamiński R., Giermasz A., Czajka A., Lasek W., Feleszko W., **Jakóbiński M.**: Potentiation of the antitumor effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF. **Br. J. Cancer**, 82: 1485-1491, 2000.
3. Lasek W., Mackiewicz A., Czajka A., Świtaj T., Gołąb J., Wiznerowicz M., Korczak-Kowalska G., Bałkowiec-Iskra E.Z., **Jakóbiński M.**: Antitumor effects of the combined treatment with TNF- gene-modified tumor cells and interleukin 12 in a B78 melanoma model in mice. **Cancer Gene Ther.**, 7, 1581-1590, 2000.
4. Gołąb J., Olszewska D., Mróz P., Kozar K., Kamiński R., Jalili A., **Jakóbiński M.**: Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. **Clin. Cancer Res.**, 8: 1265-1270, 2002..
5. Gołąb J., Nowis D., Skrzycki M., Czeczot H., Baranczyk-Kuźma A., Wilczyński G.M., Makowski M., Mróz P., Kozar K., Kamiński R., Jalili A., Kopeć M., Grzela T., **Jakóbiński M.**: Antitumor Effects of Photodynamic Therapy Are Potentiated by 2-Methoxyestradiol. **J Biol. Chem.**, 278: 407-414, 2003.

6. Makowski M., Grzela T., Niderla J., Łazarczyk M., Mróz P., Kopeć M., Legat M., Strusińska K., Koziak K., Nowis D., Mrówka P., Wązik M., **Jakóbiśiak M.**, Gołąb J.: Inhibition of cyclooxygenase-2 indirectly potentiates antitumor effects of photodynamic therapy In mice. **Clin. Cancer Res.**, 9: 5417-5422, 2003.

7. Jalili A., Makowski M., Świtaj T., Nowis D., Wilczyński GM., Wilczek E., Choraży-Massalska M., Radzikowska A., Maśliński W., Biały L., Siewko J., Sierot A., Adamek M., Basak G., Mróz P., Krasnodębski IW, **Jakóbiśiak M.**, Gołąb J.: Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by combination of photodynamic therapy and dendritic cells. **Clin. Cancer Res.**, 10: 4498-44508, 2004.

8. Świtaj T., Jalili A., Jakubowska AB, Drela M., Stosik M., Nowis D., Basak G., Gołąb J., Wysoki PJ, Mickiewicz A., Sasor A., Socha K., **Jakóbiśiak M.**, Lasek W.: CpG immunostimulatory oligodeoxynucleotide 18126 enhances antitumor effect of interleukin 12 gene-modified tumor vaccine In a melanoma model In mice. **Clin Cancer Res.**, 10: 4165-4175, 2004.