

Rak piersi to nowotwór, który obok raka jajnika oraz macicy jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych u kobiet. Jedna trzecia z rozpoznanych przypadków raka piersi ma zbyt wiele kopii genu ERBB2 kodującego białko HER2, czego rezultatem jest nadekspresja receptora HER2. Anomalia ta prowadzi do szybszego wzrostu raka i agresywniejszego przebiegu choroby, a nowotwory obarczone nią wykazują większą lekooporność. Trastuzumab jest rekombinowanym humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, które selektywnie łącząc się z IV domeną zewnątrzkomórkowej części białka HER2, hamuje nadmierną proliferację komórek guza. Według licznych opracowań i badań klinicznych skuteczność chemioterapii prowadzonej z trastuzumabem jest większa w porównaniu do terapii prowadzonej wyłącznie z zastosowaniem leków z rodziny antracyklin czy taksanów. Niestety występująca oporność na trastuzumab oraz jego działanie uboczne (tj. kardi toksyczność) są często przyczyną przerwania leczenia.

Dobrze udokumentowane wyniki zastosowania dendrymerów jako nośników leków przeciwnowotworowych stanowią podstawę do użycia ich jako elementu łączącego przeciwciało monoklonalne trastuzumab i leki przeciwnowotworowe. Dendrymery poprawiają rozpuszczalność leków, a także zapewnią stopniowe ich uwalnianie oraz zapewniają ukierunkowany transport. Ponadto obecność dokoniugowanego trastuzumabu zapewnia skuteczny transport leku do komórek z nadekspresją HER2. W pracy zsyntezowano szeroką grupę koniugatów dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) z lekami z grupy antracyklin (doksorubicyna) i taksanów (docetaksel i paklitaksel) w poszukiwaniu najefektywniej działającego systemu przeciwnowotworowego, który dzięki przyłączonemu przeciwciału monoklonalnemu (trastuzumab) posiadałby zdolność selektywnego działania w terapii raka piersi z nadekspresją HER2.

Aby potwierdzić skuteczność i selektywne działanie koniugatów dokonano oceny cytotoksyczności koniugatów (testem MTT) i wyznaczono parametr IC_{50} dla dwóch linii komórek raka piersi SKBR-3 HER2-pozytywnej i MCF-7 HER2-negatywnej. Uzyskane wyniki potwierdziły selektywność koniugatów dendrymeru PAMAM z lekami i trastuzumabem względem komórek z nadekspresją receptora HER2. Zwłaszcza koniugat z docetaksem wykazywał wyjątkowo wysoką toksyczność wobec komórek SKBR-3 i niską toksyczność wobec komórek MCF-7. Stwierdzono, iż wyniki cytotoksyczności uzyskane testem MTT są rezultatem szybszego wnikania leków związanych z nośnikiem. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej umożliwiło potwierdzenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji badanych związków. Aby wyłonić układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2 dokonano porównania mechanizmów działania najbardziej selektywnych koniugatów dendrymeru PAMAM z taksanami i trastuzumabem. W tym celu oznaczono poziom reaktywnych form tlenu, zmiany potencjału mitochondrialnego, aktywację kaspaz, indukcję apoptozy i rozkład faz cyklu komórkowego. Przeprowadzone badania pokazały złożoność mechanizmu cytotoksycznego działania koniugatów PAMAM-lek-trastuzumab. Wyróżnić można trzy główne sposoby ich działania: pierwszy mechanizm to stres oksydacyjny, który prowadzi do powstawania wolnych rodników, drugi to mitochondrialna aktywacja kaskady kaspaz i trzeci związany z blokowaniem receptora HER2.

Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę badawczą, iż koniugaty dendrymerów PAMAM z lekami przeciwnowotworowymi działają skuteczniej niż wolne leki, a dokoniugowanie przeciwciała monoklonalnego zapewnia selektywność koniugatów względem komórek nowotworowych z nadekspresją receptora HER2.

Na podstawie badań wyłoniono układ mający największy potencjał terapeutyczny w leczeniu raka piersi z nadekspresją receptora HER2 – koniugat PAMAM-docetaksel-trastuzumab.

Monika Marcinkowska

Breast cancer, next to ovarian and uterine cancer, is one of the most common malignancies in women. One-third of diagnosed breast cancer cases have too many copies of the ERBB2 gene encoding the HER2 protein that results in overexpression of a HER2 receptor. Such anomaly leads to faster cancer growth with higher drug resistance and more aggressive disease progress. Trastuzumab is a recombinant, humanized monoclonal antibody that selectively binds to the IV domain of the HER2 protein and inhibits excessive proliferation of tumor cells. Numerous research and clinical studies show that the effectiveness of chemotherapy with trastuzumab is greater compared to the therapy with anthracyclines or taxanes. Unfortunately, emerging resistance to trastuzumab and side-effects such as cardiotoxicity are often the reason for discontinuation of the treatment.

The well-documented results of the dendrimers application as anti-cancer drugs carriers enable their use as a linking element between monoclonal antibody (trastuzumab) and anti-cancer drugs. Dendrimers improve the drugs solubility and also ensure their gradual release in the tumor environment. In addition, the presence of conjugated trastuzumab ensures effective drug transport to HER2-overexpressed cells. Therefore, PAMAM dendrimer conjugates with anthracyclines (doxorubicin) and taxanes (docetaxel and paclitaxel) were synthesized to select the most effective anti-cancer system that, thanks to the attached monoclonal antibody, would have the ability to act selectively in the treatment of the HER2 overexpressing breast cancer.

To confirm the effectiveness and selective cytotoxicity of the conjugates, their cytotoxicity was assessed (MTT test) and the IC_{50} parameter was determined for two breast cancer cell lines (SKBR-3 HER2-positive and MCF-7 HER2-negative). The obtained results confirmed the selectivity of PAMAM dendrimer conjugates with drugs and trastuzumab towards cells overexpressing the HER2 receptor. In particular, the docetaxel conjugate showed extremely high toxicity to SKBR-3 cells and low toxicity to MCF-7 cells. It was found that the observed cytotoxicity was the result of faster penetration of PAMAM-drug-trastuzumab conjugates to cells. The confocal microscopy confirmed the intracellular location of the analyzed compounds. In order to identify the system with the greatest therapeutic potential in the treatment of the HER2-overexpressing breast cancer, the mechanisms of action of the most selective PAMAM dendrimer conjugates with taxanes and trastuzumab were compared. For this purpose, the level of reactive oxygen species, changes in mitochondrial potential, activation of caspases, induction of apoptosis and cell cycle phase distribution were determined. Obtained results have shown the complexity of the cytotoxic mechanism of PAMAM-drug-trastuzumab conjugate activity. There are three main modes of action: the first mechanism is oxidative stress, which leads to the formation of free radicals, the second one is the mitochondrial activation of the caspase cascade and the third one is associated with blocking the HER2 receptor.

The obtained results confirmed the research hypothesis that PAMAM dendrimer conjugates with anticancer drugs are more effective than free drugs, and the conjugation with a monoclonal antibody ensures selectivity of conjugates towards tumor cells overexpressing the HER2 receptor.

Finally, PAMAM-doc-trastuzumab conjugate was identified as the system with the greatest therapeutic potential in the treatment of the breast cancer with HER2 overexpression.

Monika Matankowska