

Erytropoetyna a lekooporność w raku piersi i raku jajnika

Erythropoietin and drug resistance in breast and ovarian cancers

Jolanta M. Szenajch, Agnieszka E. Synowiec

Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland

Streszczenie

Ludzka rekombinowana erytropoetyna (rhEPO) jest stosowana u pacjentek z rakiem piersi i rakiem jajnika w celu łagodzenia niedokrwistości spowodowanej zarówno rozwojem nowotworu jak i stosowaną chemioterapią. Niektóre badania kliniczne pokazują negatywny wpływ rhEPO na przeżycie i powikłania zakrzepowo-zatorowe u pacjentek z rakiem piersi, ale nie z rakiem jajnika. Druga grupa pacjentek może odnieść potencjalnie największe korzyści z przyjmowania rhEPO, ponieważ standardowo stosowana chemioterapia w raku jajnika jest oparta na nefrotoksycznych i mielosupresyjnych związkach platyny.

Jednakże badania przedkliniczne przeprowadzone przez ostatnie 10 lat wykazały, że EPO jest nie tylko głównym czynnikiem wzrostu i hormonem regulującym erytropoezę, lecz także cytokiną o plejotropowym działaniu, któremu podlegają również komórki nowotworowe. EPO może stymulować wzrost, zdolność do tworzenia przerzutów i lekooporność nie tylko w ustalonych liniach komórkowych raka piersi i raka jajnika, lecz ponadto w komórkach macierzysto-podobnych raka piersi. W obu tych nowotworach EPOR może również przejawiać konstytutywną aktywność, a w komórkach raka piersi wchodzić w interakcję molekularną z receptorem estrogenowym (ER) i receptorem nabłonkowego czynnika wzrostu-2 (HER2). EPOR, w sposób niezależny od EPO, stymuluje proliferację komórek raka piersi we współpracy z ER, przez co obniża skuteczność leczenia tamoksifenem. W innej interakcji molekularny antagonizm między EPOR i HER2 powoduje, że rhEPO chroni komórki raka piersi przed działaniem trastuzumabu.

Wyniki badań przedklinicznych i klinicznych wskazują na pilną potrzebę ponownej oceny stosowania rhEPO w leczeniu onkologicznym.

Key words: **erytropoetyna / rak piersi / rak jajnika / paklitaksel / tamoksifen /
/ trastuzumab /**

Abstract

Recombinant human erythropoietin (rhEPO) is used in breast and ovarian cancer patients to alleviate cancer- and chemotherapy-related anemia. Some clinical trials have reported that rhEPO may adversely impact survival and increase the risk of thrombovascular events in patients with breast cancer but not with ovarian cancer. The latter may potentially benefit the most from rhEPO treatment due to the nephrotoxic and myelosuppressive effects of standard platinum-based chemotherapy used in ovarian cancer disease.

However, over the last decade the preclinical data have revealed that EPO is not only the principal growth factor and the hormone which regulates erythropoiesis, but also a cytokine with a pleiotropic activity which also can affect cancer cells. EPO can stimulate survival, ability to form metastases and drug resistance not only in continuous breast- and ovarian cancer cell lines but also in breast cancer stem-like cells. EPO receptor (EPOR) can also be constitutively active in both these cancers and, in breast cancer cells, may act in an interaction with estrogen receptor (ER) and epidermal growth factor receptor-2 (HER-2).

Adres do korespondencji:

Jolanta M. Szenajch
Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska
04-141 Warszawa, ul. Szaserów 128
tel: 48 261 817 092; e-mail: jszenajch@wim.mil.pl

Otrzymano: 17.10.2014
Zaakceptowano do druku: 11.01.2015

Jolanta M. Szenajch, Agnieszka E. Synowiec. *Erytropoetyna a lekooporność w raku piersi i raku jajnika.*

EPOR, by an EPO-independent mechanism, promotes proliferation of breast cancer cells in cooperation with estrogen receptor, resulting in decreased effectiveness of tamoxifen treatment. In another interaction, as a result of the molecular antagonism between EPOR and HER2, rhEPO protects breast cancer cells against trastuzumab. Both clinical and preclinical evidence strongly suggest the urgent need to reevaluate the traditional use of rhEPO in the oncology setting.

Key words: **erythropoietin / breast cancer / ovarian cancer / paclitaxel / tamoxifen /
trastuzumab /**

Wprowadzenie – ludzka rekombinowana erytropoetyna w onkologii klinicznej

Niedokrwistość, czyli poziom hemoglobiny niższy od 12g/dl u kobiet i 13g/dl u mężczyzn według definicji WHO (*World Health Organization*), jest powszechnie występującą komplikacją u chorych na nowotwory. Dotyka ona około 67% pacjentów i jest spowodowana samym rozwojem nowotworu oraz stosowaniem radio- i chemioterapii [1,2].

Do lat 90-tych XX w. podstawowym sposobem leczenia niedokrwistości było przetaczanie koncentratu czerwonych krwinek. W 1985 r. sklonowano ludzki gen kodujący erytropoetynę (EPO) – glikoproteinowy hormon, który jest podstawowym czynnikiem regulującym powstawanie dojrzałych czerwonych krwinek [3, 4]. Wkrótce rekombinowane formy tej cząsteczki rhEPO (*recombinant human erythropoietin*) stały się powszechnie dostępne komercyjnie. W 1993 r. FDA (*Food and Drug Administration*) w USA, a w 1995 r. EMA (*European Medicines Agency*) w UE dopuściły stosowanie rhEPO w onkologii klinicznej. Przez pierwsze 10 lat stosowania rhEPO jako alternatywy dla przetaczania krwi u pacjentów nowotworowych, zarówno poddawanych, jak i niepoddawanych leczeniu systemowemu, wyniki były bardzo zachęcające: zmniejszyło się ryzyko zakażeń związanych z przetaczaniem krwi i znacznie poprawiła się jakość życia. W 2002 r. w USA około 45% chorych na raka otrzymywało rhEPO [5].

Nieoczekiwanie w 2003 r. dwa duże randomizowane kontrolowane badania ujawniły szkodliwe działania rhEPO:

BEST – badanie na pacjentkach z rozsiałym rakiem piersi (n=939) zostało przedterminowo zakończone z powodu znacznie wyższej śmiertelności w grupie leczonej chemioterapią i otrzymującej rhEPO [6, 7].

ENHANCE – u pacjentów z rakiem głowy i szyi (n=351), otrzymujących rhEpo przed zastosowaniem radioterapii, zaobserwowano skrócony czas całkowitego przeżycia OS (*overall survival*) i przeżycia bez przerzutów RFS (*recurrence free survival*) [8].

Spowodowało to tak duży niepokój w środowisku medycznym, że w latach 2007, 2008 i 2010 FDA i EMA nałożyły w onkologii klinicznej znaczne ograniczenia na stosowanie ESAs (*Erythropoiesis Stimulating Agents*), tzn. rhEPO i jej pochodnych:

rhEPO można stosować wyłącznie u pacjentów, u których niedokrwistość została spowodowana przez stosowanie chemioterapii, a nie przez samą chorobę nowotworową.

Podawanie rhEPO można rozpocząć wyłącznie u pacjentów otrzymujących chemioterapię paliatywną i tylko wtedy, gdy poziom hemoglobiny obniżył się u nich poniżej 10 g/dl oraz należy je przerwać po osiągnięciu poziomu hemoglobiny 12 g/dl.

Podawanie rhEPO musi być wykonywane przez specjalnie przeszkolony personel i ściśle nadzorowane, a pacjenci muszą być wyczerpująco informowani o ryzyku związanym z jej stosowaniem [9, 10].

W 2010 r. FDA ogłosiła „czarną listę” chorób nowotworowych, w których klinicznie udokumentowano niekorzystne działanie ESAs: rak piersi, rak głowy i szyi, rak szyjki macicy, niedrobnokomórkowy rak płuc oraz białaczki [10].

W środowisku klinicystów i naukowców medycznych dalej toczy się gorąca dyskusja nad bezpieczeństwem i potrzebą stosowania rhEPO u pacjentów nowotworowych, bowiem wyniki badań klinicznych nie są w tej kwestii rozstrzygające. Według meta-analizy z 2010 r. spośród 60 kontrolowanych badań wykonanych na 15 323 pacjentach onkologicznych tylko 8 badań (13%) pokazało zwiększoną śmiertelność lub postęp choroby na skutek działania ESAs u chorych z guzami litymi. Pozostałe 52 badania wykazały jedynie zwiększone ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych [11]. Wnioski z najnowszej meta-analizy opublikowanej przez Cochran w 2012 r., obejmującej 91 randomizowanych kontrolowanych badań wykonanych na 20 102 pacjentach w latach 1985-2011, są bardziej pesymistyczne. Zwiększenie śmiertelności przez ESAs zaobserwowano w 70 badaniach, a zmniejszenie OS w 78 badaniach. W 57 badaniach podawanie ESAs zwiększyło ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych [12].

Badania, będące przedmiotem opublikowanych do tej pory meta-analiz, rozpoczęły się przed nałożeniem ograniczeń przez FDA oraz EMA i nie były wykonywane zgodnie z obecnie obowiązującymi zaleceniami. Środowisko medyczne czeka na odpowiedź na następane ważne pytanie: „Czy stosowanie ESAs w onkologii zgodnie z obecnymi zaleceniami jest bezpieczne i korzystne dla chorych na nowotwory?”.

Erytropoetyna jako leczenie wspomagające w raku piersi i raku jajnika

Do tej pory przeprowadzono 9 prospektywnych badań klinicznych u 5920 chorych na raka piersi bez przerzutów i z chorobą uogólnioną. W obu grupach stosowano chemioterapię. W grupie otrzymującej ESAs w 4 badaniach stwierdzono skrócenie przeżycia całkowitego, a w 6 badaniach – wzrost powikłań zakrzepowo-zatorowych [13].

Stosowanie rhEPO u chorych na raka jajnika jest szczególnie dyskusyjnym zagadnieniem, ponieważ standardowe schematy leczenia raka jajnika są oparte na pochodnych platyny, które wykazują działanie mielosupresyjne i nefrotoksyczne, działając poprzez uszkodzenie kanalików nerkowych, będących głównym miejscem wytwarzania EPO w życiu pozapłodowym [14]. U 20% chorych leczenie to powoduje niedokrwistość 3 lub 4 stopnia

Jolanta M. Szenajch, Agnieszka E. Synowiec. *Erytropoetyna a lekooporność w raku piersi i raku jajnika.*

[15]. Z tego względu uważa się, że chore na raka jajnika są grupą pacjentów nowotworowych, która najbardziej może skorzystać na podawaniu ESAs [16].

W przeciwieństwie do raka piersi, rak jajnika nie został umieszczony na „czarnej liście” FDA [10]. Znacznie skromniej przedstawia się też w jego przypadku dokumentacja kliniczna. Do tej pory wykonano jedynie dwa badania u chorych w różnych stadiach choroby leczonych chemioterapią. W prospektywnym badaniu (n=182) stwierdzono nieistotne statystycznie pogorszenie wśród pacjentek otrzymujących ESAs [17]. W retrospektywnym badaniu (n=343) nie stwierdzono różnic w RFS i OS między grupą otrzymującą i nie otrzymującą ESAs [18].

Czy zatem stosowanie rhEPO jest bardziej wskazane i bezpieczne u pacjentek z rakiem jajnika niż u pacjentek z rakiem piersi?

Erytropoetyna jako czynnik zmieniający patofizjologię komórek rakowych na podstawie wyników badań przedklinicznych

FDA i EMA, nakładając surowe ograniczenia na stosowanie ESAs jako leczenia wspomagającego w różnych chorobach nowotworowych, kierowały się wynikami badań klinicznych. Wnioski z tych badań tłumaczą zwiększoną śmiertelność związaną z podawaniem ESAs głównie powikłaniami zakrzepowo-zatorowymi, a nie postępem choroby nowotworowej lub obniżeniem efektywności leczenia.

Tymczasem od 2001 r. z laboratoriów badawczych napływają dane, podważające podstawową rację stosowania EPO w onkologii jako cytokiny specyficznie działającej na linię czerwono-krwinkową:

Ekspresja EPO i jej receptora (EPOR) zachodzi w bardzo wielu nowotworach różnego pochodzenia, zarówno liniach ludzkich komórek rakowych jak i wycinkach z guzów pochodzących od pacjentów.

Układ EPO/EPOR jest aktywny w wielu komórkach nowotworowych i bierze udział w modyfikacji molekularnych szlaków sygnałowych oraz stymulacji wzrostu, przeżycia, ruchliwości i zdolności do tworzenia przerzutów. EPO może zwiększać oporność komórek rakowych *in vitro* i *in vivo* na działanie chemioterapii.

Wszystkie powyższe obserwacje dotyczą również komórek raka piersi i raka jajnika [19].

Podobnie jak w badaniach klinicznych, tak i w badaniach eksperymentalnych nie ma zgody w zasadniczych kwestiach. Badacze z laboratoriów firmy Amgen, głównego producenta i sprzedawcy ESAs na rynku amerykańskim, od wielu lat konsekwentnie bronią stosowania rhEPO w onkologii [20–22]. Na podstawie wyników badania 209 linii komórkowych, reprezentujących 16 typów nowotworów (w tym 24 linie raka piersi i 14 linii raka jajnika), w których stwierdzili bardzo niski poziom ekspresji zarówno EPO jak i EPOR oraz brak funkcjonalności układu EPO/EPOR, autorzy argumentują, że preparaty rhEPO podawane w leczeniu chorób nowotworowych stymulują głównie komórki progenitorowe czerwonych krwinek, natomiast nie wpływają w znaczącym klinicznie stopniu na komórki rakowe [21].

Ostatnie lata przyniosły jednak dobrze udokumentowane doniesienia eksperymentalne, dotyczące stymulacji przez EPO oporności na leczenie w komórkach raka piersi i raka jajnika.

Erytropoetyna jako czynnik stymulujący lekooporność w komórkach raka piersi

Wrodzona lub nabyta oporność na leki, która dotyczy prawie wszystkich schematów leczenia i prawie wszystkich rodzajów nowotworów, jest do tej pory wielkim nierozwiązanym problemem w onkologii klinicznej, bardzo często odpowiedzialnym za niepowodzenie leczenia. Jest zatem oczywiste, że nie zaleca się stosowania żadnego leku ani substancji, której efektem ubocznym jest stymulacja wzrostu lub oporności na leki komórek nowotworowych.

Już w roku 2001 r. zaobserwowano, że w normalnych komórkach gruczołu piersiowego ekspresja EPO i EPOR jest niewykrywalna, natomiast jej poziom wzrasta systematycznie wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu [23]. Ekspresja EPO i EPOR okazała się także negatywnie skorelowana z RFS i OS [24].

W 2009 r. Larsson i wsp. wykonali badanie na 382 chorych przed menopauzą, których nowotwory piersi były zróżnicowane pod względem ekspresji receptorów estrogenu (ER), progesteronu (PR) i EPOR. Chore te nie otrzymywały ESAs. Okazało się, że poziom EPOR miał u nich znaczenie zarówno prognostyczne jak i predykcyjne. U pacjentek ER- poziom ekspresji EPOR nie miał wpływu na długość RFS. U pacjentek ER+ i/lub PR+ nieleczonych tamoksifenem (inhibitorem ER w komórkach raka piersi) wysoka ekspresja EPOR miała korzystny wpływ na RFS, podczas gdy u pacjentek leczonych tamoksifenem okazała się niekorzystna.

Okazało się więc, że aktywność EPOR może być niezależna od podawania egzogennej EPO i być w jakiś sposób zaangażowana w odpowiedź na leczenie tamoksifenem. Zaczęto domyślać się istnienia molekularnej komunikacji między szlakami przekazywania sygnału przez EPOR i ER [25].

Hipotezy, które pojawiły się po wykonaniu badań klinicznych, autorzy postanowili sprawdzić na poziomie komórek nowotworowych. Zbadali w tym celu kilka ustalonych linii komórkowych raka piersi pozytywnych pod względem ekspresji EPOR, a różniących się między sobą statusem ekspresji ERα. Po zablokowaniu przy pomocy siRNA (*small interference RNA*) wytwarzania białka EPOR nastąpiło silne zahamowanie proliferacji komórek ERα+, ale nie komórek ERα-. W komórkach ERα+ bardzo obniżyła się efektywność działania estrogenu na jego receptor, natomiast efektywność hamowania aktywności tego receptora przez tamoksifen bardzo się zwiększyła. Te eksperymenty potwierdziły konstytutywną (niezależną od EPO) aktywność EPOR oraz molekularną współpracę obu receptorów: ERα i EPOR w przekazywaniu sygnałów proliferacji w komórkach raka piersi [26].

Nie zbadano jeszcze, czy podawanie egzogennej rhEPO w przedklinicznych badaniach *in vitro* i *in vivo* miałyby wpływ na opisaną konstytutywną aktywność EPOR. Bardzo ciekawym obiektem badań nad relacjami molekularnymi między EPO, EPOR, ER i tamoksifenem mogłyby być również komórki raka jajnika, w których tamoksifen wykazuje bezpośredni efekt antyproliferacyjny niezależnie od ekspresji ERα i ERβ, a ponadto może wpływać na ich wrażliwość na związki platyny [27].

W 2010 r. Liang i wsp. opublikowali wyniki, dotyczące antagonizmu działania między EPOR a HER2 (receptor nabłonkowego czynnika wzrostu-2) – drugim obok ER klinicznie bardzo ważnym receptorem występującym na komórkach raka piersi. Badając ustalone linie komórkowe raka piersi autorzy stwierdzili

Jolanta M. Szenajch, Agnieszka E. Synowiec. *Erytropoetyna a lekooporność w raku piersi i raku jajnika.*

w przeważającej większości z nich jednoczesną ekspresję EPOR i HER2. Traktowanie komórek EPOR+/HER2+ trastuzumabem (przeciwciałem przeciwko HER2) hamowało HER2 w aktywacji jego dwóch molekularnych szlaków przekazywania sygnału: PI3K(*phosphatidylinositol -3 kinase*)/AKT oraz szlaku kinaz MAPK (*mitogen activated protein kinases*). Jeżeli komórkom tym jednocześnie z trastuzumabem podano rhEPO to aktywność tych szlaków była przywracana. Badania *in vitro* wykazały również, że rhEPO antagonizuje indukowaną przez trastuzumab inhibicję wzrostu komórek, ich ruchliwości i inwazyjności. Badania *in vivo* pokazały, że wzrost guzów sutka u myszy jest hamowany przez trastuzumab, natomiast włączenie rhEPO do leczenia w znacznym stopniu chroni guzy przed jego działaniem.

Obserwacje te zostały następnie potwierdzone przez retrospektywne badanie kliniczne na 111 chorych z rozsiałym rakiem piersi HER2+, z których 74 osoby były leczone samym trastuzumabem (grupa kontrolna), a 37 osób miało również podawaną rhEPO. OS było lepsze w grupie kontrolnej, a po 1 roku leczenia RFS wynosiło 40% w grupie kontrolnej i 19% w grupie rhEPO.

Autorom udało się stworzyć eksperymentalny model skomplikowanego mechanizmu „molekularnej sprzeczki” (*molecular cross-talk*) między dwoma receptorami: HER-2 i EPOR. Już wcześniej wiadomo było, że sam trastuzumab osłabia wiązanie między HER2 a białkiem adaptorowym SRC, którego normalną funkcją jest zapobieganie inhibicji szlaku PI3K/AKT przez fosfatazę PTEN. W zaproponowanym modelu na skutek traktowania komórek rhEPO między cząsteczkami EPOR i HER2 powstaje most utworzony przez związaną z EPOR kinazę JAK2 (*Janus protein tyrosine kinase 2*) oraz związane z HER2 białko SRC. EPOR, po przyłączeniu EPO, aktywuje JAK2, które z kolei aktywuje SRC, a ono inaktywuje PTEN. To antagonistyczne w stosunku do trastuzumabu działanie rhEPO przywraca zahamowaną przez niego aktywację szlaku PI3K/AKT. „Molekularna sprzeczka” polega więc na tym, że EPO „nie dopuszcza” do tego, aby trastuzumab „włączył” aktywność białka PTEN, które jest inhibitorem szlaku sygnalizacyjnego używanego przez HER2 [28].

Z opisanych badań, pokazujących „molekularną komunikację” między szlakami sygnałowymi EPOR z jednej strony a ER lub HER-2 z drugiej strony, wypływają ważne kliniczne wskazówki:

Jeżeli u chorych na raka piersi wraz z podawaniem tamoksifenu lub trastuzumabu jest planowane podawanie ESAs, to przed rozpoczęciem leczenia powinny być badane nie tylko pod względem statusu ER i HER2, ale także EPOR [25, 28].

Można przewidywać, że u chorych z rakiem piersi ER+ zablokowanie ekspresji lub aktywności EPOR podniosłoby skuteczność leczenia tamoksifenem [26].

Badany był również wpływ rhEPO na efekty leczenia klasycznymi chemioterapeutykami: paklitakselem, doksorubicyną i 5-fluorouracylem. W 2011 r. Hedley i wsp. zbadali dwie ustalone linie komórkowe: MDA-MB-231 o średnim potencjale przerzutowym wykazującą ekspresję EPOR oraz MDA-MB-435 o dużym potencjale przerzutowym nie wykazującą ekspresji EPOR. *In vitro* rhEPO nie stymulowała wzrostu i przeżycia komórek obu linii ani też nie zmieniała w znaczący sposób ich odpowiedzi na paklitaksel. Komórki obu linii podane ortotopowo myszom wykształcały guzy pierwotne sutka i guzy przerzutowe w płucach. Podawanie myszom rhEPO nie miało wpływu na wzrost i odpowiedź na paklitaksel guzów pierwotnych, natomiast w przypadku obu linii stymulowało wzrost guzów przerzutowych

oraz obniżało skuteczność ich leczenia paklitakselem. Eksperyment ten pokazał, jak duży wpływ na wyniki może mieć środowisko, w którym bada się działanie EPO. Szczególnie ciekawe jest zaobserwowanie wpływu rhEPO na komórki MDA-MB-435 z niewykrywalną ekspresją EPOR. Autorzy, biorąc pod uwagę obserwowane wcześniej minimalne działanie rhEPO *in vitro*, wysunęli hipotezę, że być może w guzie rhEPO nie działa bezpośrednio na same komórki rakowe, ale przede wszystkim na komórki mikrośrodowiska, stwarzając przez to warunki sprzyjające przeżyciu komórek rakowych [29]. Hipoteza ta jest uprawniona, bowiem w komórkach nabłonkowych stwierdzono ekspresję i aktywność EPOR [30].

Bezpośrednie działanie rhEPO na komórki raka piersi pokazali w 2013 r. Todaro i wsp., którzy z guzów kobiet wyizolowali 5 linii komórek macierzysto- podobnych BCSC (*breast cancer stem-like cells*). *In vitro* we wszystkich pięciu liniach wykryto ekspresję i aktywność EPOR oraz zwiększenie oporności na paklitaksel, doksorubicynę i 5-fluorouracyl. Wyizolowane komórki BCSC spełniały funkcjonalną charakterystykę nowotworowych komórek macierzystych: u myszy upośledzonych immunologicznie były zdolne do tworzenia guzów, powielających histologiczną budowę i wzór ekspresji markerów z oryginalnych guzów kobiet. *In vivo* rhEPO zwiększała oporność guzów pierwotnych na doksorubicynę i 5-fluorouracyl oraz guzów przerzutowych na paklitaksel. rhEPO, podawana myszom sama lub razem z paklitakselem, powodowała wzrost masy guzów przerzutowych [31].

Erytropoetyna jako czynnik stymulujący lekooporność w komórkach raka jajnika

Podobnie jak w przypadku badań klinicznych, nad działaniem EPO na komórki raka jajnika wykonano znacznie mniej badań eksperymentalnych niż dla komórek raka piersi.

W ustalonej linii komórkowej ludzkiego raka jajnika A2780 Jeong i wsp. stwierdzili obecność i aktywność EPO i EPOR. *In vitro* rhEPO nie stymulowała wzrostu i przeżycia tych komórek, jednakże podanie im przeciwciała neutralizującego EPO ujemnie wpływało na ich wzrost i przeżywalność, a efekt ten można było odwrócić przez dodanie nadmiaru EPO. Wyniki te sugerują, że w komórkach A2780 działa auto- i parakryna pętla EPO/EPOR [32]. Egzogenna rhEpo podawana tym komórkom *in vitro* powodowała natomiast wzrost oporności na paklitaksel przy braku zmian oporności na cisplatinę i karboplatinę [33].

W ciekawej opozycji do przedstawionych wyników pozostają badania wykonane przez Paragha i wsp. również na komórkach A2780. W badaniach tych nie wykryto ekspresji EPO, wykryto natomiast wysoki poziom ekspresji EPOR, którego białko nie było jednakże obecne na powierzchni komórek. *In vitro* po podaniu rhEPO, EPOR nie włączał szlaków sygnałowych oraz nie stymulował podziałów, inwazyjności i wzrostu oporności na cisplatinę i paklitaksel. Specyficzne wyłączenie ekspresji mRNA EPOR za pomocą shRNA (*short hairpin RNA*) znacznie hamowało podziały i inwazyjność komórek A2780 *in vitro* oraz pozbawiało je zdolności do tworzenia guzów i przekazywania sygnału EPO *in vivo*, ale nie wpływało na wrażliwość na leki. Autorzy wywnioskowali, że EPOR może przejawiać konstytutywną aktywność w komórkach A2780. Zatem wzrost nowotworu może być stymulowany przez aktywność EPOR, lecz niezależny od obecności EPO, w tym również preparatów rhEPO podawanych leczniczo [34].

Jolanta M. Szenajch, Agnieszka E. Synowiec. *Erytropoetyna a lekooporność w raku piersi i raku jajnika.*

Opisane sprzeczności między uzyskanymi przez różne zespoły wynikami eksperymentów nad jedną linią komórkową są częstą sytuacją w badaniach nad komórkami. Wyniki w tej dziedzinie są bowiem bardzo silnie uzależnione od źródła otrzymania linii komórkowej i przyjętego układu eksperymentalnego, który jest specyficzny dla każdego laboratorium.

Podsumowanie

Przełomem w podejściu do stosowania rhEPO do łagodzenia skutków anemii w chorobach nowotworowych było odkrycie, że nie jest ona wyłącznie hormonem i cytokiną odpowiedzialną za erythropoezę, ale że jej działanie jest plejotropowe i podlegają mu również komórki nowotworowe. Przez ponad 10 lat badań nad wpływem EPO na wzrost, inwazyjność i oporność na leczenie komórek nowotworowych odkryto zjawiska, których mechanizmu nie można wyjaśnić jedynie przy pomocy klasycznego schematu działania receptora i jego liganda ograniczonego do jednego typu komórek. Potencjalnie bardzo duże mogą okazać się implikacje kliniczne takich zjawisk jak: konstytutywna aktywność EPOR, współdziałanie EPOR z ER i działanie antagonistyczne z HER-2 oraz pośredni wpływ EPO na komórki nowotworowe poprzez jej działanie na komórki mikrośrodowiska guza [25,26,28,29,34].

Bardzo ważne z klinicznego punktu widzenia jest także odkrycie stymulującego wpływu EPO na proliferację, inwazyjność i lekooporność macierzysto- podobnych komórek raka piersi [31]. Komórkom tym przypisywana jest zdolność do samoodnowy i różnicowania, odpowiedzialność za nawroty choroby po leczeniu oraz wrodzona lekooporność silniejsza niż w dojrzałych komórkach nowotworowych [35]. Zatem odkrycie pozytywnego wpływu EPO na komórki macierzysto-podobne jeszcze silniej przemawia przeciw stosowaniu ESAs u chorych na raka piersi niż odkrycia dokonane na ustalonych liniach komórkowych.

Przrastająca w bardzo szybkim tempie wiedza, dotycząca plejotropowego działania EPO w chorobach nowotworowych, pochodzi zarówno z badań klinicznych jak i eksperymentalnych. Chociaż często rezultaty tych badań i ich interpretacje pozostają ze sobą w konflikcie, to bez wątpienia wynika z nich potrzeba głębokiego przewartościowania stosowania ESAs w onkologicznej praktyce klinicznej.

Podziękowania

Autorki dziękują Prof. Gabrielowi Wcisło za krytyczne przeczytanie manuskryptu oraz cenne wskazówki przy przygotowywaniu tej pracy.

Oświadczenie autorów

1. Jolanta M. Szenajch – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Agnieszka Synowiec – współautor tekstu pracy, korekta.

Źródło finansowania: część projektu finansowanego z projektu badawczego własnego NCN nr N N401532740 przyznanego J.S.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Ludwig H, Van Belle S, Barrett-Lee P, [et al.]. The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): A large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *Eur J Cancer*. 2004, 40 (15), 2293–2306.
2. Mercadante S, Gebbia V, Marrazzo A, [et al.]. Anaemia in cancer: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev*. 2000, 26 (4), 303–311.
3. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, [et al.]. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985, 313 (6005), 806–810.

4. Lin FK, Suggs S, Lin CH, [et al.]. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985, 82 (22), 7580–7584.
5. Hershman DL, Buono DL, Malin J, [et al.]. Patterns of use and risks associated with erythropoiesis-stimulating agents among Medicare patients with cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009, 101 (23), 1633–1641.
6. Leyland-Jones B. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol*. 2003, 4 (8), 459–460.
7. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, [et al.]. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005, 23 (25), 5960–5972.
8. Henke M, Laszig R, Rube C, [et al.]. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003, 362 (9392), 1255–1260.
9. Epoetin alfa HEXAL, INN-epoetin alfa - WC500028285.pdf http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000726/WC500028285.pdf (access: 2014.10.11)
10. FDA. Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers > Information on Erythropoiesis-Stimulating Agents (ESA) Epoetin alfa (marketed as Procrit, Epogen), Darbepoetin alfa (marketed as Aranesp) <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm109375.htm> (access: 2014.10.11)
11. Glaspy J, Crawford J, Vansteenkiste J, [et al.]. Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes. *Br J Cancer*. 2010, 102 (2), 301–315.
12. Tonia T, Mettler A, Robert N, [et al.]. Erythropoietin or darbepoetin for patients with cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012, 12, CD003407.
13. Kelada O, Marignol L. Erythropoietin-stimulating agents and clinical outcomes in metastatic breast cancer patients with chemotherapy-induced anemia: a closed debate? *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2014, 35 (6), 5095–5100.
14. Wood PA, Hrushesky WJ. Cisplatin-associated anemia: an erythropoietin deficiency syndrome. *J Clin Invest*. 1995, 95 (4), 1650–1659.
15. Bookman MA, Brady MF, McGuire WP, [et al.]. Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009, 27 (9), 1419–1425.
16. Cornes P, Boiangiu I. The role of epoetin beta in the treatment of anaemia in patients with gynaecological malignancies. *Anticancer Res*. 2007, 27 (1B), 513–522.
17. Wilkinson PM, Antonopoulos M, Lahousen M, [et al.]. Epoetin alfa in platinum-treated ovarian cancer patients: results of a multinational, multicentre, randomised trial. *Br J Cancer*. 2006, 94 (7), 947–954.
18. Cantrell LA, Westin SN, Van Le L. The use of recombinant erythropoietin for the treatment of chemotherapy-induced anemia in patients with ovarian cancer does not affect progression-free or overall survival. *Cancer*. 2011, 117 (6), 1220–1226.
19. Szenajch J, Wcisło G, Jeong J-Y, [et al.]. The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells From clinic to bench - a critical review. *Biochim Biophys Acta*. 2010, 1806 (1), 82–95.
20. Elliott S, Busse L, Bass MB, [et al.]. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blond*. 2006, 107 (5), 1892–1895.
21. Swift S, Ellison AR, Kassner P, [et al.]. Absence of functional EpoR expression in human tumor cell lines. *Blond*. 2010, 115 (21), 4254–4263.
22. Elliott S, Swift S, Busse L, [et al.]. Epo receptors are not detectable in primary human tumor tissue samples. *PLoS One*. 2013, 8 (7), e68083.
23. Acs G, Acs P, Beckwith SM, [et al.]. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res*. 2001, 61 (9), 3561–3565.
24. Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, [et al.]. Erythropoietin and its receptor in breast cancer: correlation with steroid receptors and outcome. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2007, 16 (10), 2016–2023.
25. Larsson A-M, Jirström K, Fredlund E, [et al.]. Erythropoietin receptor expression and correlation to tamoxifen response and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009, 15 (17), 5552–5559.
26. Reinbothe S, Larsson A-M, Vaapil M, [et al.]. EPO-independent functional EPO receptor in breast cancer enhances estrogen receptor activity and promotes cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, 445 (1), 163–169.
27. Nowak-Markwitz E, Maciejczyk A, Pudełko M, [et al.]. Influence of tamoxifen on cisplatin-sensitivity and estrogen receptors expression in ovarian carcinoma cell lines. *Ginekol Pol*. 2010, 81 (3), 183–187.
28. Liang K, Esteva FJ, Albarracín C, [et al.]. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell*. 2010, 18 (5), 423–435.
29. Hedley BD, Chu JE, Ormond DG, [et al.]. Recombinant human erythropoietin in combination with chemotherapy increases breast cancer metastasis in preclinical mouse models. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011, 17 (19), 6151–6162.
30. Ribatti D, Presta M, Vacca A, [et al.]. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blond*. 1999, 93 (8), 2627–2636.
31. Todaro M, Turdo A, Bartucci M, [et al.]. Erythropoietin activates cell survival pathways in breast cancer stem-like cells to protect them from chemotherapy. *Cancer Res*. 2013, 73 (21), 6393–6400.
32. Jeong J-Y, Feldman L, Solar P, [et al.]. Characterization of erythropoietin receptor and erythropoietin expression and function in human ovarian cancer cells. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008, 122 (2), 274–280.
33. Solar P, Feldman L, Jeong J-Y, [et al.]. Erythropoietin treatment of human ovarian cancer cells results in enhanced signaling and a paclitaxel-resistant phenotype. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008, 122 (2), 281–288.
34. Paragh G, Kumar SM, Rakosy Z, [et al.]. RNA interference-mediated inhibition of erythropoietin receptor expression suppresses tumor growth and invasiveness in A2780 human ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol*. 2009, 174 (4), 1504–1514.
35. Badve S, Nakshatri H. Breast-cancer stem cells-beyond semantics. *Lancet Oncol*. 2012, 13 (1), e43–e48.