

Pomimo znaczących osiągnięć współczesnej farmakoterapii, nowotwory piersi pozostają nadal ogromnym problemem dla społeczeństwa. W 2012 roku zdiagnozowano prawie 1,7 miliona nowych przypadków tej choroby. Rak piersi jest drugim, co do częstości występowania nowotworem na świecie i najczęściej występującym w Europie. W 2012 roku odnotowano, że aż 12% nowych przypadków raka na świecie to nowotwór piersi, podobnie w Europie, gdzie odsetek ten wyniósł 13%. Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem wśród kobiet w 140 krajach spośród 184 krajów świata. Dzięki wcześniejszej, efektywnej diagnostyce śmiertelność spowodowana tym typem nowotworu jest mniejsza, niemniej jednak nadal stanowi piątą przyczynę zgonów na świecie i trzeci w Europie.

Rosnąca liczba badań naukowych i klinicznych jest powodem, dla którego nowotwór piersi, nie jest już rozpatrywany, jako jedna choroba, a raczej zespół jednostek chorobowych charakteryzujących się odmiennym obrazem klinicznym, indywidualną odpowiedzią na terapię, różnymi czynnikami ryzyka, a także, co ważniejsze, specyficznymi charakterystykami determinantami na poziomie molekularnym, zwanych markerami biologicznymi. Determinanty te to najczęściej receptory komórkowe – grupa białek zaangażowana w przekazywanie informacji ze środowiska do wnętrza komórki. Najnowsza taksonomia nowotworów piersi oparta jest na markerach biologicznych takich jak receptory hormonalne – estrogenów (ER) oraz progesteronu (PR), a także receptora ludzkiego, naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2). W oparciu o zmienioną aktywność powyższych markerów, wyodrębniono cztery podtypy diagnostyczne raka piersi: luminalny typ A (ER+ i/lub PR+ oraz HER2-), luminalny typ B (ER+ i/lub PR+, HER2+ lub zwiększone tempo proliferacji komórek), bazalny (ER-, PR- oraz HER2-), a także typ ze zwiększoną ekspresją HER2 (ER- and PR-, HER+). Szacuje się, że ok. 15- 20% nowotworów piersi charakteryzuje się zwiększoną aktywnością genu *her2* promującego proliferację komórek, a tym samym wzrost nowotworu. Z tego względu ten typ nowotworu ma tendencję do inwazyjnego naciekania, jest związany ze znacząco gorszym rokowaniem i częściej występującym nawrotem choroby. W związku z powyższym stanowi duże wyzwanie dla klinicystów. Niemniej jednak istnieje lek – trastuzumab, który w połączeniu ze standardową chemioterapią, znacząco zwiększa szanse pacjentów na dłuższe życie, nawet o 37% w porównaniu do stosowanej monoterapii standardowymi cytostatykami. Trastuzumab – humanizowane przeciwciało monoklonalne, jest jednym z istotniejszych przykładów terapii celowanej, która była przełomowym osiągnięciem w przeciwnowotworowej medycynie molekularnej. Zasada jej działania polega na hamowaniu wzrostu nowotworu poprzez blokowanie specyficznych celów molekularnych przyczyniających się do rozwoju raka, zamiast unicestwienia wszystkich szybko dzielących się komórek, jak to ma miejsce w chemio- lub radioterapii. Terapia celowana z sukcesem wprowadzona była dla wielu typów nowotworów, znacząco zwiększając średni przeżycie pacjentów. Trastuzumab, znany także pod nazwą Herceptyna, został pierwotnie zaakceptowany w 1998 roku przez FDA (Amerykańską Agencję Leków) w leczeniu raka piersi z przerzutami. Po wielu badaniach, uznano ostatecznie, że lek jest również skuteczny w terapii wszystkich nowotworów piersi charakteryzujących się wzmożoną aktywnością HER2. Obecnie, wszystkie inwazyjne przypadki nowotworu piersi diagnozowane są pod kątem nadekspresji i/lub amplifikacji genu *her2* w celu wyłonienia pacjentek, dla których terapia celowana jest szansą na wyleczenie. Terapeutyczny efekt trastuzumabu polega na wiązaniu się przeciwciała z receptorem HER2, co przeciwdziała dzieleniu się komórek nowotworowych, jednak, mimo wielu stawianych hipotez, szczegółowy mechanizm aktywności tego przeciwciała nie został potwierdzony i opisany. Co więcej, pomimo niewątpliwego sukcesu klinicznego Herceptyny, większość pacjentów stosujących tę formę terapii ostatecznie rozwija oporność na ten lek, tracąc jego terapeutyczny wpływ. W związku z tym zrozumienie podstaw rozwoju oporności jest dużym wyzwaniem dla pacjentów i stanowi wyzwanie dla naukowców.

Głównym celem proponowanych badań naukowych jest zrozumienie molekularnego podłoża rozwoju oporności na trastuzumab. Pomimo sukcesów klinicznych stosowania Herceptyny, jej wpływ na komórki raka piersi nie jest do końca poznany. W związku z tym trudno jest również opisać mechanizm rozwoju oporności na trastuzumab. Oporność na lek powstaje w wyniku naturalnej zdolności komórek (rakowych) do adaptacji do zmieniającego środowiska (w tym odpowiedzi na substancje terapeutyczne). Aktualne badania traktują rozwój oporności, jako pojedyncze zjawisko, natomiast według nas mechanizm ten powinien być traktowany, jako sekwencja następujących po sobie zdarzeń na poziomie molekularnym. Takie podejście pozwoli nam na monitorowanie zmian zachodzących w komórce w czasie oraz stabilności tych zmian w trakcie całego procesu. Dzięki temu zyskamy niepowtarzalną okazję, by opisać dynamiczny obraz molekularny procesu i precyzyjnie wyszczególnić najbardziej znaczące biomolekuły oraz ich sygnałowe zaangażowanie na wczesnych etapach w tworzenie oporności na trastuzumab.

Nowotwór to złożona choroba uwarunkowana wielogenowo, dlatego jeżeli jedna z nich sygnałowa zostanie zablokowana, w dalszym ciągu istnieje wiele innych zaangażowanych w proliferację i przeżycie komórek rakowych. Niektóre komórki zdolne są niwelować skutki terapii poprzez subtelne modyfikacje w procesie przekazywania informacji w sieciach sygnałowych. Aktualne doniesienia wiadczy o tym, że do wiadczenia oparte na jednej z nich sygnałowej nie przynosi znaczących wyników w badaniach klinicznych, pomimo zadowalającego efektu w badaniach *in vitro* i eksperymentach na zwierzętach. Pokazuje to, jak ważną jest kompleksowa analiza wielu komponentów molekularnych zaangażowanych szeregiem sieci sygnałowych. Najbardziej oczywistym poziomem analizy przemian funkcjonowania komórki jest transkryptom, będący w centrum funkcjonowania komórki na poziomie molekularnym i stanowi on niejednokrotnie przyczynę i/lub skutek tych przemian. Mając na uwadze jak ważną jest kompleksowa analiza wielu sieci sygnałowych, połączymy metodę wysokowydajną, jak jest technika mikromacierzy, z modelowaniem komputerowym w celu zbadania zmian na poziomie transkryptomu w czasie rozwoju oporności, co niewątpliwie jest podejściem innowacyjnym.

Dwie stabilne, certyfikowane przez ATCC (American Type Culture Collection) linie komórkowe raka piersi zostały wybrane, jako linie wyjściowe do stworzenia biologicznego modelu rozwoju oporności, i b d stanowiły również punkt odniesienia. Wybrane linie komórkowe są HER2+, z potwierdzoną do wiadczalnie wrażliwością na trastuzumab i posiadają cechę zdolności do rozwoju oporności na Herceptynę. Ustalony model biologiczny ma na celu stworzenie warunków rozwoju oporności, podobnych do warunków występujących w warunkach klinicznych. W tym celu planowane jest długotrwałe prowadzenie hodowli w stałej, względnie niskiej dawce trastuzumabu. W oparciu o stopień proliferacji, a także inne cechy charakterystyczne, tj. morfologia komórek, wybranych zostanie 6 najbardziej znaczących punktów czasowych, dla których przeprowadzone będą

pomiary zmian intensywności ekspresji genów.

Technika mikromacierzy jest wysoko wydajnym методом badania różnic w ekspresji genów pomiędzy jednostkami różniącymi się fenotypowo np. u osoby zdrowej i chorej, a także zmian w ekspresji genów spowodowanych dodatkową ingerencją ze strony środowiska np. przed i po podaniu leku. Dzięki miniaturyzacji i prowadzonym przez lata technicznym udoskonaleniom metody, możliwe jest obecnie badanie dziesiątek tysięcy genów jednocześnie nieznacznie powtarzalności. Pomimo różnorodnych sposobów immobilizacji sond molekularnych, drukowania ich na macierzy, znakowania próbek oraz systemów detekcji, ogólna zasada działania mikromacierzy pozostaje niezmienna. Podstawą jest hybrydyzacja znakowanej próbki do unieruchomionego na macierzy zestawu sond, charakterystycznych dla danego organizmu, oraz detekcja specyficznego zestawu transkryptów w oparciu o komplementarną sekwencję kwasów nukleinowych. Detekcja sygnału z każdego miejsca hybrydyzacyjnego (specyficzna sonda) jest proporcjonalna do ilości poszczególnych cząsteczek mRNA związanych z konkretnymi sondami, co pozwala na ocenę intensywności ekspresji genów w odniesieniu do kontroli. Zaletą wybranych przez nas mikromacierzy jest możliwość detekcji ponad 50000 transkryptów, w tym także w tym długie, niekodujące RNA (linc RNAs), co z kolei generuje znaczącą ilość informacji, która przyczyni się do stworzenia pełniejszego obrazu badanego procesu. W oparciu o zmiany ekspresji genów na podstawie dwóch modeli biologicznych stworzymy komputerowy model molekularnych mechanizmów budujących podstawy rozwoju oporności.

Jesteśmy przekonani, że zaproponowany przez nas model znacząco wzbogaci obecną wiedzę z dziedziny nauk podstawowych, poprzez wyjaśnienie mechanizmu powstawania oporności na trastuzumab w czasie na poziomie molekularnym. Wiedza ta może stanowić źródło informacji dla przyszłych badań naukowych w celu poszukiwania efektywnego sposobu na zatrzymanie, spowolnienie lub zniwelowanie efektu oporności na Herceptyn.