

Urokinazni aktivator plazminogena, njegovi zaviralci in receptor pri raku dojke – novi napovedni dejavniki poteka bolezni in odgovora na sistemsko zdravljenje

Simona Borštnar, Ivan Vrhovec in Tanja Čufer

Preučevanje bioloških lastnosti tumorjev, ki izražajo invazivnost in sposobnost zasevanja, je pomembno področje v raziskovanju raka dojke. Že pred dolgo časa je namreč postalo jasno, da nam klasični napovedni dejavniki, kot so prizadetost pazdušnih bezgavk, patološka velikost tumorja, patohistološki tip tumorja s stopnjo malignosti ter vsebnost hormonskih receptorjev v tumorju, ne dajejo zadostne informacije za napovedovanje izhoda bolezni.

Seveda je določitev teh dejavnikov še vedno izjemno pomembna in je nepogrešljiv del popisa vsake bolnice z rakom dojke. Še vedno najprej pogledamo, ali imajo bolnice zasevke v pazdušnih bezgavkah, kar pomeni prvo delitev v prognostično manj in bolj ugodno skupino. Izsledki številnih raziskav v preteklih desetletjih so pokazali, da je absolutna korist sistemskega zdravljenja največja pri bolnicah z zasevki v pazdušnih bezgavkah, vendar pa v enakem odstotku (relativna korist) pomaga tudi pri bolnicah brez zasevkov v pazdušnih bezgavkah (1, 2). To lahko primerjamo z nekakšno slepo obrambo pred ponovitvijo bolezni. V prognostično neugodni skupini bolnic pričakujemo, da bo ponovitev bolezni zadela večino bolnic. Ker ne vemo, kateri bo prizaneseno, »zaščitimo« vse. Le manjšina v tej skupini bo zaščitena brez potrebe. V prognostično ugodni skupini pa vemo, da bo ponovitev bolezni prizadela manjšino bolnic. Če zaščitimo vse, bo včasih težko obrambo z dopolnilnim sistemskim zdravljenjem brez potrebe prestala večina prognostično ugodnih bolnic. Večina bolnic in njihovih zdravnikov se verjetno strinja, da je bolje biti zaščiten zama kot pa tvegati možnost, da se bolezen ponovi. Vendar obramba pred ponovitvijo bolezni z dopolnilnim sistemskim zdravljenjem žal mnogokrat odpove. Tu pa se začne drugi del zgodbe. Postavljamo si nova vprašanja. Ne zanima nas samo, pri katerih bolnicah je tveganje za ponovitev bolezni tako majhno, da dopolnilnega sistemskega zdravljenja ne potrebujejo, ampak tudi, kakšno sistemsko zdravljenje je pri neki skupini bolnic najpriporočljivejše.

Napovedni dejavniki so lastnosti tumorja in tumorskih celic, ki napovedujejo prognozo raka (prognostic factor) in odgovor na različne vrste sistemskega zdravljenja (predictive factor).

Iskanje novih napovednih dejavnikov

Novi napovedni dejavniki so tiste lastnosti tumorja in tumorskih celic, s katerimi želimo čim boljše opisati raznolikost raka, napovedati prognozo in predvideti odgovor na različne vrste sistemskega zdravljenja pri vsaki bolnici. Ti novi napovedni dejavniki so proliferacijski označevalci, onkogeni, supresorski geni, receptorji za rastne faktorje, dejavniki invazivnosti tumorja.

Dejavniki invazivnosti tumorja

Prognoza raka je odvisna predvsem od sposobnosti rakavih celic za invazijo v okolna tkiva in zasevanje v oddaljene organe (3,4). Invazija in zasevanje potekata v naslednjem zaporedju: lokalna invazija v zunajcelični matriks, angiogeneza, invazija v krvne žile, preživetje rakavih celic v žilnem obtoku, njihova ekstravazacija in sekundarna rast (slika 1), (3). Za razvoj teh dogodkov so pomembne različne proteaze: serinske (aktivatorji plazminogena in plazmin), cisteinske (katepsin B, H, L), aspartilne

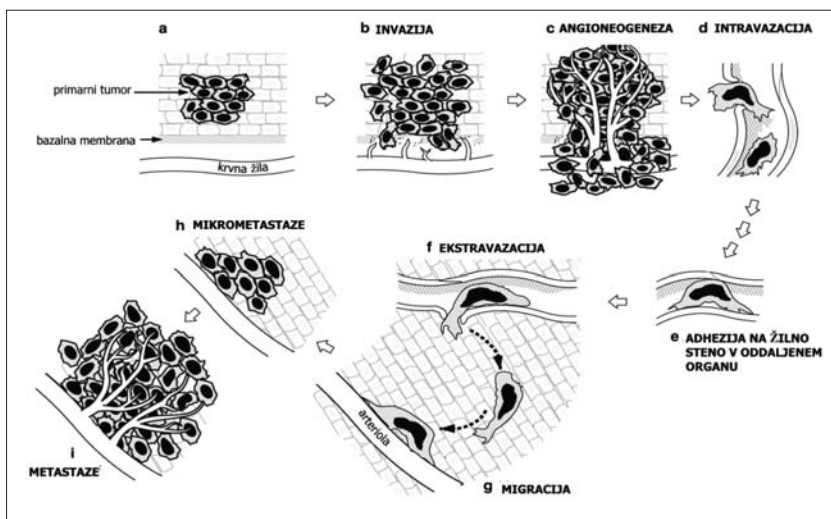
(katepsin D) in metaloproteaze (želatinaze, kolagenaze, stromelizin) (4).

Dejavniki invazivnosti tumorja so proteaze, njihovi zaviralci in receptorji, ki sodelujejo pri invaziji tumorskih celic v okolna tkiva in pri zasevanju v oddaljene organe.

Izsledki predkliničnih in kliničnih raziskav napovednega pomena kažejo na najpomembnejšo vlogo serinske proteaze urokinaznega aktivatorja plazminogena (uPA) ter njegovih zaviralcev (PAI-1 in PAI-2) ter receptorja (uPAR) pri invaziji in zasevanju tumorskih celic.

Rakave celice ter tudi makrofagi in fibroblasti v tumorju sintetizirajo in izločajo inaktiven enoverižni proencim (pro-uPA). Katepsin D prek aktivacije katepsina B in L ter plazmin s cepitvijo verige aktivirajo pro-uPA v aktivno obliko

uPA. Aktivacija uPA sproži kaskadni sistem pretvorbe plazminogena v aktiven proteolitični encim plazmin, ki razgrajuje medcelične proteine (fibrin, fibronektin, proteoglikane in laminin) in prek aktivacije prokolagenaze IV razgrajuje kolagen kot sestavni del bazalne membrane (Slika 2). Ko se bazalna membrana razgradi, sta tumorskim celicam omogočena prodor v okolna tkiva in zasevanje v oddaljene organe (5–8). Zelo pomembno vlogo v uravnavanju proteolize imajo zaviralci aktivatorja plazminogena. Najpomembnejša med štirimi poznanimi sta



Slika 1. Zaporedje dogodkov pri invaziji tumorskih celic in zasevanju v oddaljene organe. Povzeto po Annual Review of Medicine 1998 (3).

zaviralec aktivatorja plazminogena tipa 1 (PAI-1) in zaviralec aktivatorja plazminogena tipa 2 (PAI-2). Oba spadata v razred serpinskih zaviralcev serinskih proteaz (5, 8). PAI-2 deluje kot čisti zaviralec uPA – velike vrednosti napovedujejo manjši metastatski potencial tumorjev. PAI-1 pa je protein z več vlogami. Njegov končni učinek je, da deluje proteolitično in ne kot zaviralec – velike vrednosti napovedujejo večji metastatski potencial tumorja.

Močna in neodvisna napovedna moč uPA in PAI-1 je potrjena v metaanalizi, v katero je bilo vključenih 8377 bolnic z operabilnim rakom dojke, tudi tiste, ki so bile zdravljene na OI v Ljubljani.

Napovedni pomen uPA, PAI-1, PAI-2 in uPAR za potek raka dojke

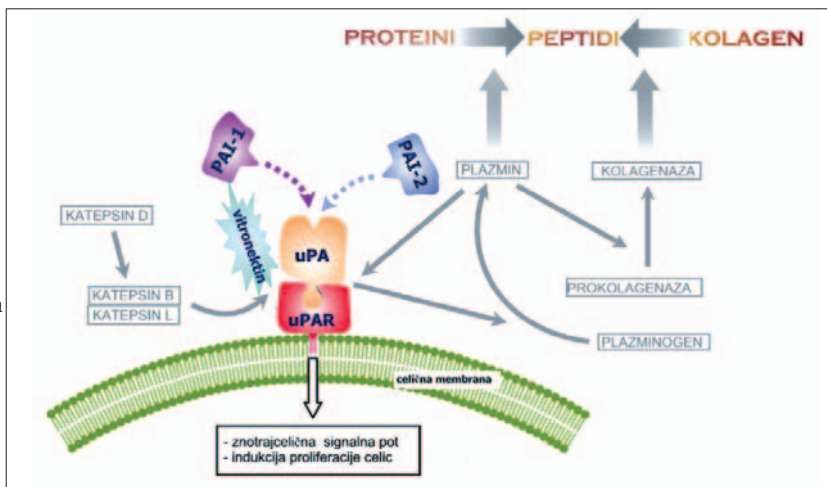
Pred dobrimi desetimi leti se je med raziskovalci porodila ideja, da bi lahko proteaze s svojo vlogo v celični invaziji in zasevanju napovedovale potek bolezni in preživetje pri rakavih boleznih, tudi pri raku dojke. Preživetje bolnic z rakom je namreč odvisno predvsem od metastatskega potenciala primarnega raka. Duffy s sodelavci je bil prvi, ki je določil vsebnost uPA v citosolu tumorjev 62 bolnic z rakom dojke in prvi ugotovil, da velika vrednost uPA napoveduje krajše preživetje brez znamenj bolezni (9). Nadaljnje klinične raziskave so to pri raku dojke v veliki meri že potrdile. Močna in neodvisna napovedna moč uPA in PAI-1 je sedaj že potrjena tudi v metaanalizi, v katero je bilo vključenih 8377 bolnic, med njim tudi skoraj sto tistih, ki so bile zdravljene na Onkološkem inštitutu v Ljubljani (10). Manj raziskan je napovedni pomen PAI-2 in uPAR.

Napovedni pomen uPA, PAI-1, PAI-2 in uPAR za odgovor na sistemsko zdravljenje

V zadnjih letih znova prihaja v ospredje predvsem vprašanje, kakšno sistemsko zdravljenje je pri neki skupini bolnic najpriporočljivejše. Iščemo torej napovedne dejavnike odgovora na sistemsko zdravljenje. Že tri desetletja je znano, da so tak dejavnik hormonski receptorji v tumorju, napovedujejo namreč dober odgovor na hormonsko zdravljenje, kar s pridom uporabljamo pri načrtovanju zdravljenja bolnic z rakom dojke. Proteaze so bile do sedaj malo raziskane v tej smeri. Prvi izsledki so iz raziskave, v katero je bilo vključenih 74 bolnic z metastatsko boleznijo. Pri bolnicah z veliko vsebnostjo uPA in PAI-1 so ugotovili slabši odgovor na zdravljenje s tamoksifenom (11). Izsledki iz raziskav, kjer so preučevali napovedni pomen uPA za odgovor na dopolnilno sistemsko zdravljenje s tamoksifenom, so nasprotni. Kažejo namreč na to, da velike vrednosti uPA v tumorju napovedujejo dober odgovor na dopolnilno zdravljenje s tamoksifenom (12–14).

Naše izkušnje

Napovedni pomen uPA, PAI-1, PAI-2 in uPAR na potek raka dojke in odgovor na različne vrste dopolnilnega sistema zdravljenja smo preučili tudi v svoji raziskavi. Vanjo smo vključili 460 bolnic, ki smo jih v letih 1997 in 1998 zdravili na Onkološkem inštitutu v Ljubljani zaradi operabilnega raka dojke. Iz tumorjev dojke smo neposredno po operaciji pripravili



Slika 2. Shema tumorske proteolize. Črčkasta puščica pomeni inhibicijo, polna puščica aktivacijo. (uPA = urokinazni aktivator plazminogena, PAI-1/2 = zaviralec aktivatorja plazminogena tipa 1/2, uPAR = receptor za uPA)

citosole in tritonske ekstrakte, v katerih smo določili dejavnike proteinskega sistema uPA. Koncentracijo uPA, PAI-1 in uPAR smo določili v tritonskih ekstraktih, koncentracijo PAI-2 pa v citosolih. Vse štiri beljakovine smo določili z encimsko-immunsko metodo. Preživetje brez znamenj bolezni (PBZB) smo prikazali s preživetvenimi krivuljami po Kaplan-Meierju in razlike v preživetju analizirali s testom logrank. Za univariatno in multivariatno analizo smo uporabili regresijsko analizo po Coxu.

V srednji opazovalni dobi 33 mesecev se je bolezen ponovila pri 18,5 % bolnic. Ugotovili smo, da sta PAI-1 in PAI-2 neodvisna napovedna dejavnika poteka bolezni pri bolnicah z rakom dojke. Bolnice z velikimi vrednostmi PAI-1 so imele 2,67-krat večje, bolnice z velikimi vrednostmi PAI-2 pa 1,72-krat manjše tveganje ponovitve bolezni. Preostala dejavnika proteinskega sistema uPA nista pokazala statistično značilnega vpliva na preživetje brez znamenj bolezni (PBZB). Poleg obeh zaviralcev uPA je le status bezgavk zadržal neodvisno napovedno vrednost.

Kombinacija dejavnikov proteinskega sistema uPA je izboljšala napovedno vrednost. Najznačilnejšo razliko smo ugotovili pri kombinaciji obeh zaviralcev uPA. Bolnice s tumorji, ki so vsebovali manj PAI-1 in več PAI-2 od razmejitvenih vrednosti, so imele 86 % 3-letno PBZB, medtem ko so imele bolnice z velikimi vrednostmi PAI-1 in majhnimi vrednostmi PAI-2 v primarnih tumorjih samo 56 % 3-letno PBZB (Slika 3). Pri bolnicah z negativnimi

pazdušnimi bezgavkami sta se PAI-1 in PAI-2 pokazala kot edina neodvisna napovedna dejavnika poteka bolezni (RT= 4,23 in 0,15). V kombinaciji obeh pa so imele bolnice z ugodno kombinacijo vrednosti obeh zaviralcev (majhen PAI-1 in velik PAI-2) 100 % 3-letno preživetje, medtem ko je bilo pri bolnicah z neugodno kombinacijo (velik PAI-1 in majhen PAI-2) komaj 67,8 %.

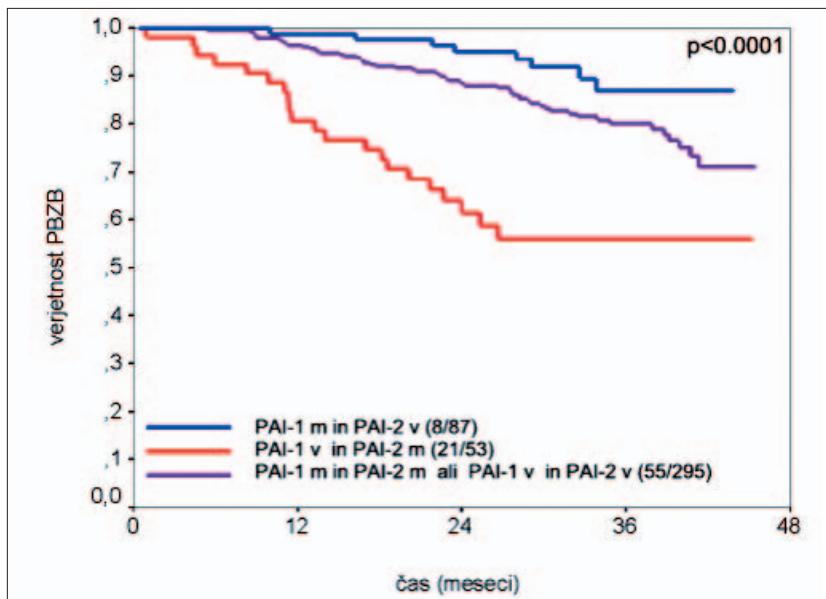
Nekoliko nas je presenetilo, da uPA v naši raziskavi ni pokazal prepričljivega napovednega pomena za PBZB. Težko je razložiti razliko med našo in drugimi raziskavami. Način priprave tkiva in metoda določanja sta podobna in primerljiva. Edina večja razlika med našo in drugimi raziskavami je v številu bolnic, ki so bile zdravljene z dopolnilnim sistemskim zdravljenjem. Pri nas ga je prejel 89 % vseh bolnic, v večini drugih (retrospektivnih) raziskav pa le 28–70 % bolnic. Pri tem ne gre za agresivnejši pristop k zdravljenju na našem inštitutu, ampak zgolj za različno časovno obdobje, v katerem smo bolnice vključevali v analizo. Datoteke bolnic iz teh raziskav namreč segajo v osemdeseta in začetek devetdesetih let preteklega stoletja. Zdravljenje bolnic se je takrat razlikovalo od zdravljenja v zadnjem desetletju.

Tako smo raziskali učinkovitost posameznih vrst dopolnilnega sistemskega zdravljenja pri bolnicah z majhnimi in velikimi vrednostmi posameznih dejavnikov proteinskega sistema uPA. V naši raziskavi le dobra desetina bolnic ni prejela nobenega dopolnilnega sistemskega zdravljenja. Tretjina bolnic je prejela dopolnilno

kemoterapijo, tretjina dopolnilno hormonsko zdravljenje, četrtna pa oboje. Izračunali smo 3-letno PBZB glede na proteinski sistem uPA znotraj skupin, ki smo jih določili glede na vrsto dopolnilnega sistemskega zdravljenja. S tem smo želeli ugotoviti, ali lahko vsebnost dejavnikov proteinskega sistema uPA napove odgovor na določeno vrsto sistemskega zdravljenja.

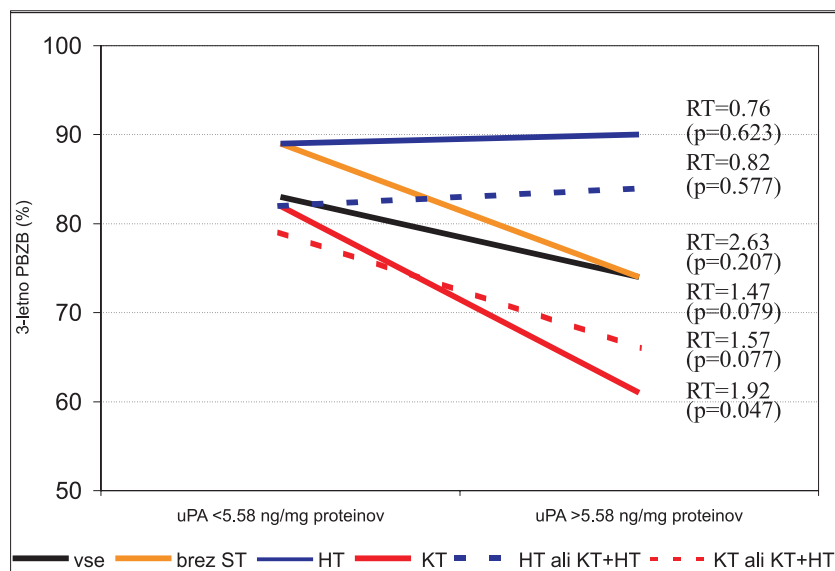
Za uPA smo ugotovili, da je pri bolnicah, ki niso prejele dopolnilnega sistemskega zdravljenja ali pa so prejele kemoterapijo (samo ali v kombinaciji s hormonskim zdravljenjem), tveganje ponovitve bolezni večje, če imajo v tumorju veliko vrednost uPA. Do popolnega preobrata pa je prišlo pri bolnicah, ki so prejele dopolnilno hormonsko zdravljenje. Tu nismo ugotovili statistične razlike v 3-letnem PBZB. Še več, bolnice z velikimi vrednostmi uPA v tumorju so imele v primerjavi z drugimi celo manjše

Dejavnike proteinskega sistema uPA določamo v tumorskem ekstraktu. Tega pripravimo iz zmletga koščka tumorja, ki je bil neposredno po operaciji zamrznjen v tekočem dušiku. Način priprave je podoben kot za biokemično določanje hormonskih receptorjev, le da pri ekstrakciji beljakovin iz tumorja uporabljamo tudi detergent Triton X-100.



Slika 3. PBZB pri vseh bolnicah glede na PAI-1 in PAI-2 (PBZB = preživetje brez znamenj bolezni, m = vrednost, manjša od razmejitvene, v = vrednost, večja od razmejitvene)

tveganje ponovitve bolezni (Slika 4). Izračun in grafični prikaz govorita v prid trditvi, da je velika vrednost uPA v tumorju napovedni dejavnik dobrega odgovora na zdravljenje z dopolnilnim hormonskim zdravljenjem.



Slika 4. Triletno PBZB pri bolnicah z majhnimi in velikimi vrednostmi uPA znotraj podskupin bolnic z različnim dopolnilnim sistemskim zdravljenjem (ST = sistemsko zdravljenje, HR = hormonsko zdravljenje, KT = kemoterapija, RT = relativno tveganje ponovitve bolezni)

Podobno kot za uPA smo ugotovili tudi za PAI-1. Tako je bila velika razlika v PBZB glede na vsebnost PAI-1 pri vseh bolnicah, nezdravljenih in tistih, ki so prejele dopolnilno sistemsko kemoterapijo. Znova pa se je krivulja obrnila pri bolnicah, ki so prejele dopolnilno HT. Tu so imele bolnice z velikimi vrednostmi PAI-1 v tumorju praktično enako 3-letno PBZB in relativno tveganje ponovitve bolezni. Tudi za PAI-1 lahko trdimo, da velike vrednosti tega zaviralca napovedujejo dober odgovor na dopolnilno hormonsko zdravljenje.

Kako si lahko razložimo ugoden učinek hormonskega zdravljenja – pri večini bolnic je bil to antiestrogen tamoksifen – na izboljšanje PBZB pri bolnicah z velikimi vrednostmi uPA, PAI-1 in uPAR v tumorju? Ugotovili so, da 4-hidroksitamoksifen in raloksifen, ki je prav tako antiestrogen, *in vitro* vplivata na uravnavanje genov za uPA in PAI-1. Po dodatku teh dveh zdravil v kulturo celic raka dojke so izmerili nižjo raven mRNA za uPA in PAI-1 (168). To v veliki meri pojasnjuje izsledke naše raziskave in tudi drugih, ki so ugotovile ugoden vpliv dopolnilnega sistemskega zdravljenja s tamoksifonom pri bolnicah z velikimi vrednostmi uPA (12-14) in PAI-1 v tumorju (13).

Pogled v prihodnost

Nove diagnostične metode in velik napredek v tehniki genske analize danes omogočajo zelo podrobno opredelitev

biologije tumorjev. Prizadevanje številnih raziskovalcev je razjasnilo molekularno zgradbo proteinskega sistema uPA, mehanizem delovanja in interakcije med seboj in drugimi celičnimi proteini. Le še korak pa nas loči od razpoznavne tarče do odkritja molekule, ki bo delovala na posamezno tarčo v tumorju in zavrla aktivacijske poti. Postavlja se vprašanje, ali bi lahko morda z »umetno« velikimi vrednostmi PAI-2 ali sintetičnimi zaviralci preprečili invazijo in zasevanje tumorskih celic. *In vitro* so že ugotovili, da selektivni zaviralec uPA 4-jodobenzo(b)tiofen-2-karboxamidin (B-428) preprečuje tumorsko rast in invazijo (15, 16). Izsledki teh raziskav nakazujejo, da je uPA kot osrednja proteaza v procesu tumorske proteolize zanimiva tarča za nova zdravila proti raku, ki bodo to bolezen v prihodnosti naredila še bolj obvladljivo.

Literatura

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 351: 1451–67.
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 352: 930–42.
3. Zetter B. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49: 407–14.
4. Schmitt M, Jänicke F, Graeff H. Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis* 1992; 6: 3–26.
5. Schmitt M, Wilhelm OG, Reuning U, et al. The plasminogen activation system as a novel target for therapeutic strategies. *Fibrinolysis* 2000; 14: 114–32.
6. Conesi M, Blasi F. The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion. *Bailliere's Clinical Haematology* 1995; 8: 365–8.
7. Danö K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139–266.
8. Stephens RW, Brüner N, Jänicke f, Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 99–111.
9. Duffy M, O'Grady P, Devaney D, O'Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. *Cancer* 1988; 62: 531–3.
10. Look M, van Puten WLJ, Duffy MJ, et al. Prognostic impact of plasminogen activator components in breast cancer: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(2): 116–28.
11. Foeckens JA, Look M, Peters HA et al. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Nat Cancer Inst* 1995; 1: 751–6.

Velike vrednosti uPA, PAI-1 in uPAR napovedujejo dober odgovor na zdravljenje z dopolnilnim hormonskim zdravljenjem.

12. Fernö M, Bendahl PO, Borg A et al. Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with luminometric immunoassay. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 793–801.
13. Harbeck N, Alt U, Berger U, et al. Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsin B, D and L) in primary breast cancer reflects effects on adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2757–64.
14. Borštnar S, Čufer T, Vrhovec I, Svetic B. Prognostic value of plasminogen activator inhibitors in breast cancer. *Int J Biol Markers* 2002; 17(1): 96–103.
15. Rabbani SA, Harakidas P, Davidson DJ, Henkin J, Mazar AP. Prevention of prostate-cancer metastasis in vivo by a novel synthetic inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA). *Int J Cancer* 1995; 63(6): 840–5.
16. Alonso DF, Farias EF, Ladedá V, Davel L, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E. Effects of synthetic urokinase inhibitors on local invasion and metastasis in a murine mammary tumor model. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 40(3):209–23.

