

PREDKLINIČNE RAZISKAVE TARČNIH ZDRAVIL

Prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

Onkološki inštitut Ljubljana
Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju

mcemazar@onko-i.si; maja.cemazar@fvz.upr.si

IZVLEČEK

V prispevku so predstavljene predklinične raziskave. Predklinične raziskave zajemajo preučevanje mehanizmov nastanka in razvoja raka ter bioloških in molekularnih značilnosti malignih celic in tumorjev. Poleg tega predklinične raziskave preučujejo tudi učinke različnih vrst zdravljenja ali njihovih kombinacij na eksperimentalnih tumorjih laboratorijskih živali, s poudarkom na specifičnosti, ki je pomembna pri razvoju in ovrednotenju tarčnih zdravil. Predstavljene so tudi translacijske raziskave, ki vključujejo prenos novih vrst zdravljenja v klinično prakso in preučevanje bioloških označevalcev na velikem številu kliničnih vzorcev tumorjev z orodji genomike, proteomike, farmakogenomike in metabolomike z namenom iskanja novih terapevtskih tarč ter diagnostičnih in napovednih dejavnikov.

Pomen predkliničnih in translacijskih raziskav je predvsem v povezovanju znanja o biologiji tumorjev na molekularnem področju s kliničnim zdravljenjem, ki pa je uspešno samo ob dobrem in produktivnem sodelovanju vseh raziskovalcev, predklinikov in klinikov.

Ključne besede: translacijska onkologija, celične kulture, živalski tumorski modeli

UVOD

Rak je bolezen, za katero je značilna nenadzorovana delitev celic in sposobnost teh celic, da vdirajo med druge celice z neposrednim vraščanjem v lokalna tkiva (invazija) ali z migracijo celic na bolj oddaljena mesta (za-

sevanje). Te spremenjene biološke lastnosti rakavih celic so posledica poškodb (mutacij) na DNA, predvsem v genih, ki nadzorujejo delitev, smrt in diferenciacijo celic. Te mutacije so lahko dedne ali pridobljene in vodijo v nenadzorovano delitev celic in nastanek tumorja. Izraz tumor (po latinsko »oteklina«) se nanaša na katerokoli nenormalno maso tkiva, ki je lahko maligna (rakava) ali benigna (nerakava). Le maligni tumorji imajo sposobnost invazije v druga tkiva in zasevanja (Tannock et al., 2013).

Karcinogeneza in lastnosti rakavih celic

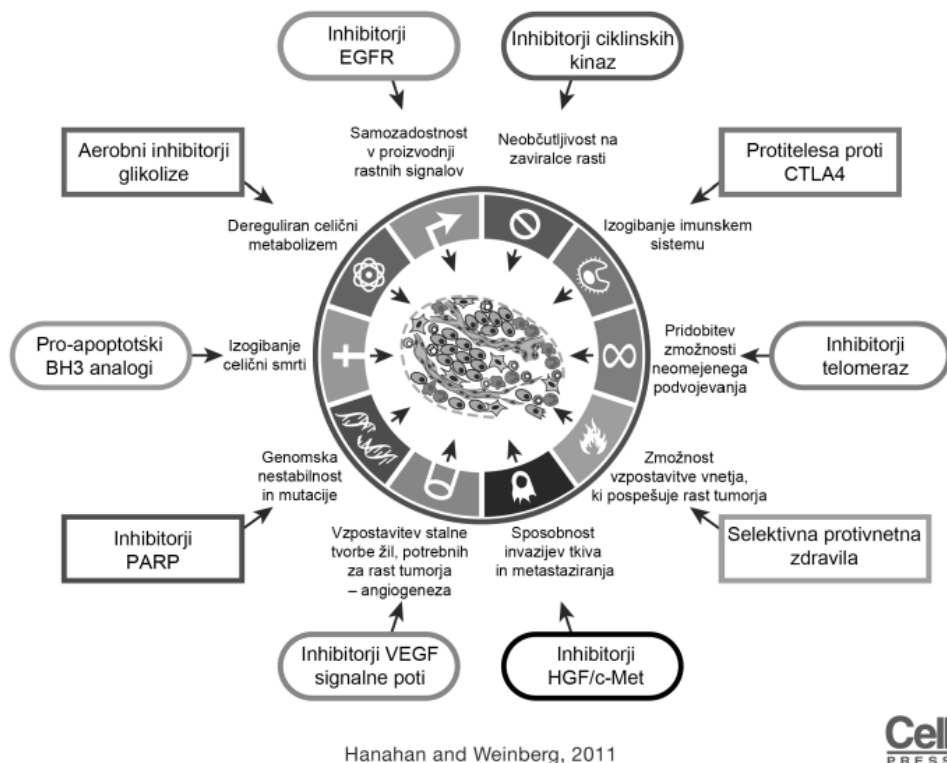
Rak je bolezen genov. Običajno mora priti do več mutacij, preden se normalna celica spremeni v rakasto. Proces vključuje tako protoonkogene kot tumor-supresorske gene, ki lahko nosijo zapis bodisi za proteine bodisi za molekule RNA (t. i. nekodirajoče molekule RNA), ki regulirajo prepisovanje genov in molekul mRNA, ki nosijo zapis za proteine (t. i. kodirajoči geni).

Med najbolj proučene gene, katerih mutacije vodijo do nastanka raka, spadajo protoonkogeni in tumor-supresorski geni, ki nosijo zapis za proteine (onkoproteine in tumor-supresorske proteine).

Protoonkogeni nosijo zapise za proteine, ki sodelujejo pri prenosu signalov. Te beljakovine sodelujejo pri prenosu sporočil celici ali drugim celicam, da je treba skozi proces delitve (mitoza in citokineza). Ko mutirajo, postanejo onkogeni in pošiljajo nepravilne signale, kar lahko vodi do prekomerne delitve celice. Protoonkogeni so večinoma molekule, ki sodelujejo v signalnih poteh; lahko so rastni faktorji ali receptorji rastnih faktorjev (HER2/neu, ErbB2, PDGF), molekule, ki prenašajo signale (ras in src), transkripcijski faktorji (myc, fos in jun) ali protoonkogeni, ki kodirajo antiapoptoske proteine (Bcl-2 ali Mdm2). Prav ti proteini so glavne tarče, proti katerim razvijamo tarčna zdravila. Pomembno pa je seveda poznati natančne mehanizme signalnih poti, da ima z zdravilom povzročena inhibicija res učinek na delovanje rakave celice.

Tumor-supresorski geni nosijo zapis za proteine, ki zaustavijo ali upočasnijo proces celične delitve, z namenom, da se popravi DNA. Njihovo izražanje običajno spodbudijo signali, ki sporočijo, da je prišlo do poškodbe DNA. Mutacija lahko prizadene sam tumor-supresorski gen ali pa signalno pot, ki jo ta aktivira, zato je ovirano popravilo DNA. Primeri tumor-supresorskih genov so p53, RB1, APC in BRCA1 (Weinberg, 2013; Tannock et al., 2013).

Med karcinogenezo rakave celice pridobijo mnogo lastnosti, po katerih se razlikujejo od normalnih celic. Poznavanje teh specifičnih lastnosti ter celic, proteinov in molekul RNA, ki so vpleteni v te spremenjene procese (lastnosti), nam omogoča, da razvijemo tudi ustrezna zdravila proti tem spremenjenim lastnostim tumorskih celic oz. molekulam (Slika 1) (Hanahan, Weinberg, 2011).



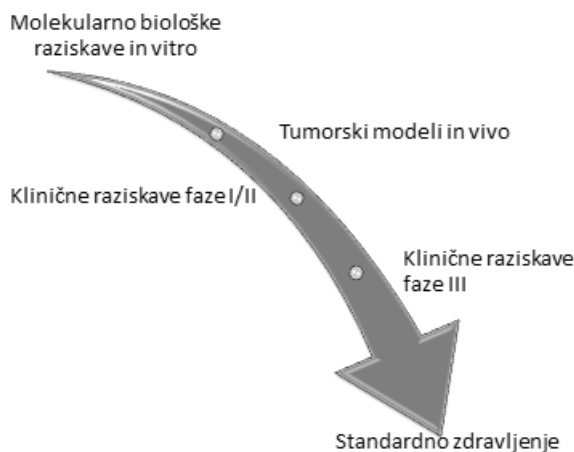
Slika 1: Lastnosti tumorskih celic in tarčna zdravila (prirejeno po Hanahan, Weinberg, 2011).

Predklinične raziskave

Eksperimentalna onkologija se ukvarja z raziskavami raka na predkliničnem nivoju. Preučuje mehanizme nastanka in razvoja raka, biološke in molekularne značilnosti malignih celic in tumorjev ter učinke različnih vrst zdravljenja ali njihovih kombinacij na eksperimentalnih tumorjih laboratorijskih živali. Tako se večina znanja o biologiji tumorjev zbira na predkliničnem

nivoju. Za uvedbo novih vrst zdravljenj v klinično onkologijo in njihovo rutinsko uporabo pa je potreben prenos znanja iz predklinike s pomočjo načrtovanih kliničnih raziskav. Ta prenos znanja se izvaja s translacijskimi raziskavami (Slika 2). Nobena klinična raziskava, ki uvaja novo zdravljenje, ne more dobiti privolitve strokovnih in etičnih komisij, če nima trdnih dokazov v predkliničnih raziskavah o potencialnem učinku tudi na ljudeh. Mnoge translacijske raziskave pa potekajo tudi na biološkem materialu zdravljenih bolnikov, tako da preučujejo biološke označevalce ali molekularne mehanizme in s tem razloge za uspešnost ali neuspešnost zdravljenja (Serša, 2009).

S takimi raziskavami tudi preučujemo in določamo potencialne tarče (mutirani, spremenjeni proteini), proti katerim razvijamo zdravila.



Slika 2: Veriga raziskav v onkologiji, VIR: lasten.

Zato je vloga eksperimentalne predklinične onkologije nepogrešljiva za prenos znanja o biologiji malignih celic v klinično testiranje in prakso. Za dobro sodelovanje med »eksperimentalci« (biologi, kemiki, mikrobiologi, farmacevti itd.) in kliničnimi onkologi je potrebno medsebojno poznavanje področij delovanja. Predkliniki morajo imeti dovolj znanja o kliničnih problemih v onkologiji, da lahko zastavijo raziskave, ki so klinično pomembne,

kliniki pa osnovna znanja o biologiji raka in predkliničnih testih, da lahko na osnovi njihovih izsledkov načrtujejo klinične raziskave. Ravno sodelovanje, zaupanje in raziskovalni nemir je tisto, kar je gonilna sila napredka v onkologiji.

Predklinične raziskave potekajo na različnih bioloških vzorcih bolnikov, celičnih kulturah in laboratorijskih živalih.

Molekularnobiološke metode, ki jih uporabljamo pri rakavih boleznih za preučevanje karcinogeneze, določevanje potencialnih tarč in ugotavljanje učinkov specifičnega zdravljenja, so (Tannock et al.,2013):

A. Kromosomske analize rakavih celic v primerjavi z normalnim človeškim kariotipom:

- spektralna kariotipizacija (SKY in FISH).

B. Molekularne analize, ki obsegajo:

- sekveniranje DNA in določanje mutacij,
- kvalitativno in kvantitativno določevanje genov: PCR in PCR v realnem času (qPCR),
- analize polimorfizmov posameznih nukleotidov: SNP (angl. single nucleotide polymorphism),
- hibridizacijo nukleinskih kislin, uporabo restrikcijskih encimov in manipulacijo genov,
- ustvarjanje gensko spremenjenih klonov: genska transfekcija in mutageneza ter
- funkcionalno inaktivacijo genov na različnih nivojih izražanja.

C. Genomske metode:

- fluorescenčna in situ hibridizacija (FISH),
- primerjalna genomska hibridizacija (CHG),
- mikromreže za določevanje genske ekspresije (hibridizacija).

D. Proteinske metode:

- proteinske mikromreže (imunski odtisi), ekspresija proteinov (metode ELISA),
- analiza tkivnih rezin (histološke, histopatološke in imunohistološke metode),
- analiza posameznih celic (citopatološke in imunocitološke metode),

- X-žarki – rentgenska analiza in nuklearna magnetna resonanca proteinskih struktur,
- encimske aktivnosti.

Te metode lahko izvajamo neposredno na vzorcih, pridobljenih od bolnikov (biopsije, histološki vzorci, primarne celične kulture), ali pa na trajnih celičnih kulturah *in vitro* in tumorskih modelih *in vivo* (Hau, 2003; Workman et al., 2010).

Tako imenovane *in vitro* raziskave omogočajo gojenje različnih vrst celic v kulturah, kar zagotavlja homogen sistem (enake celice) v izoliranih pogojih, brez vplivov fizioloških dejavnikov organizma. Celične kulture, predvsem humanih tumorjev, so nepogrešljivo orodje pri predkliničnih raziskavah o raku. Za zelo veliko celičnih kultur namreč natančno vemo, kateri geni so mutirani, in tako lahko zelo natančno spremljamo učinek določenega tarčnega zdravila na neko signalno pot, za katero vemo, kateri proteini v tej signalni poti so mutirani. Najnovejše metode z uporabo tehnologije CRISPR/Cas9 pa nam omogočajo pripravo celičnih linij s točno usmerjenimi mutacijami, tako da lahko še bolj natančno spremljamo mehanizme delovanja tarčnih zdravil na posamezne signalne poti (Sander, Joung, 2014). Naslednji višji nivo od celičnih kultur so tumorski modeli *in vivo* na laboratorijskih živalih, kjer ugotavljamo tako sistemske spremembe kot tudi protitumorsko učinkovitost. Na voljo je vrsta mišjih in humanih tumorskih modelov, ki jih lahko presadimo v različne organe laboratorijskih živali, najprimernejše pa je ortotopično presajanje (v organ, iz katerega tumor primarno izhaja). Kot laboratorijske živali največkrat uporabljamo laboratorijske miši, v manjši meri podgane, pa tudi prašiče, pse, mačke in opice. Za presajanje humanih tumorskih celičnih linij v laboratorijske miši uporabljamo imunsko zavrte živali (gole miši in SCID-miši). Namen preizkušanja učinkovin na laboratorijskih živalih je čim bolj se približati pogojem in razmeram, ki so prisotne pri humanih tumorjih, z upoštevanjem razlik v fiziologiji. Načelo 3R (reduction, refinement in replacement) moramo upoštevati pri vseh raziskavah na živalih. Posebno pozornost moramo posvetiti načrtovanju poskusov (pilotne študije, nasvet statistika, učenje dela z živalmi in pravilna dokumentacija), napovedovanju in prepoznavanju stranskih učinkov, določevanju stopnje bolečine in stresa, poznavanju biologije tumorjev, čim bolj humanemu izboru postopkov, stalnemu pregledovanju živali, dokumentaciji in objavljanju. Seveda pa je treba za raziskave na laboratorijskih živalih pridobiti vsa ustrezna dovoljenja (Ministrstva za kmetijstvo in okolje in Republiške etične ko-

misije za poskuse na živalih). Teste, ki jih uporabljamo za določevanje protitumorskega učinka, razdelimo na: test klonogenosti, test zaostanka rasti in test lokalnega nadzora rasti tumorjev. Bolj pomembna kot absolutna občutljivost tumorskih celic na določeno zdravljenje pa je relativna občutljivost v primerjavi z občutljivostjo normalnih tkiv. Teste, s katerimi ovrednotimo občutljivost normalnih tkiv, delimo na teste klonogenosti in teste, ki ovrednotijo funkcionalnost tkiv (Hau, 2003; Workman et al., 2010).

ZAKLJUČEK

Z rezultati poskusov, ki jih opravimo na predkliničnem nivoju, kjer dokažemo, da je tarčno zdravilo specifično (res cilja tarčo, proti kateri je bilo razvito), učinkovito (ima dober protitumorski učinek) in ne povzroča neželenih stranskih učinkov (nima oz. ima minimalen učinek »off-target«), lahko začnemo pripravljati t. i. translacijske raziskave, ki so most med bazičnimi in kliničnimi raziskavami in omogočajo vstop novim, tarčnim zdravilom v klinično uporabo.

LITERATURA

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646-74.

Hau J. Animal models. In: Hau J, Van Hoosier GL, eds. *Handbook of Laboratory Animal Science*, 2nd ed. Volume II: Animal models. Boca Raton: CRC press; 2003: 1–9.

Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014;32(4):347–55.

Serša G, Čufer T, Sadikov A. Predklinične, klinične in translacijske raziskave ter statistika v onkoloških raziskavah. In Novaković S, Jezeršek Novaković B, Strojani P, Žgajnar J, eds. *Onkologija*. Ljubljana: Mladinska knjiga; 2009: 74–83.

Tannock I, Hill R, Bristow R, Harrington L. *The Basic Science of Oncology*, Fifth Edition. USA:Mc Graw Hill Education; 2013.

Weinberg AR. *The Biology of Cancer*, 2nd Edition. USA:Garland Science; 2013.

Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin D J, Double JA, Everitt J, Farningham DAH, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. Brit J Cancer. 2010;102:1555–77.

