

Lucyna Matusiewicz

Tytuł rozprawy:

Immunoliposomowa forma simwastatyny jako potencjalny terapeutyk w leczeniu nowotworów zależnych od EGFR.

Streszczenie pracy:

Simwastatyna należy do grupy statyn, popularnych leków szeroko wykorzystywanych w leczeniu hipercholesterolemii. Statyny są kompetywnymi inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoAR), mechanizm ich działania opiera się na hamowaniu jednego z pierwszych etapów szlaku syntezy cholesterolu i izoprenoidów.

W latach dziewięćdziesiątych XX w. pojawiły się pierwsze doniesienia o potencjalnym wykorzystaniu statyn w leczeniu chorób nowotworowych. Wykazano m.in. ich antyproliferacyjny charakter, zdolność do indukcji apoptozy oraz hamowania szlaków sygnałowych w komórkach wielu typów nowotworów. Szczególnie obiecujące wyniki uzyskano dla nowotworów prostaty i nowotworów sutka. Dla obu tych typów nowotworów, wśród czynników predestynujących do rozwoju choroby, obok uwarunkowań genetycznych i środowiskowych, wskazuje się dietę wysokocholesterolową. Zmniejszenie puli cholesterolu w wyniku stosowania statyn stanowi czynnik hamujący dla intensywnie proliferujących komórek nowotworowych. Cholesterol stanowi ważny składnik błon komórkowych, a w szczególności ich mikrodomen, tzw. tratw błonowych, zaangażowanych w przekazywanie sygnałów w licznych szlakach komórkowych. Stosowanie statyn prowadzi również do zahamowania syntezy izoprenoidów, cząsteczek niezbędnych w procesie aktywacji szeregu białek, m.in. białek pośredniczących w transdukcji sygnałów w wielu szlakach komórkowych, nadaktywnych w nowotworach złośliwych, w tym gruczołu sutkowego i krokowego.

Głównym problemem, który ogranicza wykorzystanie przeciwnowotworowego potencjału statyn, jest konieczność ich podawania w wysokich stężeniach, nawet 500-krotnie przewyższających stężenia wykorzystywane w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. Tak wysokie stężenia mogą prowadzić do wielu zaburzeń, m.in. do rabdomiolizy, czyli zespołu objawów towarzyszących rozpadowi mięśni szkieletowych, do miopatii, czy uszkodzenia wątroby. Ponadto, nie jest możliwe uzyskanie tak wysokich stężeń w organizmie statyn podawanych doustnie, a stosowanie dożylnie wymaga używania hydrofobowych rozpuszczalników o wysokiej toksyczności.

Proponowanym przez nas rozwiązaniem, które stanowi cel niniejszego projektu, było opracowanie kierowanej za pomocą przeciwciał, liposomowej (immunoliposomowej) postaci simwastatyny, która dostarcza lek selektywnie, bezpośrednio do komórek docelowych, co powinno znacznie zwiększać jego lokalne stężenie i ograniczać ogólnoustrojową toksyczność w porównaniu do leku podawanego tradycyjnie. Jako obiekt badań wybrano komórki nowotworowe gruczołu sutkowego.

W pierwszym etapie pracy zaprojektowano konstrukcję liposomową, którą charakteryzuje wysoka wydajność enkapsulacji leku, niska cytotoxycywność niespecyficzna oraz wysoka, 8-miesięczna stabilność. Dokonano charakterystyki fizykochemicznej

uzyskanych liposomów – określono ich średnicę i potencjał oraz rozkład tych parametrów. Następnie przygotowano formy immunoliposomowe – otoczka liposomowa została zmodyfikowana poprzez dołączenie do jej powierzchni przeciwciał rozpoznających określone receptory, zapewniające wysoką selektywność preparatu, po czym ponownie oznaczono ich parametry fizykochemiczne, jak wspomniano powyżej. Konstrukcja jest na tyle uniwersalna, że pozwala na przyłączanie przeciwciał rozpoznających różne cele molekularne. Niniejszy projekt obejmował opracowanie dwu preparatów, z których każdy zawierał jedno z dwu przeciwciał rozpoznających receptor z rodziny naskórkowego czynnika wzrostu, EGFR lub HER2.

Równolegle prowadzono doświadczenia mające na celu wybór podtypu biologicznego raka sutka, który wykazywałby największą wrażliwość na działanie simwastatyny. Jako cel działania liposomowej formy simwastatyny zostały wybrane linie komórkowe odznaczające się zwiększonym poziomem EGFR w błonie: linia SKBR3, reprezentująca podtyp HER2+ oraz linia MDA MB 231, reprezentująca potrójnie ujemny podtyp raka sutka, charakteryzujący się brakiem receptora estrogenowego, progesteronowego oraz HER2.

Kolejnym etapem projektu była ocena wpływu liposomowej i immunoliposomowej formy leku na komórki wybranych linii nowotworów piersi. Badania tego etapu wykazały wysoką selektywność immunoliposomów (anty-HER2 lub anty-EGFR) wobec komórek odpowiednio charakteryzujących się nadprodukcją EGFR lub HER2. Określono także wartości IC_{50} badanych preparatów oraz wykazano zdolność obydwu rodzajów immunoliposomów do indukcji apoptozy w komórkach docelowych. Wykazano również zdolność immunoliposomów do hamowania aktywacji kinaz zaangażowanych w transdukcję sygnałów indukowanych stymulacją EGFR. Obserwowane zahamowanie aktywności szlaków sygnałowych angażujących EGFR nasunęło pytanie, czy modyfikacja transdukcji sygnału następuje w wyniku zaburzenia organizacji i stopnia uporządkowania błony komórkowej na skutek zmniejszenia puli cholesterolu. Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem techniki FLIM, która pozwala na obrazowanie zmian czasu życia fluorescencji sondy wrażliwej na stopień uporządkowania błony, wykazała, że w wyniku działania simwastatyny dochodzi do zmniejszenia stopnia uporządkowania błony komórki, a zatem zaburzenia jej struktury.

Finalnym etapem projektu było określenie selektywności i efektywności *in vivo* immunoliposomów. Do realizacji tego celu wybrano preparat immunoliposomów kierowanych za pomocą przeciwciała rozpoznającego EGFR. Analiza biodystrybucji immunoliposomów podanych dożylnie myszom szczepu NOD/SCID z eksperymentalnym guzem indukowanym poprzez wszczepienie komórek MDA MB 231, wykazała akumulację immunoliposomów w guzie, która utrzymywała się do 48 godzin po podaniu preparatu. Efektywność preparatu oceniono w dwóch podejściach terapeutycznych. W pierwszym z nich immunoliposomową formę simwastatyny podawano myszom z w pełni wykształconymi guzami, w drugim – myszom z guzami, które dopiero się formowały. Uzyskane wyniki w obu przypadkach wykazały zahamowanie wzrostu guza na poziomie 25%, dane nie były jednak istotne statystycznie. Postulujemy zatem, aby w dalszych badaniach rozważyć stosowanie tych postaci simwastatyny w połączeniu z niskimi dawkami cytostatyków lub do preparatu immunoliposomów wprowadzić cytostatyk. Takie rozwiązania, które wymagają osobnych badań, powinny pozwolić na uzyskanie skutecznego i w miarę bezpiecznego preparatu leku przeciwnowotworowego.

Opracowana uniwersalna, immunoliposomowa postać simwastatyny, jest pierwszą tego typu formulacją opisaną w literaturze i odpowiada na pytanie o zasadność wykorzystania statyn w leczeniu nowotworów. Mając na uwadze szeroko opisywane w literaturze synergistyczne działanie statyn z innymi lekami w formie terapii połączonych, immunoliposomowa forma statyny wychodzi naprzeciw problemowi dostarczania leku w wysokich dawkach do organizmu i daje nadzieję na opracowanie w przyszłości terapii wykorzystujących statyny, które jako substancje uwrażliwiające nowotwory, być może znajdą zastosowanie kliniczne.