

Wstęp: Interesującą strategią eksperymentalnej terapii nowotworów jest antyangiogenna terapia genowa. Opiera się ona na założeniu, że powstawanie sieci naczyń krwionośnych w masie nowotworu jest czynnikiem bezpośrednio determinującym jego rozwój. Konstruktor psFLT jest plazmidowym wektorem ekspresyjnym kodującym czynnik o charakterze antyangiogennym. Zawiera on fragment genu receptora FLT dla VEGF – kodujący rozpuszczalną formę tego receptora (sFLT).

Cel pracy: Ocena odpowiedzi na leczenie u chorych na raka sromu po podaniu miejscowym konstruktowi psFLT.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 21 chorych na raka sromu w stopniach klinicznego zaawansowania od I B do IV A.

Plazmid psFLT-1 był podawany bezpośrednio doguzowo. Podawano 800 µg roztworu psFLT-1 w soli fizjologicznej (0,4 mg/ml), wykonując 6–10 doguzowych iniekcji (wstrzyknięcia co 1–2 cm). Ostrzykiwanie guza powtarzano po 2 tyg. Efekt terapeutyczny (zmianę powierzchni guza) oceniano po 3–6 tyg. od pierwszego podania.

Wyniki: Odpowiedź na leczenie w postaci zmiany powierzchni guza uzyskano u 16 chorych. Tolerancja leczenia była bardzo dobra. Po podaniu konstruktowi u 13 pacjentek przeprowadzono leczenie operacyjne, a u 4 pacjentek wyłącznie radiochemioterapię. U 12 chorych po leczeniu genowym, po którym wykonano chirurgiczne usunięcie zmiany, zaobserwowano w badaniu histopatologicznym brzożną martwicę, która wynosiła nawet do 40% masy guza.

Stwierdzono znamienne statystycznie różnice w powierzchni guza po podaniu 1 dawki konstruktowi psFLT, utrzymujące się po drugim podaniu ($p < 0,05$).

Wydaje się, że w przypadkach miejscowo zaawansowanego raka sromu zastosowanie konstruktowi psFLT przynosi realne korzyści dla chorych poprzez ograniczenie nacisku nowotworowego, poprawiając komfort życia.

Słowa kluczowe: rak sromu, terapia genowa, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, inhibitory angiogenezy.

Terapia genowa miejscowo zaawansowanego raka sromu konstruktowi psFLT

Gene therapy of locally advanced vulvar cancer with psFLT construct

Krzysztof Gawrychowski¹, Maciej Małcki², Grzegorz Szewczyk¹, Grzegorz Panek³, Wacław Śmierzka¹, Katarzyna Roszkowska-Purska¹, Mariusz Bidziński³, Małgorzata Sadowska¹, Joanna Surowińska¹, Monika Dąbrowska¹, Anna Górniak¹, Ryszard Krynicki³, Karolina Hajdukiewicz²

¹Oddział Ginekologii Onkologicznej Kliniki Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie

²Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie

³Klinika Nowotworów Narządów Płciowych Kobiety, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Wstęp

Rak sromu należy do rzadko występujących nowotworów. W Polsce notuje się ok. 400 przypadków rocznie [1].

Szczyt zachorowań przypada na 6. i 7. dekadę życia, choć w ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowań u młodszych kobiet, co może być spowodowane częstszymi infekcjami wirusowymi, zwłaszcza wirusem HPV (*human papilloma virus*) [2–4].

Podstawową metodą leczenia inwazyjnego raka sromu jest chirurgia. Opracowane w latach 40. XX wieku radykalne, blokowe wycięcie sromu oraz regionalnych węzłów chłonnych, a także zmodyfikowana radykalna operacja dokonywana techniką trzech cięć potwierdziły wysoką skuteczność w przypadkach nowotworu we wczesnym stadium zaawansowania miejscowego (T1, T2), bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Osiągany w wyniku takiego postępowania odsetek 5-letnich przeżyć bezobjawowych przekracza 70%.

Wyniki leczenia przypadków miejscowo zaawansowanych w stopniach T3 i T4, a także u chorych z przerzutami do węzłów chłonnych są znacznie gorsze. Zaledwie 20–40% chorych przeżywa 5 lat bez cech nawrotu nowotworu [5].

Szczególnie złe rokowanie dotyczy chorych z guzem naciekającym narządy sąsiednie lub masywnymi, nieoperacyjnymi przerzutami do węzłów chłonnych pachwinowych. Wyniki chirurgii egzenteracyjnej w powyższych przypadkach nie są zachęcające, głównie z powodu wysokiego odsetka wznów i niskiego poziomu akceptacji jakości życia chorych po takich operacjach. Stan ten spowodował wzrost zainteresowania radioterapią w leczeniu tego typu przypadków raka sromu [6].

Doświadczenia kliniczne zebrane w latach 90. XX wieku potwierdziły wysoką skuteczność chemioradioterapii nowotworów, w tym raka szyjki macicy i raka sromu. Leczenie takie stosowane jest zarówno jako neoadiuwant, którego zadaniem jest uzyskanie regresji nowotworu w stopniu pozwalającym na przeprowadzenie radykalnej operacji, jak i jako leczenie samodzielne [7]. Współczesne doniesienia dotyczące wyników chemioradioterapii z zastosowaniem mitomycyny C i 5-fluorouracylu potwierdzają wysoką skuteczność terapeutyczną takiego postępowania. Problemem klinicznym pozostaje tok-

Introduction: An interesting strategy in experimental therapy of neoplasms is genetic-based antiangiogenic therapy. The basis for this therapy is the premise that development of new tumour vessels is a direct factor for tumour growth. The psFLT construct is a plasmid expression vector that encodes the antiangiogenic factor. It consists of a gene fragment of the VEGF receptor Flt which encodes the soluble form of this receptor.

The aim of the study was to assess the response to treatment in patients with vulvar cancer after local administration of psFLT construct.

Material and methods: 21 patients with vulvar cancer (IB–4A stage according to FIGO) were recruited into the study. Patients were given a local injection of 800 µg psFLT-1 construct dose (0.4 mg/ml). 6–10 injections were made in the tumour vicinity (1–2 cm) and the treatment was repeated after 2 weeks. In the assessment of the therapy the total area of the tumour and the relative change in the area (compared to the primary area) were measured after 3–6 weeks from the first treatment.

Results: The response to treatment defined as above was achieved in 16 patients with good tolerance of the treatment. Surgical treatment was performed in 13 patients after administration of the construct and in 4 patients only radio-chemotherapy was performed. Marginal necrosis was observed in 12 patients after the following surgery treatment in histopathological examination with the maximum reaching 40% of the tumour volume. Significant differences in tumour area change were observed after administration of the 1st dose of the construct as well as after the 2nd dose.

It seems that use of psFLT construct in locally advanced vulvar cancer can give real advantages for patients due to reducing local cancer infiltration and improving quality of life.

Key words: vulvar cancer, gene therapy, vascular endothelial growth factor, angiogenesis inhibitors.

syczność leczenia. U ok. 50–60% napromienianych obserwuje się odczyn wczesny o średnim i dużym stopniu nasilenia, a śmiertelność wynosi 1–3%. Do najistotniejszych czynników wpływających na wystąpienie odczynu popromiennego zalicza się wielkość pola wlotowego i objętość napromienianych tkanek. W przypadku znacznego zaawansowania nowotworu, szerzącego się na skórę krocza, uda lub pośladka przeprowadzenie bezpiecznego napromieniania może być bardzo trudne lub wręcz niemożliwe [8].

Jednym z nowatorskich sposobów postępowania w zaawansowanym miejscowo raku sromu pierwotnie niekwalifikującym się do leczenia operacyjnego i radioterapii jest próba zastosowania inhibitorów angiogenezy. Wcześniej doświadczenia kliniczne z ich zastosowaniem do leczenia zarówno pierwotnych, jak i nawrotowych nowotworów w różnych lokalizacjach dają podstawę do dalszych badań nad zastosowaniem tego typu terapii [9].

Wektor ekspresyjny psFLT

Interesującą strategią eksperymentalnej terapii nowotworów jest anty-angiogenna terapia genowa. Opiera się ona na założeniu, że powstawanie sieci naczyń krwionośnych w masie nowotworu jest czynnikiem bezpośrednim determinującym jego rozwój i warunkującym jednocześnie tworzenie przerzutów nowotworowych. Kilka strategii antyangiogennych znajduje się w trakcie badań eksperymentalnych. Zaliczyć tu można np. próby wykorzystania proteolitycznych fragmentów białek budulcowych (angiostatyna, endostatyna), przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw angiogennym czynnikom wzrostowym czy rozpuszczalnych fragmentów receptorów dla czynników wzrostowych, np. dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) [10–15].

Konstrukt psFLT jest plazmidowym wektorem ekspresyjnym kodującym czynnik o charakterze antyangiogennym. Zawiera on fragment genu receptora FLT dla VEGF, kodujący rozpuszczalną formę tego receptora (sFLT). Fragment genu sFLT został wklonowany do komercyjnego wektora pSEC (Invitrogen). Charakterystyczne sekwencje pustego wektora pSEC to: promotor wirusowy CMV, sekwencja sygnałowa Igκ, epitop myc oraz sekwencje oporności na ampicylinę oraz fleomycynę. W wyniku klonowania uzyskano konstrukt genowy ze swoistą kasetą ekspresyjną.

Opracowanie terapii antyangiogennej lub postępowania prowadzącego do zmniejszenia stężenia VEGF/VPF może przyczynić się do poprawienia skuteczności terapii nowotworów litych i co za tym idzie, rokowania dla chorych. Próbą takiego postępowania jest podanie konstrukt psFLT w okolicę guza u chorych na raka sromu, który poprzez VEGF i blokowanie natywnych receptorów dla VEGF zahamuje neoangiogenezę, powodując regresję guza.

Materiał i metody

Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Jest to badanie kliniczne I/II fazy, do którego zakwalifikowano 21 chorych z histopatologicznie potwierdzonym płaskonabłonkowym rakiem sromu w stopniach klinicznego zaawansowania od IB do IV A. Wiek pacjentek wynosił 54–86 lat (średnio 69,9 roku). W 16 przypadkach terapia genowa była leczeniem pierwotnym, a pozostałych było to leczenie wznowy po uprzednim leczeniu chirurgicznym bądź radioterapii.

Plazmid psFLT-1 podawany był bezpośrednio doguzowo. Podawano 800 µg roztworu psFLT-1 w soli fizjologicznej (0,4 mg/ml), wykonując 6–10 doguzowych iniekcji (wstrzyknięcia co 1–2 cm). Ostrzykiwanie guza było powtarzane po 2 tyg. Efekt terapeutyczny (zmianę powierzchni guza) oceniano po 3–6 tyg. od pierwszego podania. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA z testem NIR *post-hoc*. Wyniki uznawano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

Wyniki

Odpowiedź na leczenie – zmianę powierzchni guza uzyskano u 16 chorych. Tolerancja leczenia była bardzo dobra. W żadnym przypadku nie zano- towano działań niepożądanych. Po podaniu konstrukt u 13 pacjentek prze-

Tabela 1. Pole powierzchni guza po kolejnym podaniu leku oraz odpowiedź na leczenie (wyrażona w procentach w odniesieniu do wyjściowej powierzchni guza)

Table 1. Area of tumour after administration of the construct and response to treatment (stated in percentage of the primary tumour area)

	Średnia powierzchnia guza (cm ²)	Minimalna powierzchnia guza (cm ²)	Maksymalna powierzchnia guza (cm ²)	Średnia odpowiedź na leczenie (%)	Maksymalna odpowiedź na leczenie (%)	Minimalna odpowiedź na leczenie (%)
grupa 0 (n = 21)	96,5	3,14	405,5	100	100	100
grupa I (n = 20)	73,7	2,51	314,0	77,3*	38,7	100
grupa II (n = 17)	98,6	34,0	167,4	67,8*	38,1	91,0

grupa 0 – ocena przed leczeniem, grupa I – 2 tyg. po 1. dawce konstruktu; grupa II – 2 tyg. po 2. dawce konstruktu

* zaznaczono istotne statystycznie różnice między grupami



Ryc. 1. Guz sromu – ocena przed podaniem konstruktu
Fig. 1. Vulvar tumor – before treatment with construct



Ryc. 2. Guz sromu – ocena po leczeniu konstruktem
Fig. 2. Vulvar tumor – assesment after treatment with construct

prowadzono leczenie operacyjne (w tym u 5 pacjentek z następową radiochemioterapią), a u 4 pacjentek wyłącznie radiochemioterapię. Cztery pacjentki zrezygnowały z dalszego leczenia. U 12 chorych po leczeniu genowym, po którym wykonano chirurgiczne usunięcie zmiany, zaobserwowano w badaniu histopatologicznym brzożną martwicę, która wynosiła nawet do 40% masy guza. Ocenę powierzchni guza zamieszczono w tabeli 1. Odpowiedź na leczenie określano, porównując powierzchnię guza po podaniu dawek konstruktu z powierzchnią przed leczeniem i wyrażano w procentach.

Stwierdzono znamienne statystycznie różnice w powierzchni guza po podaniu 1 dawki konstrukt psFLT, utrzymujące się po drugim podaniu ($p < 0,05$).

Dyskusja

Zaawansowany rak sromu stanowi poważny problem terapeutyczny. Często miejscowe zaawansowanie guza uniemożliwia radykalne jego wycięcie, a naciekanie okolicy zwiększa odbytu naraża chore na okaleczające zabiegi chirurgiczne, na które albo nie wyrażają one zgody, albo nie kwalifikują się do tego typu rozległych zabiegów chirurgicznych ze względu na upośledzony stan ogólny.

Projektując przedstawione badanie kliniczne, wykorzystano informacje, opublikowane wyniki badań prze-

prowadzone *in vitro* oraz na zwierzętach laboratoryjnych, które wskazują, że ekspresyjny wektor plazmidowy psFLT-1 ulega ekspresji zarówno w komórkach hodowlanych, jak i guzach nowotworowych. W badaniach wykazano, że w transfekowanych komórkach powstaje wydzielane na zewnątrz rekombinowane białko sFLT-1; obserwowano przy tym hamowanie angiogenezy oraz hamowanie wzrostu guzów nowotworowych i wydłużenie czasu życia zwierząt [16–18].

Wydaje się, że w tych przypadkach zastosowanie konstrukt psFLT przynosi realne korzyści chorym poprzez ograniczenie nacieku nowotworowego, poprawiając komfort ich życia. Innym aspektem tego leczenia jest zastosowanie terapii antyangiogennej u chorych we wcześniejszych stopniach zaawansowania klinicznego, które są kwalifikowane do leczenia chirurgicznego. Zmniejszenie ukrwienia guza, jak również jego wymiarów, ogranicza śródoperacyjną utratę krwi oraz zmniejsza pole operacyjne. Ma to niebagatelne znaczenie w skróceniu procesu gojenia rany pooperacyjnej, a co za tym idzie – umożliwia wcześniejsze leczenie uzupełniające, np. radioterapię.

Praca powstała ze środków grantu KBN „Terapia genowa raka sromu 2P05E 071 26”, kierownik grantu: dr med. Krzysztof Gawrychowski.

Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Tarnowski W, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2004 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2006; 96.
2. Sasco AJ, Genre I. Current epidemiology of vulvar cancer. *Contracept Fertil Sex* 1998; 26: 858-64.
3. Macnab JC, Walkinshaw SA, Cordiner JW, Clements JB. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. *N Engl J Med* 1986; 315: 1052-8.
4. Gryboś M, Murawski M. Epidemiologia i etiopatogeneza raka sromu. W: *Ginekologia onkologiczna*. Markowska J (red.). Urban & Partner, Wrocław 2006; 247-54.
5. Emerich J, Sznurowski J. Leczenie chirurgiczne raka sromu. W: *Ginekologia onkologiczna*. Markowska J (red.). Urban & Partner, Wrocław 2006; 414-41.
6. Boronow RC. Combined therapy as an alternative to exenteration for locally advanced vulvo-vaginal cancer; rationale and results. *Cancer* 1982; 49: 1085-91.
7. Moore DH, Thomas GM, Montana GS, Saxer A, Gallup DG, Olt G. Preoperative chemoradiation for advanced vulvar cancer; a phase II study of the gynecologic oncology group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42: 79-85.
8. Mulayim N, Foster Silver D, Schwartz PE, Higgins S. Chemoradiation with 5-fluorouracil and mitomycin C in the treatment of vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 659-66.
9. Małecki M, Janik P. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i jego potencjalne aplikacje terapeutyczne w zmianach naczyniowych i nowotworowych. *Pol Przegl Chir* 1999; 71: 1291-97.
10. Ment LR, Stewart WB, Fronc R, Seashore C, Mahooti S, Scaramuzino D, Madri JA. Vascular endothelial growth factor mediates reactive angiogenesis in the postnatal developing brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 100: 52-61.
11. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. Regulation of angiogenesis. Birkhauser Verlag, Basel 1997; 1-8.
12. Angiolillo AN, Sgadani C, Taub DD, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995; 182: 155-62.
13. Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* 1994; 368: 237-9.
14. Gately S, Twardowski P, Stack M, et al. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* 1996; 56: 4887-90.
15. Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; 73: 333-46.
16. Małecki M, Jastrzębski Z, Przybyszewska M, Proczka R, Janik P. Antiangiogenic gene therapy: application of soluble FLT-1 receptor. *Adv Clin Exp Med* 2004; 13: 227-33.
17. Małecki M, Trembacz H, Szaniawska B, Przybyszewska M, Janik P. Vascular endothelial growth factor and soluble FLT-1 receptor interactions and biological implications. *Oncology Reports* 2005; 14: 1565-9.
18. Małecki M, Gromek K, Przybyszewska M, Janik P. Plazmidowy wektor ekspresyjny kodujący receptor sFLT-1 (psFLT-1) ogranicza angiogenezę i wzrost guzów L1. *Współcz Onkol* 2006; 10: 145-51.

Adres do korespondencji

dr med. **Krzysztof Gawrychowski**
Oddział Ginekologii Onkologicznej
Klinika Onkologiczna
Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
ul. Wawelska 15
02-061 Warszawa
tel./faks +48 22 570 92 95
e-mail: kgawrychowski@wp.pl